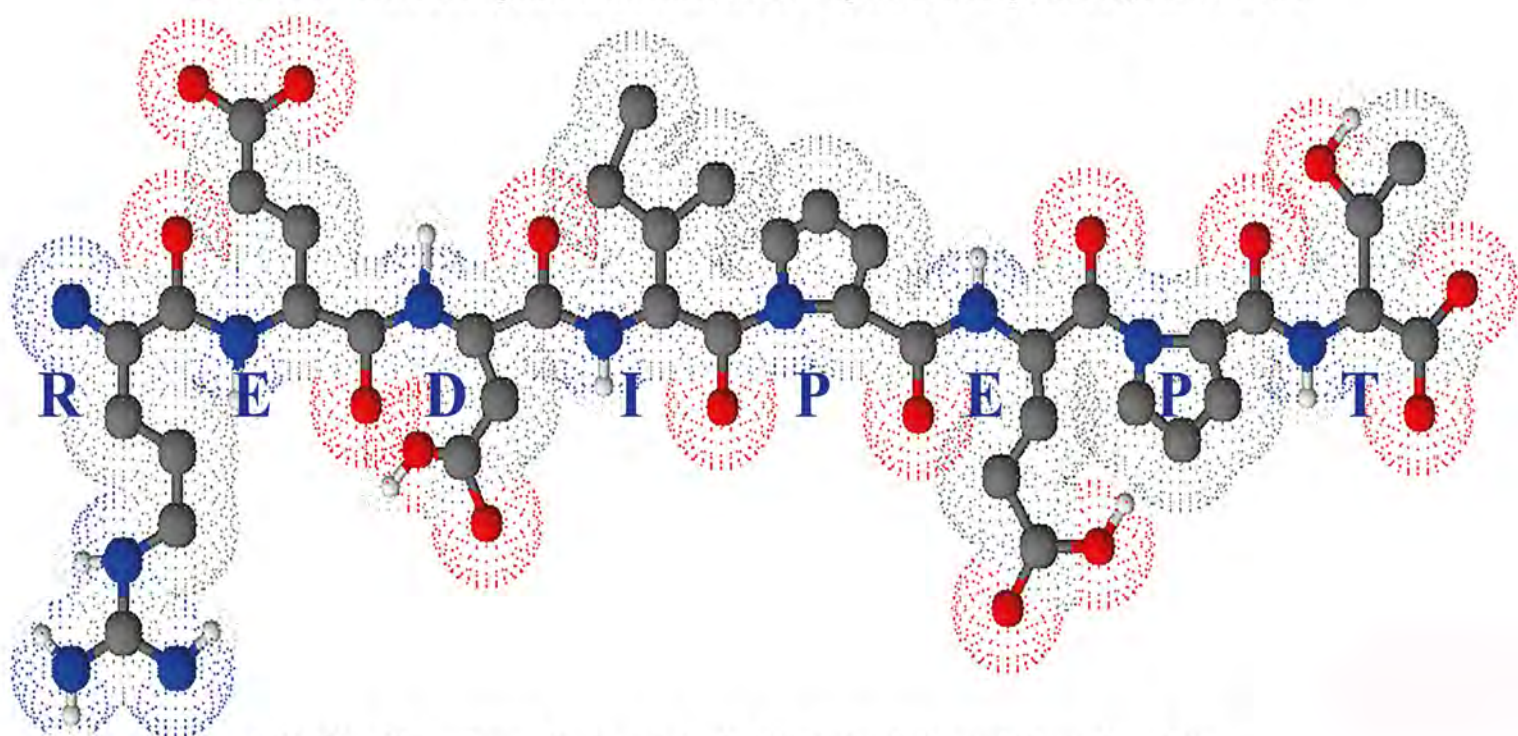


Bionatura

Latin American journal of Biotechnology and Life Sciences

Red Iberoamericana para el Desarrollo de Péptidos Terapéuticos, REDIPEPT



COVID-19: Aplanar la curva de la “infodemia” también salva vidas

Evaluación de la calidad de vida como predictor de supervivencia en el cáncer

Myopericarditis COVID-19

Iraq Faces the COVID-19 with Limited Health Capabilities and Major Medical Challenges



Es el momento de los que se atreven a
soñar y luchan por alcanzar sus metas.
En la UCO te acompañamos



Vigilada Mineducación

Pregrados

➤ Tecnología en Operaciones Financieras

SNIES 104841 Registro Calificado - Res. 12903 del 21-06-2015 M.E.N.
96 créditos - A distancia tradicional - Rionegro Ant.

➤ Contaduría Pública

SNIES 13018 Registro Calificado - Res. 9256 del 07-06-2018
Acreditación de Alta Calidad 4610 del 21-03-2018 M.E.N.
166 créditos Presencial - Rionegro

➤ Comercio Exterior

SNIES 1854 Registro Calificado - Res. 14314 del 11-12-2019 M.E.N.
159 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Administración de Empresas

SNIES 55096 Registro Calificado - Res. 7658 del 18-04-2017 M.E.N.
152 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Tecnología Agropecuaria

SNIES 1850 Registro Calificado - Res. 8684 del 10-07-2013 M.E.N.
113 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Agronomía

SNIES 4443 Registro Calificado - Res. 8067 del 17-05-2018
Acreditación de Alta Calidad N° 29149 del 26-12-2017
157 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Zootecnia

SNIES 53037 Registro Calificado - Res. 14466 del 04-09-2014 M.E.N.
156 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Psicología

SNIES 8562 Registro Calificado - Res. 9902 del 31-07-2013 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad N° 17227 del 24-10-2018
175 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Comunicación Social

SNIES 53045 Registro Calificado - Res. 14892 del 11-09-2014 M.E.N.
146 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Trabajo Social

SNIES 106586 Registro Calificado - Res. 26741 del 29-11-2017 M.E.N.
141 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Derecho

SNIES 53539 Registro Calificado - Res. 10542 del 14-07-2015 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Nutrición y Dietética

SNIES 104901 Registro Calificado - Res. 7823 del 01-06-2015 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Gerontología

SNIES 1853 Registro Calificado - Res. 14839 del 22-10-2013 M.E.N.
139 créditos - A distancia con apoyo Virtual - Rionegro Ant.

➤ Enfermería

SNIES 91027 Registro Calificado - Res. 12600 del 03-08-2018 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Filosofía

SNIES 106542 Registro Calificado - Res. 22108 del 24-10-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Lenguas Extranjeras con énfasis en Inglés

SNIES 106647 Registro Calificado - Res. 29529 del 29-12-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Educación Física, Recreación y Deportes

SNIES 106436 Registro Calificado - Res. 17481 del 31-08-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Educación para la Primera Infancia

SNIES 105359 Registro Calificado - Res. 02848 del 16-02-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Ciencias Naturales

SNIES 105896 Registro Calificado - Res. 19869 del 18-10-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Licenciatura en Educación Religiosa

SNIES 106705 Registro Calificado - Res. 2084 del 13-02-2018 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Técnico Profesional en Programación Web

SNIES 103704 Registro Calificado - Res. 14454 del 04-09-2014 M.E.N.
67 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Ingeniería Ambiental

SNIES 4361 Registro Calificado - Res. 3654 del 02-03-2018 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad No. 6543 del 18-04-2018
173 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Ingeniería de Sistemas

SNIES 1855 Registro Calificado - Res. 0178 del 05-01-2019 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Ingeniería Industrial

SNIES 1866 Registro Calificado - Res. 1253 del 04-02-2019 M.E.N.
160 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Ingeniería Electrónica

SNIES 20271 Registro Calificado - Res. 24646 del 14-11-2017 M.E.N.
178 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

➤ Teología

SNIES 103450 Registro Calificado - Res. 10638 del 09-07-2014 M.E.N.
130 créditos - A distancia - Rionegro Ant.

¡HAGAMOS QUE PASE!



SOMOS LA PRIMERA UNIVERSIDAD
DEL ECUADOR
CON MAYOR RELEVANCIA EN

**PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS**

Bionatura



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

1172

Equipo editorial

Editor Jefe / Chief Editor

Dr. Nelson Santiago Vispo. Ph.D. Research / Full Professor. Yachay Tech University, Ecuador. Member of the European Association of Science Editors (EASE) and Council of Science Editors (USA).

Principal Editorial Board / Consejo Editorial Principal

Dr. Fernando Albericio. Ph.D. Full Professor. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa.
Dr. Spiros N. Agathos. Ph.D. Full Professor. Université Catholique de Louvain - UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.
Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera. Ph.D. Full Professor and Dean, School of Chemical Sciences and Engineering Yachay Tech University, Ecuador.
Dr. Frank Alexis. Research / Full Professor. Vice Chancellor Of Research and Innovation. Yachay Tech University, Ecuador.

Consejo Editorial / Editorial Board

Dr. Gerardo Ferbeyre. Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.
Dr. Frank Camacho Casanova. Ph.D., Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Chile.
Dr. Eduardo López Collazo. Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.
Dr. Yovani Marrero-Ponce. Ph.D. Full Professor. Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador.
Dr. Manuel Limonta. Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of México City (UAM). Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador.
Dr. Dagoberto Castro - Restrepo. Prof. PhD. Research and Development Director. Universidad Católica del Oriente. Rio Negro. Colombia.
Dr. Michael Szardenings. Ph.D. Ligand Development Unit. Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology. Germany.
Dra. Luciana Dente. Research Professor University of Pisa, Italy.
Dr. Costantino Vetriani. Research / Full Professor. Rutgers, The State University of New Jersey, USA.
Dr. Si Amar Dahoumane. Ph.D. Research / Professor. Yachay Tech University, Ecuador.
Dr. Amit Chandra, MD, MSc, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.
Dr. Silvio e. Perea. Ph.D. Head of the Molecular Oncology Laboratory. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba.
Dra. Daynet Sosa del Castillo. Ph.D. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL.
Dra. Consuelo Macías Abraham. Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.
Dr. René Delgado. Ph.D. IFAL / Presidente Sociedad Cubana de Farmacología. Cuba.
Dr. Ramón Guimil. Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.
Dr. Eduardo Penton. MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
Dra. Lisset Hermida. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.
Dr. Tirso Pons. Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.
Dr. Che Serguera. French Institute of Health and Medical Research. MIRCen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France.
Dr. Jorge Roberto Toledo. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.

Dr. Oliberto Sánchez. Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
Dr. Amina Sánchez Rodríguez. PhD. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
Dra. Maritza Pupo. Profesora investigador. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
Dr. Fidel Ovidio Castro. Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile.
Dra. Olga Moreno. Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.
Dr. Carlos Borroto. Asesor de Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.
Dr. Javier Menéndez. Manager Specialist Process and Product 5cP. Sarnofi Pasteur, Canadá.
Dr. Pedro Valiente. Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
Dr. Diógenes Infante. Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.
Dra. Georgina Michelena. Profesora Investigador. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.
Dr. Francisco Barona. Profesor Asociado. Langebio Institute, México.
Dr. Gustavo de la Riva. Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.
Dr. Manuel Mansur. New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.
Dr. Rolando Pajón. Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Research. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland, Estados Unidos.
Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca. Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.
Dr. Mario Alberto Quijano Abril. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.
Dr. Felipe Rojas Rodas. PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.
Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.
Dr. Felipe Rafael Garcés Fiallos, PhD. Profesor / Investigador. Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social del Conocimiento y Posgrado Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador.
Dra. Celia Fernandez Ortega. PhD. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Editora ejecutiva Biotecnología Aplicada. Cuba.
Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete. PhD. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Ecuador.
Dr. Nalini kanta Sahoo, PhD. Professor & Head Department Marri Laxman Reddy Institute of Pharmacy. Hyderabad, Andhra Pradesh, India.
Dr. Saman Esmaeilnejad. PhD. Department of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Dr. Olukayode Karunwi. PhD. Research / Professor. Clemson University. Clemson, United States.

Associate Editor / Editor Asociado

Victor Santiago Padilla.

Redacción y Edición / Copyediting and corrections

Mg. Frey A. Narváez-Villa. Jefe del Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.
MSc. José Enrique Alfonso Manzanet.

Diseño y Realización gráfica / Graphic design and production

DI. José Manuel Oubiña González.

Relaciones Publicas / Public relations

Camila Barranco Rodriguez.

Asistente de publicación / Publication assistant

Evelyn Padilla Rodriguez.

Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores.

Referencias Bibliográficas. Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos.

En las Referencias en caso de que las publicaciones revisadas esten online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

Figuras: Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fórmulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábica consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

Abreviaturas y siglas: Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

Sistema Internacional de Unidades (SI): Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvacouver.htm#ilustraciones%20(figura))

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

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

Bionatura

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

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

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

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

Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.

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

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

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:
Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)
Formato: 21 x 29,7 cm
ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)
Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

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

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

Asistente de publicación / Publication assistant
Evelyn Padilla Rodríguez (sales@revistabionatura.com)

ÍNDICE / INDEX

EDITORIAL

Red Iberoamericana para el desarrollo de péptidos terapéuticos, REDIPEPT 1177

Hortensia Rodríguez , Fernando Albericio, Nelson Santiago Vispo

LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

Los tratamientos pseudocientíficos en la pandemia de COVID-19: Aplanar la curva de la "infodemia" también salva vidas 1181

Estefanía Espín

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Molecular identification of Shiitake [*Lentinula edodes* Berk (Pegler)] and production of secondary metabolites with biotechnological potential 1183

Byron Durán-Rivera, Felipe Rojas-Rodas, Wilber Silva-López, Christian Gómez-Suárez, Dagoberto Castro-Restrepo

Enriquecimiento proteico de *Solanum tuberosum* mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*
Protein enrichment of Solanum tuberosum by solid-state fermentation using Aspergillus niger 1189

Fonseca Lilíbeth Berenize, Fernández, Danae, López Orestes Dario

Metodología para calcular la amplitud y orientación espacial del vector total de cada onda electrocardiográfica en cuadrúpedos
Methodology to calculate the amplitude and spatial orientation of the total vector of each electrocardiographic wave in quadrupeds 1195

Alberto Pompa Núñez, Dania Yusimí Pompa Rodríguez

Seasonal abundance and distribution of phytoplankton in Tanintharyi coastal waters, southern Myanmar 1203

Khin Khin Gyi, Wint Thuzar Nwe, Zin Zin Zaw and Khin Khin San

Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba
Phytochemical screening of extracts obtained from the Sapindus saponaria L plant that grows in Cuba 1209

Anairis Pujol García , Beatriz Tamargo, Eva Salas, Camilo Calzadilla, Reinaldo Acevedo, Gustavo Sierra

Effect of sulphuric acid on roses crop (*Rosa* sp.) 1215

Lorena Marivel Dávila Pullas

Sun ultraviolet radiation in Ibarra, Ecuador and its relation to vitamin D synthesis	1219
--	------

Graciela M. Salum, Paola P. Echeverría Ortiz, Jackeline P. Pereira Carillo, Gandhi F. Villalba Meneses and Rubén D. Piacentini

La calidad de vida es predictiva de supervivencia para distintos tipos de cáncer <i>Quality of life is predictive of survival for different types of cancer</i>	1223
--	------

Carmen Viada, Carlos Bouza, Javier Ballesteros, Martha Fors, Mabel Alvarez, Aliuska Frias, Lazara Garcia, Yanela Santiesteban, Yuliannis Santiesteban, Mayra Ramos

Depresión: Una experiencia del Hospital del Adulto mayor, Quito, Ecuador, 2018 <i>Depression: An experience of the Hospital for the Elderly, Quito, Ecuador, 2018</i>	1230
--	------

María Erazo, Martha Fors

Análisis de la Supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardiaca en la Sierra Norte de Ecuador entre los años 2015 y 2020 <i>Survival analysis of patients with heart failure in the Ecuadorian Sierra Norte between 2015 and 2020</i>	1237
---	------

Alvaro Francisco Gudiño Gomezjurado, Marco Esteban Gudiño Gomezjurado

Inflammatory response of stem cell secreting conditioned media in sh-sy5y cell line	1243
---	------

Faizan Ahmad

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Leptospirosis con Síndrome de Weil que debutan con apendicitis aguda. Reporte de un caso <i>Leptospirosis with Weil Syndrome debuting with acute appendicitis. Report of a case</i>	1246
--	------

Jorge Luis Vélez Páez, Wendy Milagros Tercero Martínez, Edgar Fernando López Rondón, Fernando Enrique Rueda Barragán, Verónica Soledad Guerrero Agila

Infiltración Linfocitaria de Jessner-Kanof. Reporte de un caso <i>Lymphocytic infiltration of Jessner-Kanof. Report of a case</i>	1250
--	------

Adrian Isacc Nieto Jiménez

Myopericarditis and skin rash in a patient with COVID-19 infection	1253
--	------

Araque R Jorge, Paez C Jhenina

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Control of pesticides in Ecuador: An underrated problem?	1257
--	------

Evelyn Carolina Mollocana Lara and Fernando Alexis Gonzales Zu

Antiviral and healing potential of Sambucus nigra extracts	1264
--	------

Michalina Bartak, Agata Lange, Anna Stońska, Joanna Cymerys

NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

Iraq Faces the COVID-19 with Limited Health Capabilities
and Major Medical Challenges 1271

Wedad H. Al-Dahhan, Mohammed H. Al-Mashhadani, Rasha Raheem, Emad Yousif

Use of natural diatoms for drug delivery 1275

Castro Dario, Cuasquer Joselyn, Chavez Eva

Pruebas rápidas para COVID-19, la mejor alternativa para Ecuador 1280
Rapid tests for COVID-19, the best alternative for Ecuador

Ruth T. Valencia Portillo, Bernardina Amorín Uscata, Fernando Alexis Gonzales-Zubiate, Katia Juscamaita Medina, Orlando R. Sevillano, Eduardo Milton Ramos-Sanchez

EDITORIAL

Red Iberoamericana para el desarrollo de péptidos terapéuticos, REDIPEPT Iberoamerican network for the development of therapeutic peptides, REDIPEPT

Hortensia Rodríguez¹, Fernando Albericio², Nelson Santiago Vispo³

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.1

1177

En estos días donde la mayoría de nuestros países se encuentran haciendo frente a la pandemia desencadenada por el COVID-19, podemos leer en los medios de comunicación que la Plitidepsin (Aplidin®) de la biotecnológica española PharmaMar ha demostrado *in vivo* una potencia entre 80 y 2.800 veces superior¹, según el tipo de célula, al Remdesivir® de la estadounidense Gilead. Aplidin® es un fármaco aprobado en Australia para tratar pacientes con mieloma múltiple refractario y recidivante. El principio activo de la Aplidin® es un producto natural, la dehidrodidemnina B, que se aisló de una ascidia, la "Aplidium albicans", por primera vez en la costa mediterránea cercana a Ibiza². Desde el punto de vista estructural, Aplidin® es un depsipéptido cíclico, donde el éster se genera entre el ácido carboxílico del residuo C-terminal, N,O-dimetiltirosina, y el hidroxilo lateral de una treonina. La primera síntesis total de la dehidrodidemnina B se llevó a cabo en la Universidad de Barcelona³.

Este hecho que ha desbordado los ámbitos meramente científicos, debido a la realidad de la era COVID-19 que estamos viviendo, ilustra perfectamente la importancia de los péptidos en la industria farmacéutica. Actualmente, las dos agencias más importantes que regulan el acceso de los medicamentos al mercado, la *Food and Drug Administration* (FDA)⁴ de los Estados Unidos y la *European Medicines Agency* (EMA)⁵ de Europa llevan aprobados más de 90 péptidos. Desde el punto de vista químico van desde pequeños di o tripéptidos a péptidos más complejos con más de 30 o incluso 40 aminoácidos. Ejemplos de los primeros son el dipeptidomimético Captopril para el tratamiento de la hipertensión, y de los segundos, el Lixisenatide (Lyxumia®), que posee una cadena lineal de 44 aminoácidos y que está indicado para el tratamiento de la diabetes.

Aunque el captopril, que fue descubierto por el investigador argentino Miguel A. Ondetti⁶, es un ejemplo de diseño racional de fármacos, no hay ninguna duda que los productos naturales (PN) han sido uno de los principales detonantes de que los péptidos sean hoy en día considerados como una excelente alternativa, tanto a las moléculas pequeñas*, como a las proteínas y a los anticuerpos como fármacos.

El impacto de los PN en el descubrimiento de fármacos no se circunscribe únicamente a la esfera de los péptidos, sino que por descontado se debe aplicar también a todo tipo de fármacos. Así, el último estudio de Newman y Cragg sobre la fuente de los 1562 fármacos aprobados entre 1981 y 2014 indica que únicamente un poco más de una cuarta parte, 420 (27%), son totalmente sintéticos, siendo el resto más o menos próximos a PN⁷. Así, el 5% son o bien productos naturales inalterados o botánicos (mezcla de hierbas), el 21% son deri-

vados y el 11% mímicos de PN. El 14% son sintéticos, pero su farmacóforo es un PN o un mímico de PN. Por último, el 16% son macromoléculas biológicas y el 6 % son vacunas, ambos se pueden englobar en tener un origen natural. Aunque en los últimos años, se ha visto un renacimiento en el interés de la industria farmacéutica por los PN, muchos analistas atribuyeron a la crisis que tuvo esta industria a finales de siglo pasado al cierre de la mayoría de departamentos internos de PN, que tuvo lugar en los años 80.

En el campo de los péptidos y los PN es interesante resaltar el Ziconotide (Prialt®) que es un péptido de 25 aminoácidos que contiene 6 residuos de Cys formando 3 puentes disulfuro. Es un analgésico 1000 veces más potente que la morfina y fue descubierto por el investigador filipino Baldomero Olivera⁸ a partir del veneno de un cónido (caracol cono marino) de la especie *Conus magus*. Otro péptido procedente de un PN es la Romidepsin (Istodax®) que es un depsipéptido bicíclico, donde a parte del enlace éster tiene un enlace disulfuro. La Romidepsin, que también se ha encontrado en algunas especies marinas, se aisló por primera vez de la bacteria *Chromobacterium violaceum* encontrada en una muestra de suelo en Japón, tiene una potente actividad anti cancerígena ante algunos linfomas no-Hodgkin⁹.

Como péptidos antibióticos de origen natural podemos citar a la Daptomycin, que es un lipodepsipéptido cíclico de 13 aminoácidos, terminado con un ácido decanoico, que fue aislado en el suelo a partir de la actinobacteria *Streptomyces roseosporus* y que se utiliza hospitalariamente para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias que son multirresistentes a varios fármacos; y la Colistin o Polymyxin E, que también es un péptido cíclico y que fue aislado en Japón durante la fermentación de *Bacillus polymyxa* var. *Colistinus* y que se utiliza también para infecciones difíciles de tratar. Otros péptidos antibióticos de origen natural son la Vancomycin y la Oritavancin, que son de la familia de los glicopéptidos. Los cónidos utilizan el péptido que es el principio activo del Ziconotide como mecanismo de defensa. Esta estrategia no es única para esta especie animal, pues también es utilizada por otras, como los anfibios.

Una buena estrategia de diseño de péptidos comienza por determinar los posibles candidatos bioactivos, seguido de la optimización de la secuencia para aumentar la estabilidad y la reactividad de estas moléculas¹⁰. Así el desarrollo de fármacos peptídicos consta de tres etapas fundamentales, primeramente, la extracción del péptido natural que tienen una determinada actividad biológica, luego la síntesis química o expresión recombinante del mismo y las posibles modificaciones químicas para lograr mejores estabilidades o modificado-

***En el contexto de entidades químicas como fármacos, las pequeñas moléculas se definen como aquellos compuestos orgánicos que tienen un peso molecular por debajo de 500 Da y que tienden a cumplir las reglas de Lipinski.**

¹ Decana Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Yachay Tech. Ecuador.

² Profesor. Universidad de KwaZulu-Natal. Durban, Sudáfrica.

³ Profesor. Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería. Universidad Yachay Tech. Ecuador.

nes en la actividad biológica, en donde el diseño racional de péptidos híbridos ha tomado gran importancia. El concepto de péptido híbrido es simple, combina la secuencia de dos o más péptidos diferentes con funciones biológicas variadas, con el objetivo de obtener efectos biológicos más fuertes o novedosos. Los péptidos híbridos han demostrado excelentes potenciales terapéuticos contra enfermedades bacterianas, antitumorales y anti metabólicas¹¹.

La investigación de péptidos está evolucionando cada vez más para expandir la funcionalidad de estos péptidos convencionales mediante el desarrollo de enfoques de diseño de péptidos de *novo*. Estos caminos, a menudo basados en algoritmos de aprendizaje profundo, prometen revolucionar la biología sintética al otorgar a los nuevos péptidos actividades únicas y novedosas (figura 1)¹².

La estabilidad de un péptido se puede predecir fácilmente durante la etapa de diseño del péptido. Sin embargo, su bioac-

cápside de los fagos filamentosos (*Phage display technology*, Premio Nobel 2018)¹⁵. Sin embargo, el formato sintético ofrece muchas ventajas, incluida la facilidad de creación de la biblioteca y la posibilidad de incluir modificaciones y residuos no naturales en el esqueleto del péptido.

Cuando en 1953, Vincent Du Vigneaud describió la síntesis de la primera hormona peptídica activa, la oxitocina, era imposible pensar que un péptido, como, por ejemplo, el Lixisenatide podía llegar al mercado y comercializarse, pues su síntesis requería al menos 89 etapas sintéticas. En aquellos momentos, esta complejidad sintética impedía tener a la escala de multigramos un principio activo peptídico que cumpliera todas regulaciones que desde el punto de vista de pureza las agencias regulatorias requerían para su aprobación. Este cambio en el paradigma se produjo ya muy avanzado el siglo pasado cuando el método de la fase sólida descrito por R. Bruce Merrifield en 1963, premio Nobel de química al igual que Du Vigneaud, se

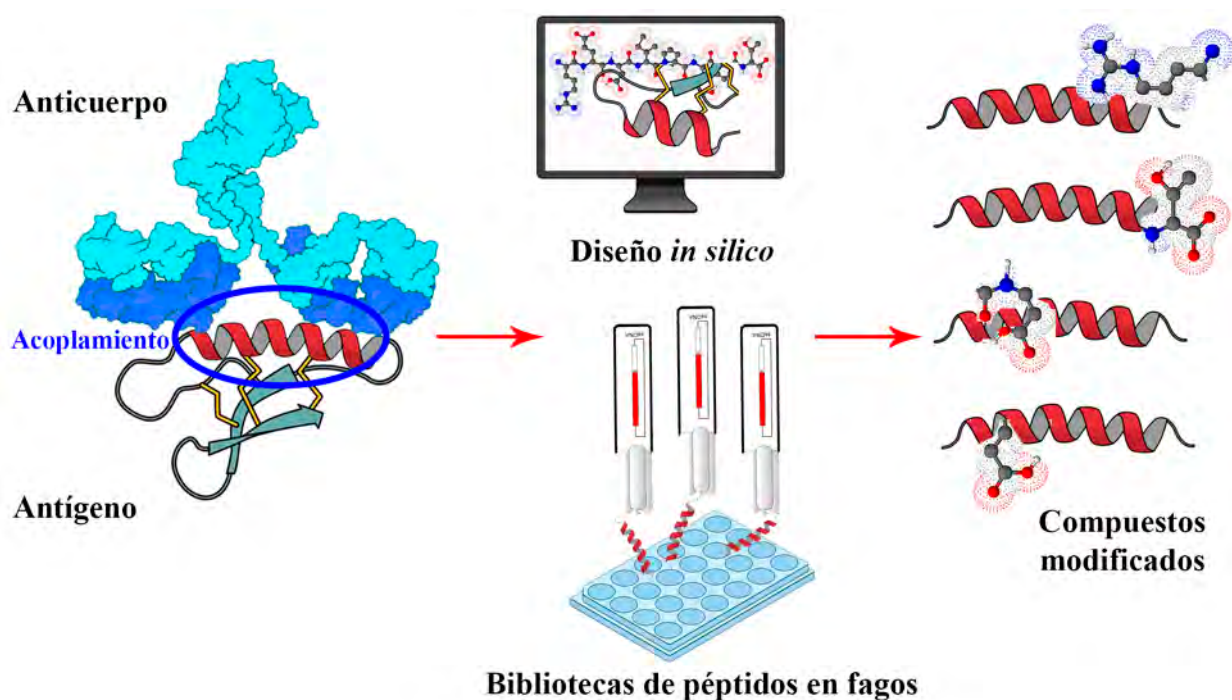


Figura 1. Estrategias para obtener péptidos de mayor actividad biológica contra la molécula blanco basado en la modelación del sitio de acoplamiento entre la molécula blanco (Anticuerpo, Receptor o Proteína) y su ligando biológico (antígeno). Aumento de la afinidad o las características biológicas del antígeno mediante modelación en *silico* o utilizando selecciones sobre la cápsida de los fagos filamentosos hasta la obtención de moléculas con características mejoradas.

tividad es más difícil de estimar. Los softwares de predicción *in silico* se han convertido en una forma cada vez más popular de predecir la bioactividad de los péptidos sintéticos y naturales¹³.

En ausencia de información estructural de la molécula objetivo o blanco, la bioactividad puede ser imposible de predecir utilizando solo métodos *in silico*. En estos casos, a menudo es deseable usar otros métodos para guiar la determinación de proteínas bioactivas potenciales para el diseño de bibliotecas de péptidos. Pero en lugar de usarlos para encontrar el candidato ideal, pueden usarse para diseñar una biblioteca de péptidos con los candidatos más adecuados. Estas bibliotecas, que comprenden una combinación sistemática de un gran número de péptidos diferentes, son compatibles con técnicas de detección de alto rendimiento y, por lo tanto, pueden acelerar el descubrimiento de nuevos péptidos de uso farmacéutico¹⁴.

Las bibliotecas de péptidos pueden generarse sintéticamente o crearse mediante presentación de péptidos en la

refinó y fue adoptado por la industria farmacéutica para la producción de los péptidos listos para el consumo humano.

El método de la fase sólida es conceptualmente muy simple. Consiste básicamente en la utilización de un protector polimérico sólido (resina) para el aminoácido C-terminal y así los siguientes aminoácidos, que llevan protegido el grupo amino y las cadenas laterales, si están funcionalizadas, se van incorporando por sucesivas reacciones de acoplamiento (formación del enlace amida) y eliminación del protector de la función amino. Al permanecer durante todo el proceso, la cadena peptídica que está creciendo unida a un soporte sólido, se pueden utilizar excesos de reactivos, pues estos se eliminan por simples etapas de lavado. De esta forma se consiguen rendimientos para cada etapa cercanos al 100% lo que facilita la etapa de purificación y con ello se asegura la calidad requerida para convertirse en un fármaco. Paralelo al constante desarrollo de este tipo de metodología para aumentar la eficiencia de

la síntesis química de derivados peptídicos de interés farmacológico, surgen alternativas sintéticas para la preparación de secuencias peptídicas complejas, como la síntesis de péptidos asistida por membranas (Membrane Enhance Peptide Synthesis, MEPS), aunque no supera el uso extendido de la Síntesis en Fase Sólida¹⁶.

Los péptidos como fármacos tienen muchas ventajas. Así, por un lado, tienen una alta actividad y especificidad, se acumulan poco en los tejidos, poca toxicidad e inmunogenicidad y una interacción fármaco-fármaco limitada. Como se ha comentado anteriormente, incluso para la etapa de investigación, la síntesis de la mayoría de ellos no es compleja y al tener muchos la accesibilidad de muchos aminoácidos comerciales, permiten realizar programas de química farmacéutica eficientes con gran diversidad química para la identificación del candidato¹⁷.

Por otro lado, tienen algunos inconvenientes: poca estabilidad frente a los enzimas digestivos, lo que hace que la vía oral no es generalmente la más propicia, tienen una vida media reducida en el torrente sanguíneo y al ser relativamente hidrofílicos dificulta el traspaso a través de las membranas cuando esto es requerido para su modo de acción. De todas maneras, los últimos avances en nanotecnologías y administración de fármacos están teniendo un impacto positivo para contrarrestar este problema¹⁸.

El diseño y descubrimiento de péptidos se usa cada vez más para expandir las funcionalidades de los péptidos naturales para múltiples aplicaciones. Estas estrategias deben tener en cuenta tanto la estabilidad del péptido como la bioactividad para obtener los mejores candidatos posibles. Sin embargo, incluso las estrategias de diseño *in silico* más efectivas deberían incluir un paso de validación experimental. Por esta razón, el diseño racional de péptidos y la selección de bibliotecas deben ir de la mano para maximizar la estabilidad y la bioactividad de cada nueva biomolécula.

La importancia ganada por los péptidos gracias a su potencial actividad terapéutica, ha propiciado la creación de redes de colaboración donde tanto la academia como la industria farmacéutica contribuyen a la tarea de convertir los péptidos en prometedoras entidades terapéuticas. Organizaciones científicas y educativas sin fines de lucro como la *American Pep-*

tide Society (1990)¹⁹, o la *European Peptide Society* (1989)²⁰ promueven en su entorno próximo y en los países vecinos el avance de la educación y el estudio científico de la química, bioquímica, biología y farmacología de los péptidos. El surgimiento de estas sociedades son el resultado del rápido crecimiento mundial de la investigación relacionada con los péptidos y de la creciente interacción de los científicos de péptidos con prácticamente todos los campos de la ciencia.

En este contexto nace REDIPEPT (Figura 2), la Red Iberoamericana de Péptidos Terapéuticos, cuyo objetivo fundamental es crear y fortalecer vínculos de colaboración entre grupos iberoamericanos que desarrollan investigación focalizada en la búsqueda, identificación, diseño y síntesis de péptidos y derivados con potencial terapéutico. Los temas de investigación de interés general incluyen síntesis de péptidos de potencial actividad biológica, el aislamiento y la caracterización de nuevos productos, estudios de la relación estructura-actividad, la diversidad molecular, el diseño de *novo*, la administración de fármacos y el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos. Para ello, se generarán Plataformas que incorporen y compartan las fortalezas de los grupos que formen parte de la red, en el diseño y la síntesis de péptidos, así como en la determinación del potencial biológico de estos. Las dianas de interés serán aquellas enfermedades de alto impacto en la salud de los países que conforman la red, con énfasis en enfermedades infecciosas de carácter bacterial o viral (Covid-19, Dengue, Zika, Chikungunya, Chagas, Tuberculosis, entre otras), degenerativas como el Alzheimer, o catastróficas como el cáncer.

Referencias bibliográficas

1. PharmaMar. Boryung Pharmaceutical, socio de PharmaMar en Corea del Sur, anuncia resultados con una potencia superior de plitidepsina (Aplidin®) contra el SARSCoV-2. vol. (5)2 285-299 http://pharmamar.com/wp-content/uploads/2020/07/NdP_Resultados_in_vitro_plitidespina_Corea_OK.pdf (2020).
2. Lorente, A., Makowski, K., Albericio, F. & Álvarez, M. Annals of Marine Biology and Research Bioactive Marine Polyketides as Potential and Promising Drugs. Ann. Mar. Biol. Res. 1, 1-10 (2014).

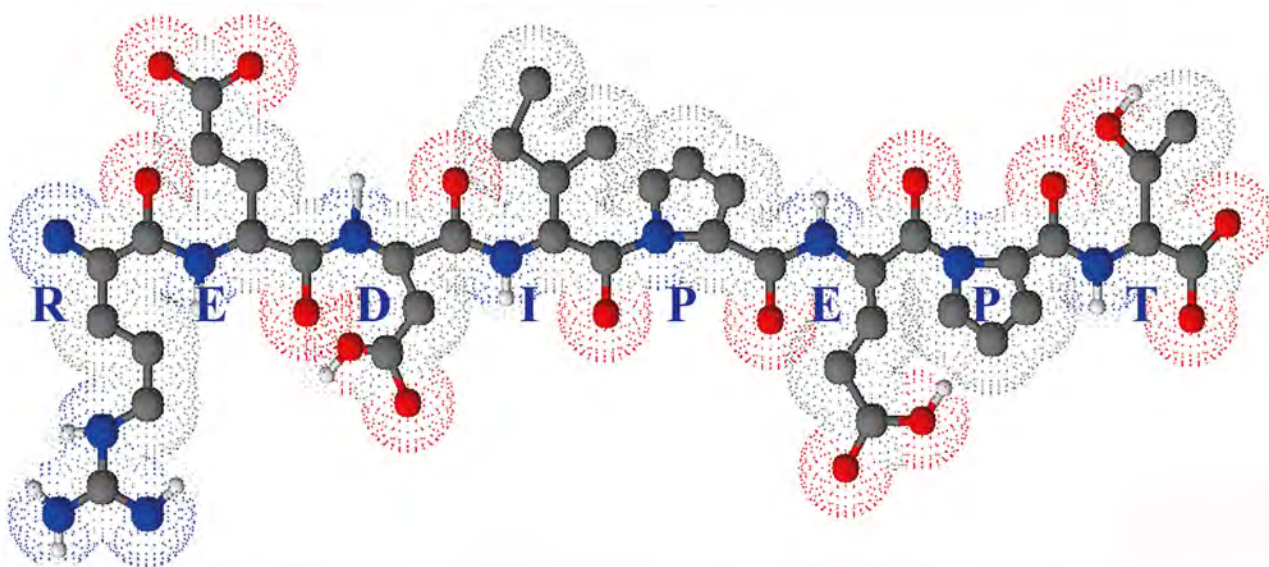


Figura 2. Péptido formado por el código de letras de los aminoácidos que conforman las siglas de la Red Iberoamericana para el Desarrollo de Péptidos Terapéuticos, REDIPEPT

3. Jou, G., Gonzalez, I., Albericio, F., Lloyd-Williams, P. & Giralt, E. Total synthesis of dehydroadipemnin B. Use of uronium and phosphonium salt coupling reagents in peptide synthesis in solution. *J. Org. Chem.* 62, 354–366 (1997).
4. Dolin, G. U.S. food and drug administration. in *Pharmaceutical Public Policy* 105–121 (2016). doi:10.1201/b19633.
5. European Medicines Agency I. <https://www.ema.europa.eu/en>.
6. Bautista Rodríguez, J. Captopril, el potente agente antihipertensivo concebido y desarrollado por un investigador argentino: Miguel Ángel Ondetti. *Cienc. e Investig. Reseñas* 1, 29–33 (2016).
7. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661 (2016).
8. Safavi-Hemami, H., Brogan, S. E. & Olivera, B. M. Pain therapeutics from cone snail venoms: From Ziconotide to novel non-opioid pathways. *J. Proteomics* 190, 12–20 (2019).
9. Vandermolén, K. M., McCulloch, W., Pearce, C. J. & Oberlies, N. H. Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): A natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Antibiotics* vol. 64 525–531 (2011).
10. Ruz, M., Arrero, P. & Albericio, F. Revolución combinatoria. *Combinatoria Molecular* (Elfos Scientiae, 2004).
11. Wang, C., Yang, C., Chen, Y. chen, Ma, L. & Huang, K. Rational Design of Hybrid Peptides: A Novel Drug Design Approach. *Curr. Med. Sci.* 39, 349–355 (2019).
12. Marrero-Ponce, Y. et al. Ligand-based virtual screening and in silico design of new antimalarial compounds using nonstochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 1082–1100 (2005).
13. Marrero-Ponce, Y. et al. LEGO-based generalized set of two linear algebraic 3D bio-macro-molecular descriptors: Theory and validation by QSARs. *J. Theor. Biol.* 485, (2020).
14. Vispo, N. S. *Combinatoria molecular*. (Elfos Scientiae, 2004).
15. Vispo, N. S. Phage display Technology in vitro evolution. Nobel prize 2018. *Revista Bionatura* vol. 3 (2018).
16. Castro, V. et al. Novel Globular Polymeric Supports for Membrane-Enhanced Peptide Synthesis. *Macromolecules* 50, 1626–1634 (2017).
17. de la Torre, B. G. & Albericio, F. Peptide therapeutics 2.0. *Molecules* 25, 2019–2021 (2020).
18. de la Torre, B. G. & Albericio, F. The pharmaceutical industry in 2019. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* 25, (2020).
19. About Us – American Peptide Society. <https://www.americanpeptidesociety.org/about-us/>.
20. About EPS | European Peptide Society. <https://www.eurpepsoc.com/about-eps/>.

LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

Los tratamientos pseudocientíficos en la pandemia de COVID-19: Aplanar la curva de la “infodemia” también salva vidas

Estefanía Espín

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.2

1181

El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció a la COVID-19, enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2, como una pandemia¹. Esta pandemia ha cobrado 640.016 vidas a nivel mundial, según lo reportado oficialmente a la OMS². En paralelo se disemina una epidemia igual de peligrosa para la salud humana, la “infodemia”. Infodemia es un término acuñado para definir el exceso de información, alguna precisa y otra no, durante una epidemia; que pone en riesgo la salud pública³.

La infodemia se extiende de forma acelerada, influenciando en el comportamiento de la población, impidiendo su adherencia a las medidas sanitarias de prevención. El factor amplificador de la infodemia es principalmente el acceso a las redes sociales, cuyo uso se incrementó en un 20-87%, durante la pandemia, a nivel global⁴. La infodemia ha puesto en riesgo la salud humana debido a: 1) la comunicación distorsionada de hechos con evidencia científica débil; y 2) la difusión de teorías pseudocientíficas⁵. En el contexto de una pandemia que amenaza nuestras vidas, en ausencia de una vacuna o tratamiento efectivo, en medio de la constante actualización de la información científica, a medida que conocemos más sobre SARS-CoV-2 y la COVID-19; se ha generado un escenario propicio para la infodemia.

Las voces que se han hecho eco, tanto de información imprecisa, como de pseudociencia, han incluido gobernantes, personajes políticos reconocidos, estafadores con objetivos de lucro, grupos que incitan al odio y personas que especulan o buscan un bálsamo para su ansiedad⁶. La infodemia ha influenciado fundamentalmente sobre el comportamiento social en relación al uso de fármacos o sustancias químicas tóxicas⁵.

Un ejemplo del uso no fundamentado de fármacos es la hidroxicloroquina (HCQ), un medicamento autorizado para el tratamiento de la malaria y enfermedades reumatoideas. El fármaco fue anunciado como un tratamiento efectivo y profilácti-

co para COVID-19, en base a un ensayo clínico con importantes limitaciones metodológicas. En consecuencia, la adquisición masiva de la HCQ de la población, generó desabastecimiento del fármaco para los pacientes con enfermedades reumatoideas. Adicionalmente, se detectaron reacciones adversas severas como intoxicaciones, muertes súbitas por alargamiento del intervalo QT y arritmias, aún en las dosis recomendadas por los médicos⁵. La evidencia disponible en revisiones sistemáticas y meta-análisis concluye que no se ha demostrado eficacia de la HCQ y el alto riesgo de su uso^{9,10}. La OMS no aconseja su uso por el mismo motivo y suspendió el ensayo clínico relacionado^{7,8}. Un caso similar es el de la ivermectina, un anti-helmíntico que también está siendo utilizado para el tratamiento de COVID-19 a pesar de que la OMS desaconseja su uso por falta de evidencia y riesgo de toxicidad^{11,12}.

Por otro lado, y con mayor riesgo para la salud humana se difunden tratamientos pseudocientíficos, con alta toxicidad. En Irán se difundió el uso de brebajes de alcohol para prevenir la infección por SARS-CoV-2, lo que ocasionó la intoxicación con metanol de 2200 personas y la muerte de 296 de ellas¹³. Los autodenominados expertos en salud alternativa han promocionado píldoras, y pociones para “mejorar el sistema inmune”¹⁴. En el Ecuador se ha difundido el uso de dióxido de cloro (CDS) para prevenir y tratar la COVID-19, por parte de la Asociación Ecuatoriana de Médicos Expertos en Medicina Alternativa (AEMEMI), quienes desarrollaron un supuesto ensayo clínico en Guayaquil, carente de metodología y rigor científico, violando los requerimientos regulatorios y bioéticos de la Autoridad Sanitaria Nacional para la investigación en seres humanos. Sin embargo, los representantes de la AEMEMI fueron recibidos por la Comisión de Fiscalización de la Asamblea Nacional, para hablar sobre el uso terapéutico del dióxido de cloro. La comunidad científica ecuatoriana ha alertado a la ciudadanía, a la Asamblea Nacional y a la Autoridad Sanitaria Nacional sobre la toxicidad del dióxido de cloro, la falta de conocimiento



Figura 1. Pandemia de coronavirus en Ecuador.

científico de quiénes promueven su uso, que claramente no tiene sustento científico, pues es un compuesto inerte, que no participa en ningún mecanismo molecular relacionado a la COVID-19; y por el contrario ha causado ya graves intoxicaciones alrededor del mundo^{14,15} y recientemente en ciudadanos bolivianos¹⁶.

La difusión de la pseudociencia, ha incluido también la recomendación de altas dosis de vitamina C y D, debido a su relación con el sistema inmune; a pesar de que no existe evidencia científica de su efectividad en la prevención o recuperación de COVID-19. La única condición en la que son necesarios los suplementos vitamínicos, es en la avitaminosis, considerando que se debe realizar bajo prescripción médica, pues su uso en exceso causa efectos adversos¹⁷.

En este sentido, combatir la infodemia es una intervención urgente y necesaria en la actual crisis sanitaria. La comunicación científica en medio de una pandemia se considera una intervención médica. Este debe ser un esfuerzo conjunto de los gobernantes, la comunidad científica, la comunidad médica y los medios de comunicación.

Las autoridades deben invertir en investigación científica para tomar medidas basadas en evidencia y legitimar a la ciencia como la principal herramienta para combatir una pandemia. Se debe generar una cultura científica en la población para generar inmunidad a la infodemia. Los datos epidemiológicos generados durante la pandemia deben ser de calidad y de libre acceso para garantizar la confianza de la población en las medidas. La comunicación de las medidas debe ser efectiva y rápida, para bloquear la difusión de pseudociencia. La consigna debe ser cero tolerancias a la pseudociencia, no se puede condenar una práctica libre de evidencia en un contexto y legitimarla en otro¹⁸.

La comunidad científica tiene como desafío desmentir la pseudociencia y divulgar información científica, de forma estratégica, conociendo el contexto local, refutando los mitos pseudocientíficos evitando generar rechazo anticipado de la ciudadanía. Las estrategias deben ser variadas y dirigidas a todos los sectores de la población⁵.

Los consejos para la ciudadanía son: preguntarse siempre quién envió la información y cuál es la fuente; si se desconoce la fuente de la información, es mejor no compartirla; reportar los rumores pseudocientíficos; confiar en los científicos y en las organizaciones que velan por la salud humana como la OMS; no confiar en cadenas de WhatsApp; y dirigirse siempre a las fuentes oficiales.

Un actor poco visibilizado en nuestro medio, pero con un rol que podría tener un gran impacto es el farmacéutico que atiende en cada farmacia, pues es quién puede guiar a la población en el uso racional de medicamentos, basado en evidencia científica.

La medicina basada en evidencia debe ser la prioridad en una emergencia sanitaria, que no por urgente, puede perder el rigor científico. Por lo tanto, el manejo de una pandemia debe ser científico, más que político, con el único objetivo de salvaguardar el bienestar y la vida de la gente.

Referencias bibliográficas

1. (World Health Organisation). Coronavirus (COVID-19) events as they happen [Internet]. [cited 2020, July 24]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
2. Organización Mundial de la Salud - OMS. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Internet]. World Health Organization. 2020 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://covid19.who.int/>
3. World Health Organization. 1st WHO Infodemiology Conference [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2020/06/30/default-calendar/1st-who-infodemiology-conference>
4. Naeem S Bin, Bhatti R, Khan A. An exploration of how fake news is taking over social media and putting public health at risk. *Heal Inf Libr J* [Internet]. 2020 Jul 12 [cited 2020 Jul 24];hir.12320. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hir.12320>
5. Tuccori M, Convertino I, Ferraro S, Cappello E, Valdiserra G, Focosi D, et al. The Impact of the COVID-19 "Infodemic" on Drug-Utilization Behaviors: Implications for Pharmacovigilance. *Drug Saf* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 24]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32572842/>
6. Desta TT, Tewodros Mulugeta *. Living with COVID-19-triggered pseudoscience and conspiracies. *Int J Public Health* [Internet]. [cited 2020 July 21]; Available from <https://doi.org/10.1007/s00038-020-01412-4>
7. Organización Panamericana de Salud (PAHO). COVID-19: Chloroquine and hydroxychloroquine research. *Rapid Rev* - March 28th, 2020 [Internet]. 2020 [cited 2020 July 26];1-28. Available from: <https://www.paho.org/en/documents/covid-19-chloroquine-and-hydroxychloroquine-research>
8. Organización Mundial de la Salud-OMS. Ensayo clínico Solidaridad sobre tratamientos contra la COVID-19 [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments>
9. Das S, Bhowmick S, Tiwari S, Sen S. An Updated Systematic Review of the Therapeutic Role of Hydroxychloroquine in Coronavirus Disease-19 (COVID-19) [Internet]. Vol. 40, *Clinical Drug Investigation*. Adis; 2020 [cited 2020 Jul 26]. p. 591-601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32468425/>
10. Singh AK, Singh A, Singh R, Misra A. "Hydroxychloroquine in patients with COVID-19: A Systematic Review and meta-analysis." *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2020 July 1 [cited 2020 July 26];14(4):589-96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32417708/>
11. Chacour C, Hammann F, Ramón-García S, Rabinovich NR. Ivermectin and COVID-19: Keeping rigor in times of urgency [Internet]. Vol. 102, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2020 [cited 2020 July 21]. p. 1156-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32314704/>
12. OPS. Recomendación sobre uso de ivermectina en el tratamiento de COVID-19 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2020 July 24]. Available from: https://www.paho.org/es/documentos/recomendacion-sobre-uso-ivermectina-tratamiento-covid-19?fbclid=IwAR2IR37os_rXzyxTQbbAODeti3WxN-A68QM08oMQTvUGqR2Xq_ZXcCRw6zcy
13. Soltaninejad K. Methanol Mass Poisoning Outbreak: A Consequence of COVID-19 Pandemic and Misleading Messages on Social Media. *Int J Occup Env Med (The IJOEM)* [Internet]. 2020 July 14 [cited 2020 July 24];11(July 3):1983-148-50. Available from: www.thejoem.com
14. Loh JMR, Shafi H. Kikuchi-Fujimoto disease presenting after consumption of "Miracle Mineral Solution" (sodium chlorite). *BMJ Case Rep*. 2014 November 24;2014.
15. Actualización del coronavirus (COVID-19): La FDA advierte a empresa que comercializa productos peligrosos de dióxido de cloro que afirman tratar o prevenir el COVID-19 | FDA [Internet]. [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/actualizacion-del-coronavirus-covid-19-la-fda-advierte-empresa-que-comercializa-productos-peligrosos>
16. Bolivia enjuiciará a los que ofrezcan dióxido de cloro como terapia COVID-19 - Salud con lupa [Internet]. [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://saludconlupa.com/noticias/bolivia-enjuiciara-los-que-ofrezcan-dioxido-de-cloro-como-cura-de-la-covid/>
17. Adams KK, Baker WL, Sobieraj DM. Myth Busters: Dietary Supplements and COVID-19 [Internet]. Vol. 54, *Annals of Pharmacotherapy*. SAGE Publications Inc.; 2020 [cited 2020 Jul 24]. p. 820-6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1060028020928052>
18. Caulfield T. Pseudoscience and COVID-19 — we've had enough already. *Nature*. 2020 Apr 27

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Molecular identification of Shiitake [*Lentinula edodes* Berk (Pegler)] and production of secondary metabolites with biotechnological potentialByron Durán-Rivera¹, Felipe Rojas-Rodas¹, Wilber Silva-López², Christian Gómez-Suárez³, Dagoberto Castro-Restrepo¹

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.3

Abstract: The Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) is the second most-consumed mushroom in the world; in Colombia, it is cultivated and commercialized on a small scale in some supermarkets. Little is known about the precedence, nutritional and medicinal properties of Shiitake produced in Colombia. In this study, four shiitake isolates were grown in Colombia (LEUCO1, LEUCO2, LEUCO3, and LEUCO4) were sequenced in their ITS genes and evaluated for the production of three medicinal metabolites, eritadenine, ergotioneine and β -glucans (1,3-1, 6), using submerged culture. Genetic analysis revealed that all the isolates were close and related to the Japanese strain Cr62. LEUCO1 and LEUCO2 showed a distance of 0.000, as well as LEUCO3 and LEUCO4. All four isolates produced erythadenine in a range of 26.3-8.6 mg / L, with the best performance of LEUCO1 at 26.3 mg / L ($p < 0.05$). Ergotioneine was produced with similar statistical yields in all the isolates with an average of 0.7 mg / g of dry weight biomass (DW). β -glucans (1.3-1.6) were produced with yields of 5.6 - 3.8% of DW biomass, with the best values for LEUCO2 and the lowest for LEUCO4 ($p < 0.05$). In conclusion, we identified low genetic diversity in the four isolates, corresponding to two haplotypes with minimal genetic difference between them, related to the Japanese strain Cr62, indicating that Colombian farmers cultivate almost the same strains of shiitake. Secondary metabolites, eritadenine, β -glucans and ergotioneine were found in promising yields useful for the pharmaceutical and food industries. More studies should be conducted to improve the yield of shiitake metabolites through new growing conditions for industrial production and to find metabolic pathways and related genes.

Key words: Eritadenine, ergotioneine, β -Glucans, ITS genes, Shiitake mushroom.

Introduction

Gourmet shiitake mushroom has been consumed for more than a thousand years in eastern Asiatic countries and has been studied due to the essential medicinal properties¹. The mushroom is mainly cultivated in China, Korea, and Japan, and currently is the second more consumed mushroom in the world, after the mushroom (*Agaricus spp*) with 25 % of total mushroom world production². Most shiitake research has been focused on the medicinal properties, nutritional qualities, and contents of important bioactive substances beneficial to human health. Some known activities are antitumor, immunostimulatory, antibacterial, hypocholesterolemic, and antioxidant³. Some of these shiitake substances are proposed to use in pharmaceutical and food industries⁴.

In Colombia, shiitake cultivation initiated in the 80's decade; since then, the mushroom is increasingly becoming more popular in country⁵. Shiitake is produced in the Andes under tropical weather conditions that are different from the regions where the mushroom is originated. During the last years, the consumption of Shiitake has increased. The mushroom is sold in supermarkets as a fresh product and is used for food and medicine. However, little is known about the genetic origin of Colombian Shiitake, genetic diversity, and parent strains, as well as the contents of bioactive compounds of shiitakes cultured under the tropical conditions of Colombia. Since the genetic instability has been frequently observed in edible mushrooms⁶, environmental conditions might generate genetic and/or biochemical changes and differences in the secondary metabolite profile⁷. These could influence the potential of Colombian shiitakes usability in biotechnological processes, considering that the mushroom potential to produce secondary

metabolites has been already demonstrated⁸.

Different studies have been carried out to establish the genetic characterization of shiitake mushrooms in different countries. Xiao *et al.*⁹ sequenced the whole genome and made a comparison between cultivated and wild strains from China, to evaluate genetic diversity, and George *et al.*¹⁰ used ITS sequences in Shiitake to validate identifications of *L. edodes* strains based on morphology characters. ITS sequencing is very accepted in scientific literature to determine identity, genetic diversity, intraspecific variation with high confidence as a universal barcode marker for fungi kingdom, and prokaryotes in general¹¹. In the case of shiitake mushroom, molecular identification is essential because there are some other *Lentinula* species with similar morphological features, as the edible and tropical American native *Lentinula boryana*¹². Besides, genetic characteristics are determinant in the production of secondary metabolites¹³.

Obtention of secondary metabolites of Shiitake under submerged culture has become a critical biotechnological process for pharmaceutical and food uses⁴. The purine alkaloid eritadenine [2(R), 3(R)-dihydroxy-4-(9-adenyl) butyric acid], is the primary, secondary metabolite responsible for the hypocholesterolemic action of Shiitake, and has been proposed as pharmaceutical ingredient⁴. HPLC quantitation of eritadenine in carpophores of some shiitake strains has been made by Enman *et al.*¹⁴ and Shulei *et al.*¹⁵. Additionally, the production of eritadenine by submerged cultivation of shiitake mycelium have described in different studies with unsatisfactory yields^{16,17}. Recently, new culture techniques have improved the obtention of this metabolite⁸.

¹ Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología Vegetal, Rionegro, Antioquia, Colombia.

² Centro de Ciencia Básica, Grupo de óptica y Espectroscopía, Universidad Pontificia Bolivariana, Colombia.

³ CECIF, Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica, Sabaneta, Antioquia, Colombia.

The secondary metabolite ergothioneine (2-mercaptohistidine trimethylbetaine = ERG) is one of the main antioxidant substances in Shiitake, with potent antioxidant properties for cells and DNA¹⁸, and is antiinflammatory¹⁹. Different authors evaluated ergothioneine contents in many mushrooms^{20, 21}. Additionally, other authors showed interest in establishing adequate cultivation parameters, to enhance the ergothioneine production, in Shiitake mycelium²² and fruitbodies²³.

β -Glucans (1,3-1,6) are anticancer substances conformed by glucose polymer chains, bonded in positions 1-3, and shortly ramified every 3 glucose bonded at 1,6 positions; they contribute significantly to the structure of cell walls in shiitake¹. Contents of β -glucanes (1,3 – 1,6) have been reported by Nitschke *et al*²⁴ in mycelium and carpophores of Shiitake, using a simple spectrophotometric Protocole quantitation with Congo red. Also, Bak *et al*¹ quantitated α and β glucans in ten shiitake cultivars in mycelium and fruitbodies, although, the authors do not mention the conditions used to culture the mycelium. Nevertheless, in literature, it was not possible to find comparisons of β -glucanes (1,3 – 1,6) yields between different strains of Shiitake, even more under submerged cultivation.

The comparison of yields of eritadenine, ergothioneine and β -glucanes (1,3 – 1,6) in various shiitake isolates, could be useful to select strains in biotechnological production of the metabolites. In this study were identified shiitake isolates cultivated in Colombia by sequencing ITS genes and evaluated the production for the secondary metabolites eritadenine, ergothioneine and β -Glucans (1,3-1,6) under submerged culture.

Methods

This experiment was carried out at the laboratory of biotechnology, Universidad Católica de Oriente (Rionegro- Colombia), and institute Centro de la Ciencia e Investigación Farmacéutica (CECIF).

Shiitake cultures propagation

Carpophores of shiitake were obtained at different local markets, from four different producers. These were used to obtain axenic cultures by extracting internal tissue with totipotent cells. Mycelium was propagated on malt extract agar (MEA) in Petri dishes and incubated at 24 °C by twelve days. The isolates obtained were labeled LEUCO1, LEUCO2, LEUCO3, and LEUCO4, and used for genetic characterization and obtention of secondary metabolites.

Genetic characterization of isolates

Identification of the isolates was carried out according to Sha *et al*¹¹. DNA was extracted from every isolate using the Invitrogen Purelink Genomic DNA kit. DNA extracted was quantified by light absorption at 260nm (Nanodrop) and visualized in agarose gel. PCR was performed using the primers 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' and 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' for ITS1 e ITS4 respectively. Both primers amplify fragments containing around 600 bp. Products of PCR were purified with BSA using the QIAquick PCR purification kit. Thereupon, samples were sequenced by the sanger/capillary method, reading both strands to assure reliability. The sequences were cleaned and ensemble using Cap3 and eBioX 1.5.1 software. Finally, sequences were analyzed through nucleotide BLAST® to determine the isolates taxonomically. Phylogenetic trees and distance matrixes were performed by using MEGA 6.0 software, neighbor-joining, and maximal verisimilitude with 500 replicates of bootstrap was used.

Fermentations

Liquid fermentations were set for all the isolates using the broth described by Enman *et al*¹⁶. Broths were composed of yeast extract (2 g/L), malt extract (20 g/L), and glucose (20 g/L) (Merck, Germany). Fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer containing 100 mL of broth, inoculated with six 0.5 diameter disks of mycelium, from MEA solid cultures. After that, the flasks were incubated in an orbital shaker at 24 °C, 120 rpm for 20 days. The biomass obtained was vacuum filtered with number 4 Whatman filter paper, then oven-dried at 40 °C for two days, and used to quantitate ergothioneine and B-glucans (1,3-1,6) in two separated portions. The fermentation broth was used to quantify the eritadenine.

Eritadenine quantitation

Eritadenine was quantitated using the HPLC method described by Enman *et al*¹⁶. An Agilent Technologies 1200 Series apparatus, equipped with a c18 column, was used. The mobile phase was composed of a gradient of acetonitrile, changing from 2% to 60% during the first 10 minutes and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) from 60% to 2%, from 10 to 11 minutes (Merck, Germany). The temperature was set at 23 °C, with a detection wavelength at 260nm. The quantifications were determined using a calibration curve with eritadenine standard, as reference (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Ergothioneine quantitation

Extraction and quantitation of ergothioneine were done according to Dubost *et al*²⁵ with few modifications. The dry mycelium was ground to a fine powder with a mortar and pestle, then MEOH was added in a proportion of 1:5 (w/v), and incubated during 24 h at room temperature (18 °C average) in darkness. The mixture was filtered, and the clear methanol extract was used directly for HPLC quantification. Samples were injected through a c18 column (4.6mm x 150 mm, Merck) mounted on an Agilent series 1200 apparatus, at 23 °C, 1.0 mL/min with a MeCN gradient, starting with 2% during the first 5 min, changed to 80% from 5.1 to 10 min, then finally set again to 2% from 10 to 20 min. Values obtained were compared against a calibration curve constructed with the authentic standard substance (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

β -Glucans (1,3-1,6) quantitation

β -Glucans were analyzed in all the isolates by three successive extractions in the same sample, according to the procedure of Nitschke *et al*²⁴. Extractions were as follows: 1) KOH fraction was obtained by extracting the pulverized-dried mycelium with 1M KOH, in a proportion of 40:1 (w/v) with stirring, during 20 min at 60 °C. The extract was cooled down, filtered, neutralized with 6M HCl to pH=7.0, and adjusted to 100 mL with distilled water; 2) HCl fraction was obtained using the filtered cake from the last extract, suspended in 0.55 M HCl, and heated at 100 °C for 1h. The extract was filtered and the filtrate neutralized with 6M NaOH to pH=7.0 and adjusted to 100 mL with distilled water; 3) NaOH fraction, was obtained from filter cake, extracted in 1M NaOH at 60 °C for 20 min, then was cooled down, filtered, neutralized with 6M HCl to pH=7.0, and adjusted to 100 mL with dH₂O.

The quantification of β -Glucans (1,3 →1,6) was performed using the spectrophotometric method with congo red, developed by Nitschke *et al*²⁴. Into the spectrophotometric (spectroquant Pharo 400, Merck, Germany) cuvette, were put 700 μ L of fungal extract, 700 μ L of Citric acid Buffer (0,2M Citric acid/NaOH, pH=7, Merck, Germany), and 100 μ L of Congo

red solution (0.08 g in the citric acid buffer, Merck Germany). Absorbance was read at 553 nm, and the β -Glucans (1,3-1,6) concentration was determined using a calibration curve constructed with a series of solutions of standard schizophyllan (InvivoGen, USA). β -Glucans (1,3-1,6) found in the three extracts were added and expressed as total β -Glucans (1,3-1,6) in % of the dry weight of mycelium.

Statistics

Every metabolite was studied by random experimental design with four treatments (isolates) by triplicate, then data were analyzed by ANOVA (Tukey test), or Kruskal-Wallis (Dunn posthoc test) with R studio 4.0.2 of 2020.

Results and discussion

Genetic characterization

We could establish the identity of four shiitake mushrooms of unknown origin cultivated in Colombia by sequencing two ITS genes. PCR products from the isolates were purified, visualized with electrophoresis and sequenced for ITS1 and ITS4 genes (Figure 1a). The sequences obtained were 649 bp long in all four isolates, identified as *Lentinula edodes* species, and were compared with the elite strain Cr62 from genebank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Genetic distance values were generated along with a Neighbor-Joining phylogenetic tree (Figure 1, B and C).

ITS sequences revealed profound differences between isolates (matrix fig. 1 B). The sequences were gathered in two

homolog groups (haplotypes) 1) LEUCO1-LEUCO2 and 2) LEUCO3-LEUCO4, with 0.000 distance in between, close to the elite strain Cr62. Distances between Cr62 and the isolates were equally low. The first group had a difference of 0.15% with the strain Cr62, with one base substitution and one deletion. The second had a difference of 1.57%, nine bases substitution in a different order, and two deletions. Contradictorily, Sha *et al*¹¹, found a variation of up to 138 bases in wild samples of the gourmet mushroom *Thelephora ganbajun* from china. These resulting distances confirm a low genetic diversity in the evaluated isolates. Additionally, Nilsson *et al*²⁶ found from an exhaustive reviewing of sequences covering the fungi kingdom, an average intraspecific variability of 2.51% based on ITS sequences. Accordingly, Xiao *et al*⁹ found a reduced genetic diversity in Chinese shiitake cultivars compared to wild strains, probably caused by human selection and breeding.

Eritadenine assay

All four isolates produced eritadenine (8.6 - 26.3 mg/L). Best yields were attained by LEUCO1 (26.3 mg/L), with statistical differences with the rest of isolates (Table 1). Here, yields were higher than those published by other authors^{16,17} with maximal yields of 8.6 and 25 mg/L, using broths of complex nutritional composition, and lower than 88mg/L obtained in other experiments with alginate immobilization⁸.

Few reports exist in the literature related to the obtention of eritadenine by different shiitake strains in submerged culture. Enman *et al*¹⁴, found in carpophores of four shiitake strains maximal yield of 6.33 mg/g, with no significant statistical differences, also Shulei *et al*¹⁵ reported 1.99 mg/g in carpophores, without mentioning the strain. Both authors did not report the

Isolate	Eritadenine mg/L	Total β -glucanes 1,3-1,6 DW %	Ergothioneine mg/g DW	pHf	Biomass g/L
LEUCO1	26.3 $\pm$ 1.4 a	4.78 $\pm$ 0.4 ab	0.73 $\pm$ 0.04 a	3.28 $\pm$ 0.03 a	1.21 $\pm$ 0.04 a
LEUCO2	13.2 $\pm$ 1.3 b	5.61 $\pm$ 0.8 a	0.72 $\pm$ 0.08 a	3.40 $\pm$ 0.2 a	1.82 $\pm$ 0.06 ab
LEUCO3	13.3 $\pm$ 0.1 b	4.33 $\pm$ 0.4 bc	0.62 $\pm$ 0.2 a	3.43 $\pm$ 0.2 a	1.92 $\pm$ 0.07 b
LEUCO4	8.6 $\pm$ 0.1 c	3.81 $\pm$ 0.2 c	0.76 $\pm$ 0.06 a	3.52 $\pm$ 0.2 a	1.89 $\pm$ 0.07 b

Table 1. Yields of metabolites on average after 20 days of submerged fermentation with shiitake mycelium.

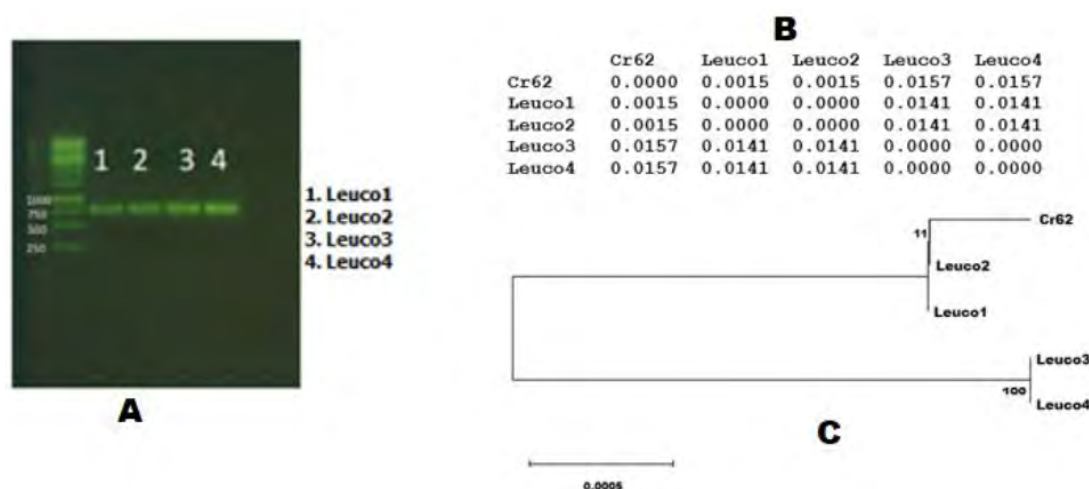


Figure 1. Genetic characterization to the isolates. A: purified products of PCR; B: Distances matrix between the isolates, and C: Phylogenetic tree for all four isolates together with Cr62 elite shiitake strain.

methods used to produce the carpophores, then possibly, the differences were not only due to genetic differences but also to cultivation conditions, as samples were obtained from different producers. The latter probably used different environmental and nutritional conditions.

Here we have three groups of shiitake isolates (LEUCO1, LEUCO4, and LEUCO2-LEUCO3) that express eritadenine genes at different levels. Seemingly those differences in eritadenine expression do not have a clear relationship with the distances obtained (Fig 1), which could be a logical assumption as ITS genes do not encode for enzymes, then do not participate in eritadenine biosynthesis pathway. Accordingly, Schwessinger *et al*²⁷ found gene expression variation of 6% in *Puccinia striiformis*, which occur in dikaryotic isolates (diploids) with sexual reproduction, as the Shiitake isolates evaluated in the present research. Also, the production of purine precursors to eritadenine (AICAR and SAICAR) from the inosine monophosphate (IMP) pathway, are expressed in different levels by different strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and those genes are activated in yeast by adding adenine to the nutritional medium²⁸. As eritadenine pathway is not understood¹⁷, future research studies should be directed to identify genes related to eritadenine biosynthesis²⁷.

β-glucans (1,3 – 1,6)

All four isolates produced β-glucans in a range from 3,8% to 5,6 % of DW of mycelium. LEUCO2 produced the higher yields, without statistical differences with LEUCO1. On the other hand, LEUCO4 produced the lowest yields, without statistical differences with LEUCO3 (Table 1). LEUCO2 produced slightly more than twice β-glucans (1,3 – 1,6) the yields reported by Nitschke *et al*²⁴. This author obtained 2,58 g/100 in shiitake mycelium, using the same extraction and quantitation protocols than this experiment. Nonetheless, the strain name was not reported, and the cultivation conditions were broths of yeast and malt extracts, at 80 rpm (different than used in this experiment).

Likewise, other studies reported differences in β-glucans contents in different cultivars of shiitake mushroom¹ and in *Agaricus subrufescens*²⁹. These differences in β-glucans (1,3 – 1,6) yields were probably due to the homeostasis between β-(1,3)-glucan synthase, the primary enzyme responsible for fungal cell wall construction³⁰. And the β-glucans destructive counterparts β-(1,3)-glucanases³¹. In Shiitake, various glucanases coding genes have been identified, which are upregulated in postharvest shiitake fruiting, leading to the autolysis of cell wall^{32,33}.

In *Lentinula edodes* composition of the cell wall is well known, mainly consisting of polysaccharides like chitin and β-glucanes². Those are synthesized by the enzyme β-(1,3)-glucan synthases that have a catalytic subunit FKS, plus a regulatory one RHO, both encoded by FKS and RHO genes³⁴. However, there is inadequate knowledge about the transcriptional regulation of this enzymatic biosynthesis³⁴. We hypothesize that nutrition and environmental conditions used in this experiment, especially the glucose concentration of the broth, produced a positive balance in favor of β-(1,3)-glucan synthase activity in LEUCO2 (the more productive isolate), but not for LEUCO4.

Ergothioneine assay

All isolates produced similar ergothioneine yields, ranging from 0,62 to 0,75 mg/g DW of mycelium, with an average of 0,7 mg/g, to all the isolates. These concentrations did not show significant statistical differences between isolates but were higher than the concentrations reported by Tepwong *et*

*al*²², who found 0.5 mg/g for Shiitake mycelium pellets in submerged culture. And seventeen times higher than the yields reported by Jang *et al*²³ who used Shiitake submerged cultures supplemented with various nitrogen sources. Unexpectedly, the isolates used in this experiment contained eight times more ergothioneine than the body fruiting of the popular *Ganoderma lucidum*²¹.

Few reports in literature compare ergothioneine content in different strains of edible mushrooms related to Shiitake. Contrary to this research, Chen *et al*²⁰ found different ergothioneine concentrations in the mycelium of three strains of *Cordyceps militaris*, and in three commercial carpophores of *Pleurotus ostreatus* from China, Korea, and Japan. However, the authors do not report cultivation methods to obtain carpophores or mycelium; then, it is possible to speculate that differences are related to the possible different cultivation conditions. Hence, to obtain accurate comparisons, fungal cultures for chemotaxonomic analysis should be grown in the same medium and incubation conditions, to ensure that differences correspond to fungal genetic diversity and not to environmental conditions³⁵.

Nitrogen source is critical for ergothioneine biosynthesis, amino acids like cysteine, methionine, and histidine are precursors of the substance³⁶. By adding methionine to liquid broths, ergothioneine yields are increased up to twice, compared to fermentation without the addition of aminoacids³⁷. This is due to histidine is a precursor of ergothioneine^{22,37}. Then the low ergothioneine yields obtained in this experiment were probably due to the lack of precursor amino acids in the yeast extract used. For instance, Lin *et al*³⁸ found in submerged cultures of *Pleurotus citrinopileatus* a higher ergothioneine yield 10.65mg/g, by using tryptone instead of yeast extract. Probably tryptone contains 1.6% of methionine, while yeast extracts only 0.8%. In this sense, we hypothesized that the use of nitrogen sources rich in the amino acids mentioned above might improve ergothioneine yields produced in the shiitake isolates of this experiment.

Biomass production and final pH obtained in fermentations

All four isolates produced biomass after twenty days of fermentation in a range from 1.21 to 1.92 g/L. LEUCO2, LEUCO3, and LEUCO4 produced the higher biomass (1.82, 1.92, and 1.89 g/L respectively) without significant statistical differences between them. At the same time, LEUCO1 produced the lowest value (1.21g/L), statistically similar to LEUCO2. Accordingly, shiitake strains show different utilization of nutritional components in liquid broths, which affects biomass yields. This was demonstrated by López-Peña *et al*³⁹, who found two high biomass producing strains 3.73 g/L and 8.79 g/L, from six evaluated. In this sense, the differences between the isolates could be attributed to incubation temperature (24 °C). Probably this temperature was not optimal for the isolate LEUCO1 and LEUCO2. According to Lee *et al*⁴⁰, every strain has an optimum growth temperature. For instance, Quaique *et al*⁴¹ found different radial growth in three shiitake strains at 20 °C, cultured in potato dextrose agar (PDA).

On the other hand, final pH had statistically similar values in fermentations of all isolates, ranging from 3.28 to 3.52. Different authors found similar pH at the end of fermentations, Enman *et al*¹⁷, obtained a final pH of 3.5-3.6 for Shiitake under submerged culture, with eritadenine yields of 25 mg/L. The same authors established that optimal pH for eritadenine production could be in a range from 3 to 4. Likewise, Quaique *et*

*al*⁴¹ established a pH range from 3 to 4 as optimal for shiitake mycelium growth at *in vitro* culture. According to the above authors, our four shiitake isolates of this experiment reduced the pH to the expected values of optimal growth. Nonetheless, there is not enough evidence about the effect of pH on eritadenine, ergothioneine, and β -glucans yields. Even more, for eritadenine production with Shiitake, variables that produce good biomass growth are not necessarily the same to produce high metabolite yields¹⁷.

Finally, after 20 days of fermentation, all isolates produced biomass in the form of well-defined pellets. The 120-rpm agitation promotes this growth morphology. Similarly, other studies obtained pellets of shiitake mycelium under submerged culture, at the same agitation values [42,37]. Growth morphology insides on metabolites production, shiitake pellets produce higher yields of ergothioneine compared to cultures with no pellets formation.

Conclusions

In this investigation, we identified low genetic diversity in the four shiitake isolates examined, which correspond to the fungi most commonly produced in Colombia. These findings allow us to conclude that the four isolates formed two haplotypes LEUC01-LEUC02 and LEUC03-LEUC04 with little genetic difference between them, but related to the elite Japanese strain Cr62. All strains produced the pharmaceutical metabolites eritadenine in a promising concentration for industrial use: β -glucans (1-3, 1-6) and ergothioneine. LEUC01 was more suitable for the production of eritadenine, while LEUC01, 2, and 3 were more suitable for producing β -glucans. Furthermore, all four isolates produced the same amounts of ergothioneine. Finally, biomass was better produced by LEUC02, 3 and 4. Further research could be aimed at improving shiitake metabolite yields and optimizing culture and incubation systems, for industrial production, and finding metabolic pathways and genes related.

Acknowledgements

Authors want to be thankful to investigación & Desarrollo at Universidad Católica de Oriente, to CECIF (Centro de la ciencia y la investigación farmacéutica). Both institutions supported enthusiastically the research, and to Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez who collaborated us with the genes sequences analysis.

Bibliographic references

- Bak WC, Park JH, Park YA, Ka KH (2014) Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. *Mycobiology* 42(3): 301-304. doi: 10.5941/MYCO.2014.42.3.301
- Jiang T, Wang Q, Xu S, Jahangir MM, Ying T (2010) Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. *J Sci Food Agric*. 90:742-749. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3876>
- Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad GBKS (2010) *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Curr Med Chem*. 17: 2419-2430. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491636>
- Enman J, Patra A, Ramser K, Rova U, Berglund KA (2011) Solid State Characterization of Sodium Eritadenate. *Am. J. Anal. Chem* 2:164-173. DOI: 10.4236/ajac.2011.22019
- Romero-Arenas O, Martínez GM, Damián MA, Ramírez B, López-Olguín F (2015) Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* 6(6): 1229-1238. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n6/v6n6a7.pdf>
- Mallick P, Sikdar SR (2015) Genome instability in fruit body derived lines generated from fruiting pfl somatic hybrid lines and development of hybrid strain specific scar marker in edible mushroom. *J. Hort. Res* 23(2): 111-120. DOI: 10.2478/johr-2015-0022
- Torres S, Cabrera-pardo J, Alonso f, Bustos E, Pérez C, Palfner G, Hernández V, Uriarte E, Becerra J (2016) Changes in secondary metabolites profiles and biological activity of the fresh fruiting bodies of *stereum hirsutum* exposed to high-dose uv-b radiation. *J. Chil. Chem. Soc* 61(4): 3224-3227. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072016000400015>
- Duran-Rivera B, Moreno-Suarez J, Rojas RF, Valencia KM, Castro-Restrepo D (2018) Enhancement of eritadenine production using three carbon sources, immobilization and surfactants in submerged culture with shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) (Berk.) Singer. *Afr. J. Food Sci* 12(12): 374-382. DOI: 10.5897/AJFS2017.1654
- Xiao Y, Cheng X, Liu J, Li C, Nong W, Bian Y, Kit MC, Shan HK (2016) Population genomic analysis uncovers environmental stress-driven selection and adaptation of *Lentinula edodes* population in China. *Sci. Rep.* 6(36789):1-12. <https://doi.org/10.1038/srep36789>
- George PL, Sripathi VR, Nyaku ST, Sharma GC, Kantety RV (2016) DNA-based identification of *Lentinula edodes* strains with species-specific primers. *Afr. J. Biotechnol* 15(7):191-198. DOI: 10.5897/AJB2015.15089
- Sha T, Xu J, Palanichamy GM, Zhang H-B, Li T, Zhao Z-W, Zhang Y-P (2008) Genetic diversity of the endemic gourmet mushroom *Thelephora ganbajun* from southwestern China. *Microbiology* 154: 3460-3468. DOI: 10.1099/mic.0.2008/020495-0
- Gaitán-Hernández R, Salmones D (2015) Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* 6(7):1639-1652. DOI: 10.29312/remexca.v6i7.556
- Pandit SS, Lohmar JM, Ahmed S, Etchebest O, Espeso EA, Calvo AM (2018) UrdA Controls Secondary Metabolite Production and the Balance between Asexual and Sexual Development in *Aspergillus nidulans*. *Genes* 9(570): 1-23. DOI: 10.3390/genes9120570
- Enman J, Rova U, Berglund K (2007) Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *J Agric Food Chem* 55: 1177-1180. DOI:10.1021/jf062559+
- Shulei W, Jingyu L, Qingjiu T, Yangfang L, Shuai Z, Yan Y, Jingsong Z (2011) Determination of Eritadenine in *Lentinula edodes* Fruit bodies Using HPLC. *Acta edulis fungi* 18(2): 52-56. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SYJB201102014.htm
- Enman J, Hodge D, Berglund KA, Rova U (2008) Production of the Bioactive compound Eritadenine by Submerged Cultivation of Shiitake (*Lentinus edodes*) Mycelia. *J Agric Food Chem* 56: 2609-2612. DOI:10.1021/jf800091a
- Enman J, Hodge D, Berglund KA, Rova U (2012) Growth promotive conditions for enhanced eritadenine production during submerged cultivation of *Lentinus edodes*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 87(7): 903-907. <https://doi.org/10.1002/jctb.3697>
- C, oyan K, Numan BM, Baspinar N, Taspinar M, Aydos S (2012) Ergothioneine attenuates the DNA damage of post-thawed Merino ram sperm. *Small Ruminant Res* 106:165-167. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.002>
- Laurenza I, Colognato R, Migliore L, Del Prato S, Benzi L (2008) Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: evidence of an anti-inflammatory action. *Biofactors* 33:237-47. <https://doi.org/10.1002/biof.5520330401>
- Chen SY, Ho KJ, Hsieh YJ, Wang LT, Mau JL (2012) Contents of lovastatin, g-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT-Food Sci Technol* 47: 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.019>
- Lee WY, Park E-J, Ahn JK, Ka K-J (2009) Ergothioneine Contents in Fruiting Bodies and Their Enhancement in Mycelial Cultures by the Addition of Methionine. *Mycobiology* 37(1): 43-47. doi: 10.4489/MYCO.2009.37.1.043
- Tepwong P, Giri A, Sasaki F, Fukui R, Ohshima T (2012a) Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound. *Food Chem* 131: 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.070>

23. Jang Y, Park J, Ryoo R, Park Y, Ka K-H (2016) Ergothioneine Contents of Shiitake (*Lentinula edodes*) Fruiting Bodies on Sawdust Media with Different Nitrogen Sources. *Kor. J. Mycol* 44(2): 100-102. DOI: <http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.2.100>
24. Nitschke J, Modick H, Busch E, von Rekowski RW, Altenbach H-J, Mölleken H (2011) A new colorimetric method to quantify b-1,3-1,6-glucans in comparison with total b-1,3-glucans in edible mushrooms b-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chem* 127:791-796. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.149
25. Dubost NJ, Beelman RB, Royse DJ (2007) Influence of selected cultural factors and postharvest storage on ergothioneine content of common button mushroom *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach (*Agaricomycetideae*). *Int. J. Med. Mushrooms* 9:163-176. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v9.i2.70
26. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol Bioinform* 4:193-201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614188/>
27. Schwessinger B, Sperschneider J, Cuddy W, Garnica D, Miller M, Taylor J, Dodds P, Figueroa M, Parck R, Rathjen J (2018) A Near Complete Haplotype-Phased Genome Of The Dikarotic Wheat Stripe Rust Fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Reveals High Interhaplotype Diversity. *Mbio* 9(1): e02275-17. DOI: 10.1128/mBio.02275-17
28. Rebora K, Laloo B, Daignan-Fornier B (2006) Revisiting Purine-Histidine Cross-Pathway Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: A Central Role for a Small Molecule. *Genetics* 170: 61-70. DOI:10.1534/genetics.104.039396
29. Clemente TRC, Andrade CM, Oliveira LLC, Barros V-BV, de Souza DE (2013) Measurement of β -glucan and other nutritional characteristics in distinct strains of *Agaricus subrufescens* mushrooms. *African Journal of Biotechnology* 12(43): 6203-6209. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13024>
30. Orlean P (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* 192(3): 775-818. DOI: 10.1534/genetics.112.144485
31. Bauermeister A, Giese E-C, Borsato D, Rezende M-I, Dekker F-H, Barbosa A-M (2017) Filamentous Fungal Biomass as Inducer of Extracellular B-1,3-Glucanases and B-Glucosidases by *Aureobasidium Pullulans* 1WA1". *ECMI* 5(4): 138-147. <https://www.econicon.com/ecmi/pdf/ECMI-05-0000142.pdf>
32. Sakamoto Y, Nakade K, Sato S, Yoshida K, Miyazaki K, Natsume S, Konno N (2017) *Lentinula edodes* Genome Survey and Postharvest Transcriptome Analysis. *Appl Environ Microbiol* 83(10): e02990-16. DOI: 10.1128/AEM.02990-16
33. Konno N, Nakade K, Nishitani Y, Mizuno M, Sakamoto Y (2014) Lentinan Degradation in the *Lentinula edodes* Fruiting Body during Postharvest Preservation Is Reduced by Downregulation of the exo- β -1,3-Glucanase EXG2. *J Agric Food Chem* 62: 8153-8157. DOI: dx.doi.org/10.1021/jf501578w.
34. Chai R, Qiu C, Liu D, Qi Y, Gao Y, et al (2013) β -Glucan Synthase Gene Overexpression and β -Glucans Overproduction in *Pleurotus ostreatus* Using Promoter Swapping. *PLoS ONE* 8(4): e61693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061693>
35. Frisvad JC, Andersen B, Thrane U (2008) The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol Res* 112: 231-240. DOI:10.1016/j.mycres.2007.08.018
36. Pluskal T, Ueno M, Yanagida M (2014) Genetic and Metabolomic Dissection of the Ergothioneine and Selenoneine Biosynthetic Pathway in the Fission Yeast, *S. pombe*, and construction of an Overproduction System. *PLOS ONE* 9(5): 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0097774
37. Tepwong P, Giri A, Ohshima T (2012b). Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 53:102-112. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0145-0>
38. Lin S-Y, Chien S-C, Wang S-Y, Mau J-L (2015) Submerged Cultivation of Mycelium with High Ergothioneine Content from the Culinary- medicinal Golden Oyster Mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms* 17(8): 749-761. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i8.50
39. López-Peña D, Gutiérrez A, Esqueda M (2013) Cinética de crecimiento y composición química del micelio de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid. *Rev. Mex. Mic* 37: 51-59. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a7.pdf>
40. Lee S, Bae H, Kim N, Hwang S (2008) Optimization of Growth Conditions of *Lentinula edodes* Mycelium on Corn Processing Waste Using Response Surface Analysis. *J Biosci Bioeng* 105(2): 161-163. DOI: 10.1263/jbb.105.161
41. Quacoe EH, Amoah C, Obodai M, Odamtten GT (2014) Nutrient requirements and environmental conditions for the cultivation of the medicinal mushroom (*Lentinula Edodes*) (Berk.) in Ghana. *IJSTR* 3(12): 45-50. <http://www.ijstr.org/final-print/dec2014/Nutrient-Requirements-And-Environmental-Conditions-For-The-Cultivation-Of-The-Medicinal-Mushroom-lentinula-Edodes-berk-In-Ghana.pdf>
42. Ting LTC, Tsao HH, Wang AY, Chang CA (2007) Pressurized Water Extraction of Polysaccharides as Secondary Metabolites from *Lentinula edodes*. *J Agric Food Chem* 55: 4196-4201. DOI: 10.1021/jf070035j

Received: 7 July 2020
Accepted: 7 agosto 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Enriquecimiento proteico de *Solanum tuberosum* mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*

Protein enrichment of *Solanum tuberosum* by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*

Berenize Fonseca Lilibeth, Danae Fernández, Dario López Orestes

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.4

Resumen: Los residuos de cáscara de papa se han incrementado debido al alto consumo del tubérculo, no obstante, los avances biotecnológicos permiten usar estos desechos y generar otros mejorados generalmente a través de una fermentación con ayuda de microorganismos como *Aspergillus niger*. En este trabajo se evaluó la influencia del tiempo de fermentación (5 – 8 días), la velocidad de agitación (0 – 60 rpm) y la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio) sobre la concentración de biomasa y proteína a través de un diseño factorial 2³. El análisis estadístico determinó que los factores con mayor influencia sobre las variables respuestas analizadas fueron la velocidad de agitación y la concentración del inóculo con sus máximos niveles: 60 rpm y 50000 conidios/g de medio respectivamente. Se maximizaron las variables respuestas con valores de 16,31 mg/mL para la concentración de proteína y 0,94 g/mL para la concentración de biomasa.

Palabras clave: Fermentación en estado sólido, *Aspergillus niger*, enriquecimiento proteico.

Abstract: Potato peel residues have increased due to the high consumption of the tuber; however, biotechnological advances allow us to use these wastes and generate others that are generally improved through fermentation with the help of microorganisms such as *Aspergillus niger*. In this work, the influence of the fermentation time (5 - 8 days), the stirring speed (0 - 60 rpm) and the concentration of the inoculum (5000 and 50000 conidia / g of medium) on the concentration of biomass and protein were evaluated through a factorial design 2³. The statistical analysis determined that the factors with the most significant influence on the analyzed response variables were the stirring speed and the concentration of the inoculum with its maximum levels: 60 rpm and 50000 conidia / g of the medium, respectively. The response variables were maximized with values of 16.31 mg / mL for the protein concentration and 0.94 g / mL for the biomass concentration.

Key words: Solid-state fermentation, *Aspergillus niger*, protein enrichment.

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L) es uno de los tubérculos más frecuentes dentro de la canasta básica ecuatoriana; particularmente la variedad Superchola¹. Su crecimiento es óptimo a una altitud de 2800 a 3600 m², posee una alta demanda en el mercado y su principal uso radica en la industria alimenticia³, sin embargo, la acumulación de sus desechos se ha convertido en una problemática⁴. La cáscara de la papa es desprendida del tubérculo representando aproximadamente el 2% del volumen total comestible y se acumula a razón de 2 kilogramos por cada 100 kilogramos de papa procesada en el país de Perú⁴.

Los cultivos en estado sólido se caracterizan por contener el sustrato transformado por el microorganismo en estado sólido y no en solución o suspensión como ocurre en una fermentación líquida⁵. El objetivo de la fermentación es el aumento parcial del contenido proteico de los sustratos, mejorando las posibilidades de conservación, cambio de las características físicas y químicas, el color, el olor o el sabor⁶. Existen dos tipos de fermentación sólida. El primer tipo es aquel donde el material sólido actúa como principal fuente de nutrientes y como soporte físico del microorganismo al mismo tiempo. El segundo tipo, es en el que el material sólido actúa únicamente como soporte o anclaje del microorganismo y para su cultivo se adiciona una solución nutritiva⁷.

Aspergillus niger es un hongo que produce un moho negro en vegetales, es muy común en lechuga, tomate, acelga y limón. Es una especie de hongo inocuo para los seres humanos

y también para la mayoría de los cultivos⁸. La producción de ácido cítrico a gran escala es el principal uso que se le da a este microorganismo, sin embargo, empiezan a desarrollarse nuevas líneas en las que se maximiza la producción de macronutrientes, enzimas y otros metabolitos de amplio interés industrial^{9,10,11}.

El objetivo de este estudio fue obtener un incremento proteico en la cáscara de papa mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*.

Materiales y métodos

Obtención del sustrato

Se recolectaron los residuos de cáscara de papa (variedad Superchola) y fueron transportados hacia los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) radicada en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Las cáscaras fueron lavadas con agua potable y cortadas en trozos de 5-7 cm de longitud. Posteriormente, se sometieron a un proceso de secado por aspersión durante 48 horas a una temperatura de 50 °C en un horno de bandejas (GANDER MTN). Se utilizó un molino de cuchilla (Baumgarten Porta Westfalica) para obtener la harina⁵.

Proceso de fermentación

Se pesaron 150 g de la harina y se sometió a un proceso de esterilización en una autoclave (H1-CLAVE). Se enfrió y se colocó en bandejas a una temperatura de 25 °C, humedad de 60-65% y pH alrededor de 5 a 6. La fermentación se realizó en un agitador orbital (Incu-Shaker mini).

Los factores evaluados fueron: la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio), tiempo de incubación (5 y 8 días) y la velocidad de agitación (0 y 60 rpm). Las variables respuestas analizadas correspondieron a la concentración de biomasa y concentración de proteína.

Determinación de la concentración de biomasa

Para la determinación de la concentración de biomasa se pesaron tres tubos de centrifuga limpios y secos. En la bandeja de fermentación se mezcló la muestra con ayuda de una espátula estéril y se colocó dentro de cada tubo una cantidad equivalente a 5 mL y fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos con una centrífuga (Rotina 380- Hettich Zentrifugen). Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar tres lavados continuos, cada lavado con 2 mL de agua destilada y centrifugados con las condiciones antes mencionadas.

Se colocaron los tubos dentro de una estufa (Precision-Thermo Scientific) a 70 °C durante 24 horas para eliminar la humedad, y se registró el valor para realizar los cálculos de biomasa⁷. Para estimar la concentración de biomasa se utilizó la Ecuación 1.

ECUACIÓN 1

$$[B] = \frac{PMS - PV}{V} \quad (I)$$

Dónde B es concentración de biomasa (g/ml), PMS es peso del tubo con la muestra seca (g), PV es peso del tubo vacío (g) y V es volumen de la muestra tomada (ml).

Determinación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de proteína en el medio se tomaron muestras a los 0, 5 y 8 días de fermentación. Se pesó 2 g de éste en una balanza analítica (Adventurer Pro), posteriormente se colocó en un mortero y se añadió 8 mL de solución de NaCl al 1%, se adicionó arena estéril y se trituró. El macerado se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante.

Se colocó 0,1 mL del sobrenadante y se añadió 0,9 mL de reactivo Biuret previamente preparado¹³. Se realizaron los ensayos por triplicado. Los tubos reposaron durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras ocurría la reacción.

Finalmente, se leyó la absorbancia de la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-vis (accuSkan GO- Fisher Scientific)

a una longitud de onda de 540 nm. Se determinó la concentración de proteínas a partir de una curva patrón de albúmina bovina con una concentración en el rango de 5 hasta 20 mg/mL (Figura 1).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion versión XVI.I con un diseño experimental 2³ donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los factores estudiados y sus interacciones.

Se optimizó los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación para conocer la mejor relación entre las variables respuestas: concentración de biomasa y proteína. Se consideraron diferencias significativas con un valor-p < 0,05¹⁵.

Resultados y discusión

Análisis de la concentración de biomasa como variable respuesta

Del análisis estadístico total se obtuvo para cada variable respuesta los siguientes indicadores: tabla de análisis de varianza (ANOVA), coeficiente de determinación, diagrama de Pareto estandarizado, gráfico de efectos principales y gráfico de superficie de respuesta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de biomasa (Tabla 1), el Valor-p de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción BC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0%. Según Gutierrez¹⁵, una significancia diferente de cero indica que los factores que cumplen con este parámetro influyen significativamente sobre el proceso en análisis.

El efecto estandarizado se grafica en el eje x del diagrama de Pareto expresado en valor absoluto. Sirve de estadístico de prueba para aprobar la hipótesis nula contra la alternativa. Así, se rechaza la hipótesis nula si el valor absoluto del efecto estandarizado es mayor que el valor crítico de tablas de la

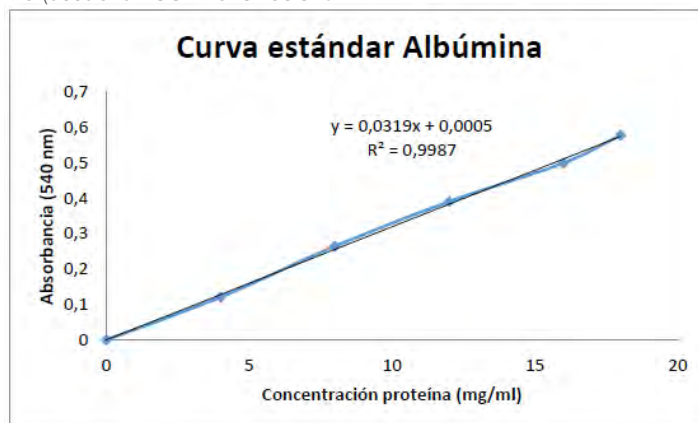


Figura 1. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteína.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	0,012341	1	0,012341	27,36	0,0004
B: V agitación	0,0507781	1	0,0507781	112,56	0,0000
C:C inóculo	0,0443187	1	0,0443187	98,25	0,0000
BC	0,015798	1	0,015798	35,02	0,0001
Bloques	0,000141491	1	0,000141491	0,31	0,5878
Error total	0,00451102	10	0,000451102		
Total (corr.)	0,127888	15			

Tabla 1. Tabla ANOVA para concentración de biomasa

distribución t de Student con los grados de libertad correspondientes al error del análisis¹⁵. Éste último valor se adiciona en el diagrama de Pareto con una línea azul.

Para el caso de la concentración de biomasa se puede apreciar que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor concentración de inóculo (C) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 2), sin embargo la interacción BC y el tiempo de fermentación (A) también sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución t de Student (Línea vertical de color azul). Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó la ANOVA al concluir que todos los factores son estadísticamente diferentes de cero.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 3) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y concentración de inóculo (C) sobre la concentración de biomasa. Se determinó que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y la concentración de inóculo de 5000 a 50000 conidios/g, aumenta la concentración de biomasa; es decir existe una mayor tasa de duplicación celular. El tiempo (A) presenta una línea menos pronunciada al incrementar los

días de fermentación, es posible que la influencia de este factor afecte de manera significativa al proceso en un rango más alto o cuando se alcance la máxima tasa de duplicación celular⁸.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 96,4727% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. Se reportó la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de Biomasa en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa (Ecuación 2).

Análisis de la concentración de proteína como variable respuesta

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de proteína (Tabla 2), el Valor-P de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción AB y AC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0% por tanto se concluye que los mismos afectan significativamente al proceso fermentativo para los resultados de la concentración de proteína.

ECUACIÓN 2

$$CB = 0,57144 + 0,018515 A + 0,000597657 B + 9,4255 \times 10^{-7} C + 4,65519 \times 10^{-8} BC$$

(V)

Donde A, B y C representan los factores: Tiempo de fermentación, velocidad de agitación y concentración de inóculo respectivamente y CB representa a la concentración de biomasa formada.

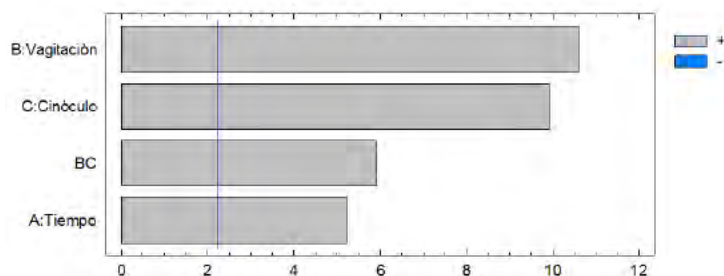


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de biomasa.

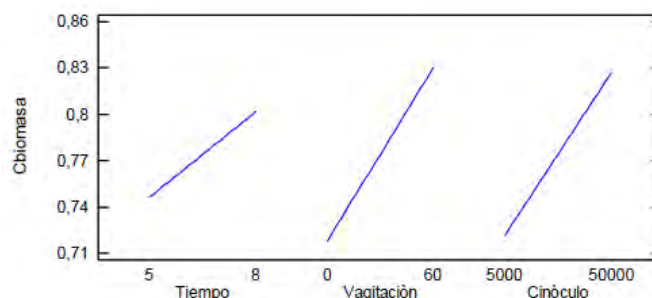


Figura 3. Gráfico de efectos principales para la concentración de biomasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	52,753	1	52,753	176,11	0,0000
B: V agitación	81,9509	1	81,9509	273,58	0,0000
C: C inóculo	2,493	1	2,493	8,32	0,0180
AB	9,47978	1	9,47978	31,65	0,0003
AC	2,09489	1	2,09489	6,99	0,0267
Bloques	0,0443208	1	0,0443208	0,15	0,7094
Error total	2,69592	9	0,299546		
Total (corr.)	151,512	15			

Tabla 2. Tabla ANOVA para la concentración de proteína.

El diagrama de Pareto indica que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor tiempo de fermentación (A) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 4). El factor cantidad de inóculo (C) y las interacciones AB y AC representan valores menores, pero se consideran significativos debido a que sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución t de Student. Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó el análisis de varianza al concluir que los factores son estadísticamente diferentes de cero para la variable concentración de proteína.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 5) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y tiempo de fermentación (A) sobre la concentración de proteína. Se determina que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y el tiempo de fermentación de 5 a 8 días, aumenta la concentración de proteína. La velocidad de agitación presenta una línea con mayor inclinación. Al parecer

la agitación permite que las células obtengan un mejor contacto con la superficie y pueden disponer de mejor manera los nutrientes del medio. De esta manera existe una correlación directamente proporcional entre el sustrato y el crecimiento celular de *Aspergillus niger*.

El tiempo de fermentación influye sobre el crecimiento celular. A mayor división celular mayor síntesis de proteína en el medio, esto se consigue cuando el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial¹⁰. De tal manera, mientras el conidio se encuentre en la fase exponencial de crecimiento existirá mayor cantidad de biomasa y por ende mayor nivel de proteína sintetizada.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 98,2207% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. Se reportó la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de proteína en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa (Ecuación 3)

ECUACIÓN 3

$$CP = 5,34187 + 0,402531 - 0,03574 B - 5,21448 \times 10^{-5} C + 0,0171051 AB + 1 \times 10^{-5} AC$$

(VI)

Donde A, B y C representan los factores Tiempo de fermentación, velocidad de agitación y concentración de inóculo respectivamente y CP representa a la concentración de proteína.

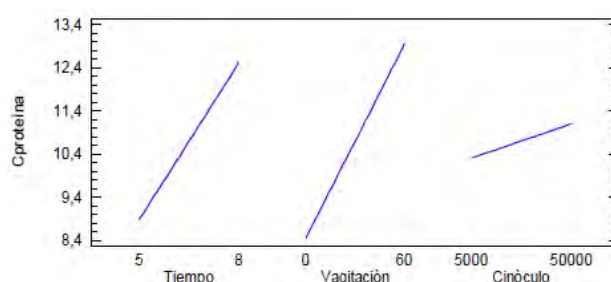


Figura 5. Gráfico de efectos principales para la concentración de proteína.

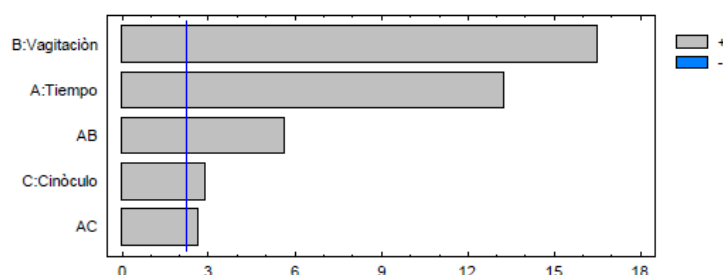


Figura 4. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de proteína.

Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

Para optimizar un proceso es necesario ajustar el modelo de las ecuaciones de regresión lineal a un conjunto de puntos que pertenecen a la región experimental del proceso en análisis. El programa estadístico emite un gráfico que describe el comportamiento de la vibración de estos puntos sobre la región experimental¹⁵. El diagrama toma el nombre de Superficie de Respuesta y describe el comportamiento de la respuesta promedio en cada punto de la región experimental.

De las ecuaciones 2 y 3 se obtuvo los diagramas de superficie de respuesta para la optimización de la concentración de biomasa (Figura 6) y la optimización de la concentración de proteína (Figura 7).

Se observa que con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g, una velocidad de agitación de 60 rpm y un tiempo de fermentación de 8 días es posible alcanzar la deseabilidad más alta (1), por tanto, la optimización de los factores en el proceso fermentativo.

Tanto en la Figura 5 como en la Figura 6 se observa una superficie lineal con tendencia a un crecimiento positivo. Este fenómeno explica que aún no se ha alcanzado el nivel máximo de optimización y que los valores críticos de los 3 factores se encuentran por encima de los rangos establecidos en el análisis¹⁵. Sin embargo, se necesita de un estudio con variación de niveles altos y bajos para poder establecer los verdaderos puntos críticos. Si se quiere reproducir los valores obtenidos en este experimento no es recomendable variar los valores de los factores establecidos en este estudio puesto que no se conoce el comportamiento del hongo fuera del rango preestablecido.

Los resultados de las variables respuesta optimizadas se resumen en la Tabla 3. Se obtuvo una concentración de biomasa de 0,942 g/mL y una concentración de proteína de 16,31

mg/mL al finalizar el proceso de fermentación. Isique & Sing¹⁶, realizaron estudios sobre la disponibilidad de azúcares reductores y el análisis químico de residuos de cáscara de papa, camote y yuca. Los resultados del análisis químico reportan valores para la concentración de proteína en cáscara de papa de 5,26 g/mL.

Borras y colaboradores⁹, en su estudio de la determinación de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en sustrato de harina de papa logró incrementar el valor proteico de 3,21 a 8,33 g/mL al finalizar la fermentación al mantener una temperatura de crecimiento de 25 ± 3 °C. Por otro lado, Aranda y colaboradores⁵ lograron obtener un alimento enriquecido proteicamente basado en caña de azúcar a través de una fermentación en estado sólido utilizando una mezcla de bacterias lácticas en simbiosis con hongos como *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, el incremento fue de 4, 18 a 19,43 mg de proteína sobre 100 g de cultivo de cultivo fermentado.

Por tanto, el valor de incremento proteico obtenido en esta experimentación se encuentra dentro de los rangos reportados bibliográficamente.

Conclusiones

Se determinó la influencia de los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación sobre el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa mediante un análisis estadístico de diseño factorial 2^3 indicando que existieron diferencias significativas entre los tres factores con un nivel de confianza $p < 0,05$.

Se observó que a pesar de que todos los factores influyeron significativamente sobre el proceso fermentativo, los que afec-

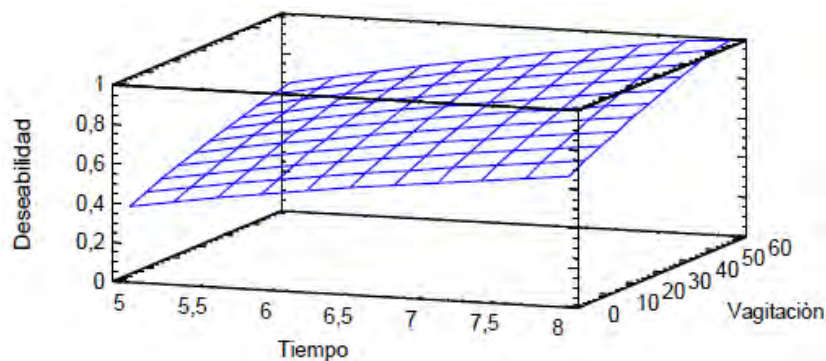


Figura 6. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de biomasa con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g de medio.

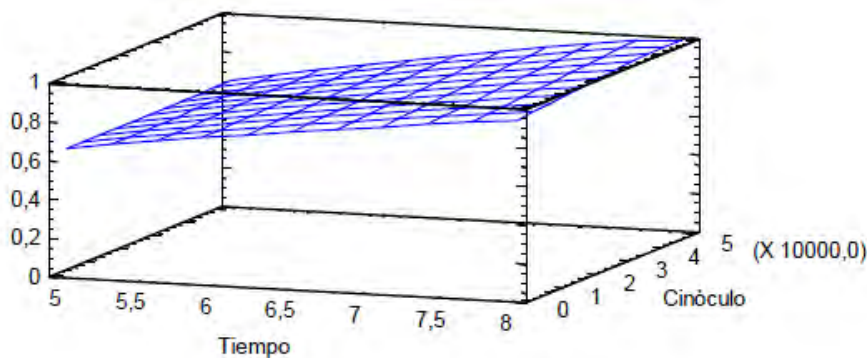


Figura 7. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de proteína con una velocidad de agitación de 60 rpm.

taron en mayor proporción fueron la velocidad de agitación (B) y la concentración del inóculo (C).

Se optimizó el proceso de fermentación en estado sólido con los siguientes parámetros: velocidad de agitación (60 rpm), concentración de inóculo (50000 conidios) y tiempo de fermentación (8 días) con las cuales se maximizó las variables respuesta obteniendo valores de concentración de proteína de 16,31 mg/mL y una concentración de biomasa de 0,94 g/mL.

Referencias bibliográficas

1. INIAP. Programa nacional de raíces y tubérculos. Variedades papa en el Ecuador 1, 1–320 (2013).
2. Muñoz, F. & Cruz, L. Manual de cultivo de papa. Manual del cultivo de papa 45 (2009).
3. Villalobos, M., López, M., Rodríguez, P. & Prado, M. Obtención de almidón a partir de los residuos de papa del mercado Abastos. Congr. Interdiscip. Cuerpos Académicos 3, 266–271 (2014).
4. Vargas Corredor, Y. A. & Pérez Pérez, L. I. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. Rev. Fac. Ciencias Básicas 14, 1–14 (2018).
5. Aranda, E. M., Georgana, L. E., Salgado, S. & Ramos, J. Elaboración de un alimento basado en caña de azúcar a partir de la fermentación en estado sólido y con diferentes niveles de zeolitas. Rev. Cuba. Cienc. Agrícola 46, 159–164 (2012).
6. Suarez, C. Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (SHIITAKE), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Univ. Nac. Colomb. Programa Interfacultades en Cienc. y Tecnol. Aliment. 2, 1–122 (2012).
7. Moyano, M. A. Fermentación en estado sólido (FES) de la papa (*Solanum tuberosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación. Univ. Nac. Abierta y a Distancia 3, 1–87 (2014).
8. Reyes, I., González, M. & López, F. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. Rev. Mex. Ing. Quim. 12, 41–56 (2013).
9. Borrás, L. M., Iglesias, A. E. & Moyano, M. A. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre los indicadores de la papa (*Solanum tuberosum*) fermentada en estado sólido. Cienc. Y Agric. 11, 31 (2016).
10. Cujilema, M. C., León, G. & Porro, M. R. Producción de lipasas por fermentación sólida con *aspergillus niger*: influencia del pH. Rev. Cent. Azúcar 45, 1–9 (2018).
11. Peña, C. B. Evaluación del contenido nutricional y actividad antioxidante en *Solanum tuberosum*. Rev. Univ. Nac. Colomb. 4, 1–149 (2015).
12. Apunte, D. Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana Trabajo. 1–42 (2019).
13. Argañaraz, Natalia; Hazán, M. Reconocimiento de Proteínas. Minist. Ciencia, Tecnol. e Innovación Product. 3, 1–21 (2017).
14. Ausel, A., Auxt, A. & Sin, P. Comparación de Bacteria , Archaea y EucO / ya. McGRAW-HILL Interamericana (2009).
15. Gutierrez, H. Análisis y Diseño de Experimentos. (Mc GRAW-HILL, 2012).
16. Isique, M. & Sing, J. Influencia de la hidrólisis química en las características fisicoquímicas y funcionales de los residuos industriales de papa, camote y yuca. Univ. Nac. del St. 7, 1–234 (2017).
17. Arnáiz, C., Isac, L. & Lebrato, J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Grup. Trat. Aguas Residuales. Esc. Univ. Politécnica 2, 1–8 (2000).
18. Mendez, J. Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger* y como medio de cultivo, dulce de atado. Rev. Univ. El Salvador 6, 1–184 (2013).
19. Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M. & Yepres, M. D. S. Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá , Colombia. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 65, 6811–6821 (2012).

Received: 10 julio 2020

Accepted: 10 agosto 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Metodología para calcular la amplitud y orientación espacial del vector total de cada onda electrocardiográfica en cuadrúpedos

Methodology to calculate the amplitude and spatial orientation of the total vector of each electrocardiographic wave in quadrupeds

Alberto Pompa Núñez¹ y Dania Yusimí Pompa Rodríguez²

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.5

Resumen: El objetivo de este trabajo es exponer la metodología para calcular la ubicación espacial del Vector eléctrico Total (VT) que genera a cada onda electrocardiográfica en cuadrúpedos, a partir de la lectura de su correspondiente amplitud en 3 derivaciones monopares. Se utilizaron 100 bovinos de uno y de otro sexo de la raza Holstein, clínicamente sanos y de todas las categorías. Las derivaciones monopares empleadas en el plano xy fueron V_{1C} , V_{2E} , V_{2C} y en el eje z perpendicular a este plano, la V_{10} . A partir de los datos de amplitud leídos en el electrocardiograma (ECG) se realizó el análisis vectorial para ubicar, espacialmente, el vector total de cada onda P, T, Q y R. Fueron adoptados como referencia los ejes x, y, z, lo que constituye un Sistema Triaxial de Análisis Vectorial (STAV). Se concluye que con la metodología establecida se puede calcular la orientación espacial del vector total de cada una de las ondas electrocardiográficas en los cuadrúpedos, a partir de los valores de amplitud leídos en tres derivaciones monopares y determinar los cambios en la dirección y sentido de los impulsos eléctricos en el miocardio, lo cual es un factor importante para el diagnóstico de las alteraciones cardíacas. Las causas de la gran variabilidad en la polaridad y morfología de las ondas en una extensa zona de la superficie corporal y de una limitada región en las que todas son igualmente estables se debe al sentido discordante en que se dirigen sus respectivos vectores.

Palabras clave: Cálculo vector eléctrico, ondas electrocardiográficas, derivaciones monopares, cuadrúpedos.

Abstract: The objective of this work is to expose the methodology to calculate the spatial location of the Total Electric Vector (VT) that it generates to each electrocardiographic wave in quadrupeds, from the reading of its corresponding amplitude in 3 monopolar leads. One hundred bovine animals of both sexes of the Holstein breed, clinically healthy and of all categories, were used. The monopolar leads used in the XY plane were V_{1C} , V_{2E} , V_{2C} , and in the z-axis perpendicular to this plane, V_{10} . The vector analysis was performed from the amplitude data read on the electrocardiogram (ECG) to locate, spatially, the total vector of each wave P, T, Q, and R. The x, y, and z axes were adopted as reference. What constitutes a Triaxial Vector Analysis System (STAV). It is concluded that with the established methodology, the spatial orientation of the total vector of each of the electrocardiographic waves in the quadrupeds can be calculated, from the amplitude values read in three monopolar leads and determine the changes in the direction and direction of the electrical impulses in the myocardium, which is an essential factor in the diagnosis of cardiac disorders. The causes of the significant variability in the polarity and morphology of the waves in a large area of the body surface and in a limited region in which they are all equally stable are due to the discordant direction in which their respective vectors are directed.

Key words: Electrical vector calculation, electrocardiographic waves, monopolar leads, quadrupeds.

Introducción

La producción de los potenciales de acción en órganos y tejidos originan corrientes que difunden hasta la superficie corporal y causan diferencias de potenciales eléctricos a este nivel, que se conocen como potenciales de superficie. Durante la propagación de los impulsos eléctricos en el corazón las regiones de signos opuestos son concebidas como dipolos elementales que, originan vectores que al sumarse constituyen el vector total que viaja por el músculo cardíaco activado.

Un vector se caracteriza por tener tres parámetros: dirección, sentido y amplitud. Su representación se hace a través de un segmento de recta que viene a ser una «flecha»¹. Dicho vector tendrá una proyección sobre la dirección de cada una de las derivaciones, por lo que la amplitud, morfología y polaridad de la onda electrocardiográfica registrada estará en dependencia del punto en el que se coloque el electrodo de registro². El Vector eléctrico Total (VT), vector eléctrico integral (VEI) o también llamado, eje eléctrico es la resultante de todas las

fuerzas eléctricas generadas en el corazón y que se van modificando a medida que se realiza el proceso de despolarización en cada infinitésimo de tiempo de una célula a la siguiente^{1,3}.

Se ha comprobado que, a partir de los valores de amplitud obtenidos para cada onda del electrocardiograma en derivaciones monopares y bipares perpendiculares entre sí, se puede determinar la dirección y sentido de la proyección del vector total en determinados planos⁴. Con el empleo de derivaciones monopares, adecuadamente dispuestas, se puede determinar no sólo la amplitud y el sentido de las proyecciones, sino también las dimensiones del vector eléctrico total en el espacio⁵. Por tales razones, el objetivo de este trabajo es exponer la metodología para calcular la ubicación espacial del Vector eléctrico Total (VT) que genera a cada onda electrocardiográfica en cuadrúpedos, a partir de la lectura de su correspondiente amplitud en 3 derivaciones monopares.

¹ Hospital San Vicente de Paul. Ibarra. Ecuador.

² Profesor de Biofísica y Fisiología: San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Materiales y métodos

En la investigación que sirvió de base al establecimiento de la metodología se emplearon 20 bovinos de uno y otro sexo de la raza Holstein y de todas las categorías, clínicamente sanos, procedentes del Distrito de Producción Pecuaria de la Finca Guayabal, perteneciente a la Universidad Agraria de La Habana (UNAH) y del Centro Nacional de Inseminación Artificial Rosafé Signé.

Atendiendo a las variables sexo, edad, y época del año se subdividieron en ocho categorías que comprendieron:

1. 20 terneras con edades de 7 a 60 días y con un peso promedio de 72 Kg.
2. 20 terneros con edades de 7 a 60 días y con un peso promedio de 75 Kg.
3. 40 novillas incorporadas al plan de reproducción con edad promedio de 20 meses, y un peso de 302 Kg.
4. 25 sementales jóvenes incorporados al plan de extracción de semen con edad promedio de 21 meses y un peso de 546 Kg.
5. 25 sementales adultos con edad promedio de 7,8 años y un peso promedio de 1007 Kg.
6. El grupo de sementales jóvenes de la categoría 4, pero muestreado en el mes de agosto.
7. El grupo de sementales adultos de la categoría 5 muestreado en el mes de agosto.
8. 20 vacas lactantes con una producción de leche promedio de 13 litros diarios y una edad de 4,8 años. Estas se encontraban en el transcurso de la tercera lactación.

Con excepción de las categorías seis y siete que fueron muestreadas en el mes de agosto (época de lluvia), el resto de los animales fueron muestreados en el período comprendido entre octubre y febrero (época de seca).

Los electrocardiogramas se registraron en 20 derivaciones, nueve bipolares y 11 monopoles, pero después de un amplio proceso de cálculos y valoraciones se seleccionaron 3 monopoles. Durante el muestreo los animales se mantuvie-

ron en un estado de correcto aplomo sobre sus extremidades y separados del piso por medio de una manta aislante de goma. Las áreas destinadas a la colocación de los electrodos, fueron previamente depiladas, frotadas con alcohol y se les aplicó pasta conductora de electricidad. Los registros se efectuaron con un electrocardiógrafo portátil de fabricación japonesa, marca HITACHI, calibrado con una señal de 1 mV/cm y una velocidad de corrida del papel de 25 mm/s.

Resultados y discusión

Fundamentos de la metodología

En el análisis vectorial para determinar la ubicación espacial del VT asociado a cada una de las ondas del ECG en cuadrúpedos se utilizaron, inicialmente, las derivaciones monopoles V_{1C} , V_{2E} , V_{2C} , y V_{10} ⁶. Los puntos correspondientes a cada una de ellas se indican en la figura 1A. En la figura 1B se muestra el sistema de coordenadas x, y, z y la ubicación que ocupan en él las direcciones en que se registran las derivaciones monopoles empleadas.

Las derivaciones V_{1C} y V_{2C} se colocaron de modo que sus respectivas direcciones fueran perpendiculares entre sí y se intersecaran a nivel del centro eléctrico del corazón, el cual se consideró como el origen del sistema triaxial de coordenadas x, y, z. De esta forma, V_{1C} presenta un ángulo de desviación respecto al semieje positivo x de $\Phi_{x(xy)} = 45^\circ$ y V_{2C} de $\Phi_{x(xy)} = 135^\circ$. Como V_{1C} y V_{2C} se registran en puntos equidistantes de V_{2E} y sus direcciones forman entre sí un ángulo de 90° , entonces esta última derivación forma un ángulo de 45° con cada una de ellas y coincide con la dirección del eje y. La polaridad de las ondas electrocardiográficas obtenida en derivaciones monopoles en bovinos y en equinos es similar, pero se manifiestan notables diferencias en la morfología que caracterizan a cada especie, al igual que en las derivaciones bipolares empleadas⁷⁻¹⁰.



Figura 1. Derivaciones monopoles empleadas para el análisis Vectorial.

Se señala que Robert P. Grant (1915-1966) fue el pionero de la vectocardiografía en el hombre, pues en 1950 describió un método para representar la dirección frontal y horizontal de un vector en un mismo diagrama, lo que se considera de suma utilidad en el análisis del electrocardiograma normal^{11,14} y para calcular el eje eléctrico e interpretar diversas alteraciones electrocardiográficas^{3,15,16}.

Varios investigadores han seguido esta metodología pero hacen referencia a la proyección del vector total sobre los cuadrantes del sistema rectangular cartesiano y no a su ubicación espacial en alguno de los 8 sectores espaciales (octantes) en el que puede quedar dividido el cuerpo del hombre o el del animal^{1,4}. Los cálculos no ubican el vector total que genera a cada onda en su disposición espacial^{17,18}, como se hace en este trabajo y en las investigaciones previas que fundamentan la metodología que aquí se detalla^{6,19}.

La amplitud del vector total es proporcional a la masa te tejido que es activada durante la despolarización y la repolarización del corazón, por eso se modifica en hipertrofias²⁰⁻²² y en dilataciones del miocardio²³. Su dirección y sentido pueden ser afectados por áreas de isquemia, necrosis y otros factores^{24,25}.

El ECG ha sido registrado en varias especies de animales cuadrúpedos, tales como bovino^{26,27}, equino^{9,28}, camello²⁹, cerdo^{30,31}, perro³² y búfalo³³, entre otros. El análisis vectorial en bovinos y en otros cuadrúpedos, utilizando las mismas derivaciones que en el hombre, han revelado una extraordinaria variabilidad de los resultados, por lo que no es posible tenerlos en cuenta desde el punto de vista diagnóstico³⁴⁻³⁷. Sin embargo, el electrocardiograma ha resultado muy útil para la detección de arritmias que son alteraciones muy frecuentes en el hombre y en los animales³⁸⁻⁴² ya que éstas se ponen de manifiesto en cualquiera de los registros en el plano horizontal.

tal xy, los obtenidos en las derivaciones V_{1C} , V_{2E} , V_{2C} y en dirección del eje z en la derivación V_{10} , que es perpendicular al referido plano (Figuras 1 B y 2). Se adoptan como referencia los ejes x, y, z y por eso se denomina Sistema Triaxial de Análisis Vectorial (STAV)⁶.

En la figura 3, se puede observar la disposición espacial del VT y su proyección VT' sobre el plano xy, el ángulo de inclinación $\theta_{i(xy)}$ y la desviación angular $\Phi_{x(xy)}$ y $\Phi_{y(xy)}$ de esta proyección con respecto a los semiejes positivos x y y.

El vector total presenta dos ángulos de inclinación más, no representados en la figura, uno con respecto a la proyección sobre el plano yz que se identifica como $\theta_{i(yz)}$ y otro sobre la proyección en el plano xz, que recibe la denominación de $\theta_{i(xz)}$.

Las amplitudes de las ondas electrocardiográficas en las derivaciones V_{1C} y V_{2C} , permiten calcular la proyección VT' del VT (Figura. 4), pues por su disposición mutuamente perpendiculares, se cumple que:

$$(VT')^2 = (V_{1C})^2 + (V_{2C})^2.$$

$$VT' = [(V_{1C})^2 + (V_{2C})^2]^{1/2}.$$

Para el cálculo del VT sería necesario obtener su proyección sobre el eje z, la cual se señala en la figura 3, como Cz y constituye el valor de amplitud leído en el ECG en la derivación V_{10} .

$$(VT)^2 = (VT')^2 + (V_{10})^2.$$

$$VT = [(VT')^2 + (V_{10})^2]^{1/2}.$$

No es imprescindible emplear los valores de amplitud obtenidos en V_{2E} en el algoritmo de los cálculos, pero constituyó una información muy útil porque permitió comprobar que la suposición de que las direcciones de V_{1C} y V_{2C} son perpendiculares es correcta, ya que se calculó V_{2E} como la proyección

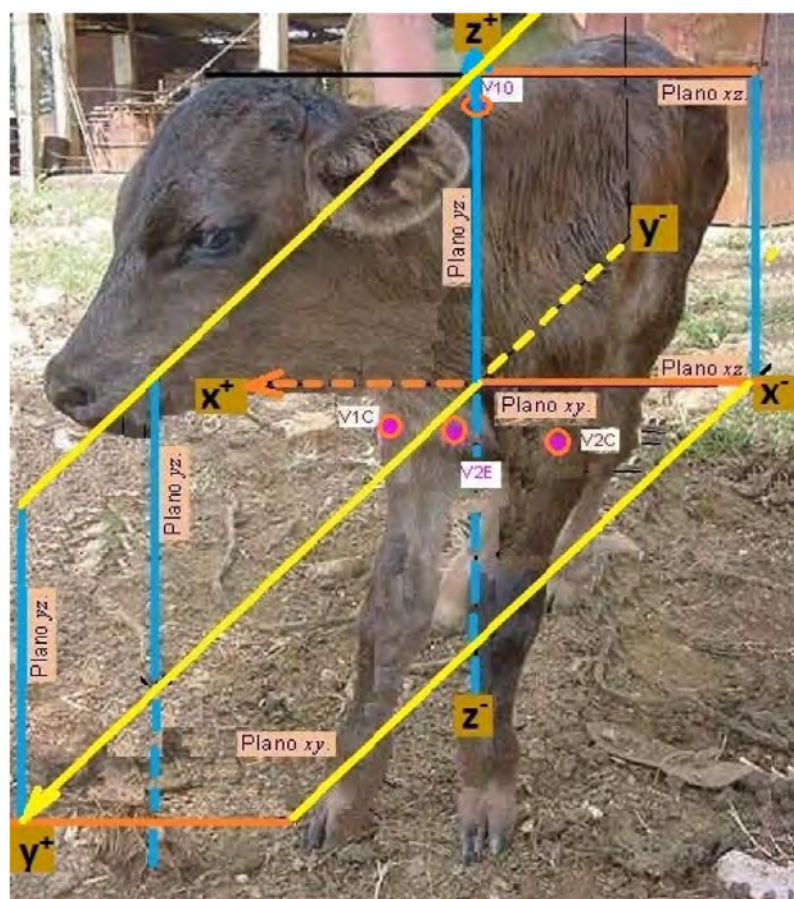


Figura 2. Planos de referencia en los que se proyecta el vector total (VT).

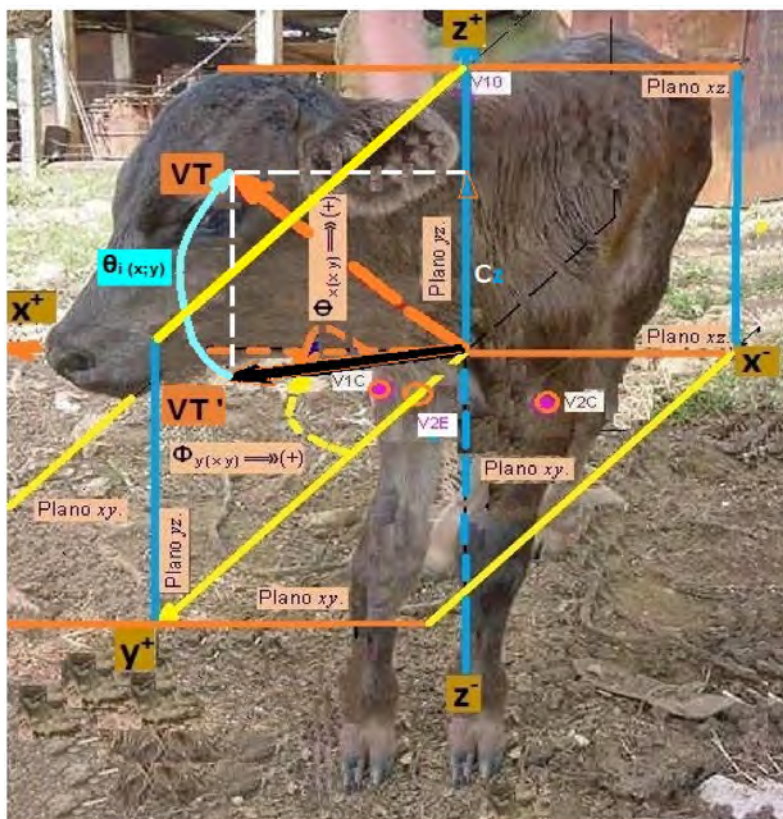


Figura 3. Proyección VT' del VT sobre el plano xy y ángulos que forma con los semiejes positivos x y y.

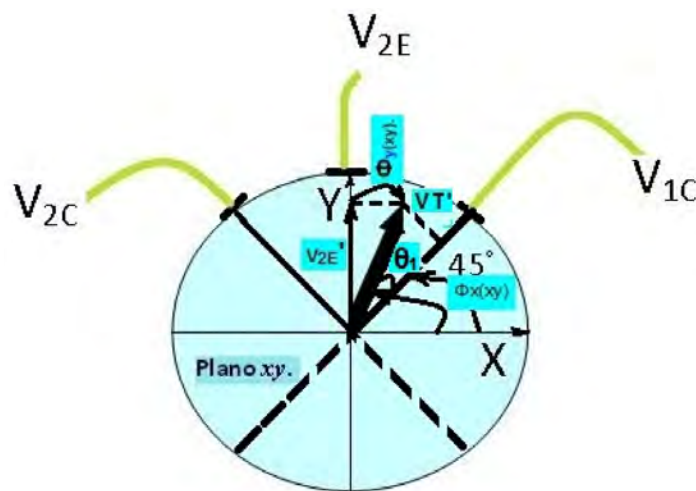


Figura 4. Proyección del vector VT' sobre la dirección de V_{2E} , en una vista posterior y dorsal.

del vector VT' sobre el eje y, lo que se indica en la figura 4, que representa una vista posterior y dorsal del plano horizontal xy:

$$V_{2E}' = VT' \cos \Phi_{y(xy)}$$

Cada valor calculado para V_{2E}' se comparó con el correspondiente valor de amplitud leído en el ECG en la derivación V_{2E} y finalmente se compararon las medias y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para referir los ángulos de VT' a los semiejes positivos de las coordenadas x y y se tiene en consideración la desviación inicial del sistema formado por las derivaciones V_{1C} y V_{2C} y la dimensión del ángulo θ_1 , desviación del vector VT' respecto a V_{1C} .

Hay que tener presente que la dirección de V_{10} coincide con el eje z que es perpendicular al plano xy en el origen de coordenadas. En la figura 4 sale del plano del papel en dirección al lector.

Después de realizar las lecturas de la amplitud de las ondas en cada una de las 3 derivaciones monopoles V_{1C} , V_{2C} y

V_{10} , se procedió al establecimiento de las referencias y a los cálculos que se describen a continuación y que conforman la metodología.

La ubicación espacial del vector eléctrico integral o vector total que describe al complejo QRS y los correspondientes a las ondas P y T se realiza de acuerdo a los valores de α_x , α_y y α_z que representan los ángulos que cada vector forma con los semiejes positivos x, y y z, respectivamente. El objetivo final es calcular estos 3 ángulos. Para su determinación se transita por el siguiente algoritmo:

I. Adopción de las referencias.

1. Planos en que se proyecta el Vector Total (Figura. 2).

a.- El plano xy o plano horizontal en los cuadrúpedos, sobre el que están ubicadas las derivaciones V_{1C} , V_{2E} y V_{2C} , separa al cuerpo del animal en parte ventral y parte dorsal. El eje

z, que es perpendicular a este plano, se asume como positivo hacia la parte dorsal y negativo hacia la ventral. El plano xy corresponde al plano frontal en los primates.

b.- El plano yz o plano longitudinal medio en los cuadrúpedos, separa al cuerpo del animal en una parte izquierda y una derecha aproximadamente iguales. Como quiera que todos los planos que son paralelos a él se denominan sagitales⁴³ y un plano es paralelo a sí mismo, lo denominaremos en lo adelante plano sagital medio. El eje x, que es perpendicular a este plano, en una vista posterior y dorsal, se asume como positivo hacia la derecha del animal y negativo hacia la izquierda. Este plano yz se corresponde con el sagital medio o longitudinal medio en los primates.

c.- El plano xz o plano transversal divide al cuerpo de los cuadrúpedos en una parte anterior y una posterior. En este caso, el eje y que es perpendicular a dicho plano, se asume como positivo hacia la parte anterior del animal y negativo hacia la posterior. El plano xz o plano transversal, se corresponde con el plano del mismo nombre en los primates, pero en estos últimos divide al cuerpo en porción superior e inferior.

Si la posición de observación es en la parte posterior del animal y se le realiza un corte transversal el semieje x es positivo hacia la derecha, el semieje z positivo hacia arriba y el semieje y positivo hacia delante.

2. Signos de los ángulos Φ descritos por la proyección VT' sobre el plano xy.

Situado en la parte posterior del animal (Figura 4), $\Phi_{x(xy)}$ se asume como positivo cuando la proyección del vector VT' se mueve en sentido antihorario, hacia el semieje positivo y. Es negativo si se desplaza en sentido horario, o sea hacia el semieje negativo y. Se adopta $\Phi_{y(xy)}$ positivo cuando la desviación de la proyección del vector VT' se desplaza hacia la derecha del eje y, hacia el semieje positivo x (en sentido horario) y negativo cuando gira a la izquierda, hacia el semieje negativo x (en sentido antihorario). Con esta convención, $\Phi_{x(xy)}$ y $\Phi_{y(xy)}$ tendrán signos opuestos en todos los octantes porque el VT se desplazará sólo en un sentido determinado.

3. Octantes en que se divide el cuerpo del animal y en los que se puede ubicar el vector total (Figura. 5).

Los análisis se pueden realizar a partir de una vista horizontal, transversal o sagital, sobre los planos xy, xz y yz, respectivamente, a partir de los ocho sectores en que queda dividido el espacio (octantes) que se ordenaron de manera tal que, visto el animal con la cabeza hacia delante en relación al observador, se tienen cuatro octantes ubicados en el dorso (α_z

< 90°) que son:

Primero. - A la derecha y hacia delante ($\alpha_x < 90^\circ; \alpha_y < 90^\circ$).

Segundo. - A la izquierda y hacia delante ($\alpha_x > 90^\circ; \alpha_y < 90^\circ$).

Tercero. - A la izquierda y posterior ($\alpha_x > 90^\circ; \alpha_y > 90^\circ$).

Cuarto. - A la derecha y posterior ($\alpha_x < 90^\circ; \alpha_y > 90^\circ$).

Los restantes octantes se ubican ventralmente ($\alpha_z > 90^\circ$)

y se relacionan a continuación:

Quinto. - Por debajo del primero ($\alpha_x < 90^\circ; \alpha_y < 90^\circ$).

Sexto. - Por debajo del segundo ($\alpha_x > 90^\circ; \alpha_y < 90^\circ$).

Séptimo. - Por debajo del tercero ($\alpha_x > 90^\circ; \alpha_y > 90^\circ$).

Octavo. - Por debajo del cuarto ($\alpha_x < 90^\circ; \alpha_y > 90^\circ$).

Los rangos de valores de los pares de octantes adyacentes (1 y 5; 2 y 6; 3 y 7; 4 y 8, sólo se diferencian por el valor de α_z , lo que hay que tener presente para la ubicación espacial del vector Total. La numeración se realiza en sentido antihorario y por orden creciente en la mitad superior y luego por la inferior. Debe interpretarse que la porción que ilustra los octantes 1, 4, 5 y 8, gira 180° para exponer los restantes: 2, 3, 6 y 7.

La diferencia de posición de dos vectores que partan del origen y sean simétricos a la porción de plano que separa a dos octantes adyacentes y sus ángulos de inclinación sobre los otros dos planos sean iguales, es equivalente a la diferencia entre los ángulos α , que separan a cada uno de ellos del semieje positivo de la coordenada que es perpendicular al plano de separación de los dos octantes considerados. En la figura 5, los octantes adyacentes 1 y 4 quedan separados por la porción de plano xz, la coordenada perpendicular a este plano es y, por lo que las posiciones de dos vectores que sean simétricos, situados en dichos octantes, difieren sólo en el valor de del ángulo α_y , de modo que $\alpha_{y1} < 90^\circ$ y $\alpha_{y4} > 90^\circ$.

II. Desarrollo de los cálculos.

Primer paso

Cálculo de la proyección VT' del VT sobre el plano xy (Figura.6)

$$VT' = [(V_{1C})^2 + (V_{2C})^2]^{1/2} \quad (1)$$

Donde:

a = Valor de la amplitud de la onda electrocardiográfica leída en V_{1C} .

b = Valor de la amplitud de la onda electrocardiográfica leída en V_{2C} .

En todas las ecuaciones las variables V_{1C} , V_{2C} y V_{10} se sustituyen por los correspondientes valores de amplitud que son leídos en el ECG.

$$VT' = [(a)^2 + (b)^2]^{1/2}$$

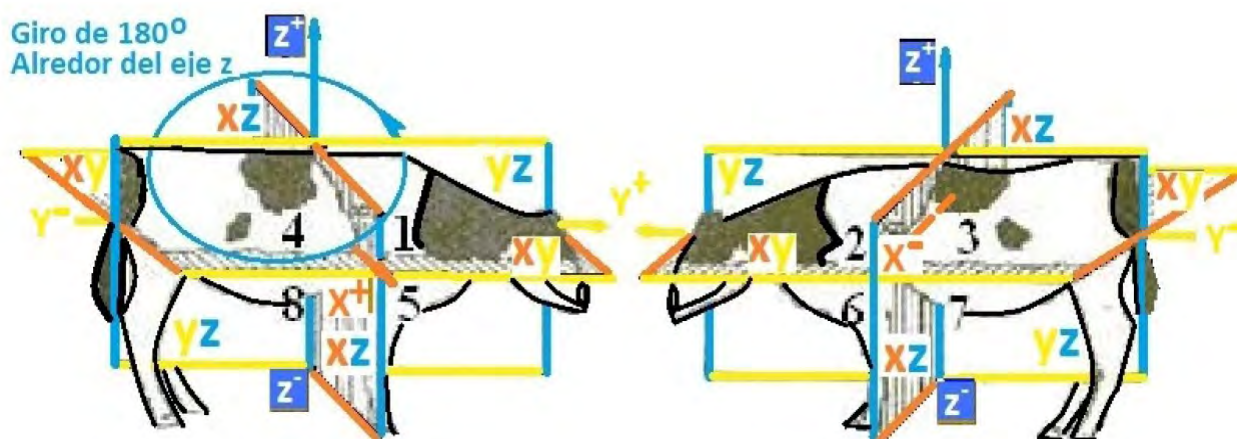


Figura 5. Sectores espaciales (octantes) en los que se divide el cuerpo de los cuadrúpedos para el análisis vectorial.

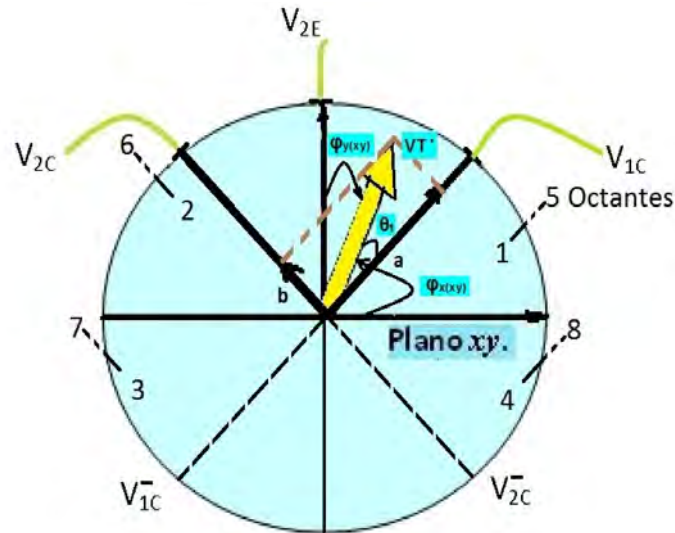


Figura 6. Posición relativa de V_{1C} , V_{2C} , V_{2E} y VT' sobre el plano xy , en una vista posterior y dorsal del animal.

Segundo paso

Cálculo de la desviación θ_1 del vector VT' respecto a V_{1C} . (Figura.6)

$$\theta_1 = \cos^{-1} V_{1C} / VT' \quad (2)$$

Tercer paso

Cálculo de la desviación $\Phi_{x(xy)}$ y $\Phi_{y(xy)}$ de VT' (Figura.6).

Las fórmulas a utilizar dependen de la ubicación del vector total en el espacio y de su correspondiente proyección VT' .

La primera condición plantea

a) Si $V_{1C} \geq 0$ y $V_{2C} \geq 0$ o $V_{1C} \leq 0$ y $V_{2C} \geq 0$ entonces;

$$\Phi_{x(xy)} = 45^\circ + \theta_1 \quad (\text{Referido al semieje positivo } x). \quad (3)$$

$$\Phi_{y(xy)} = 90^\circ - \Phi_{x(xy)} \quad (\text{Referido al semieje positivo } y). \quad (4)$$

Las ecuaciones 3 y 4 se cumplen en la segunda mitad del primero y del quinto octantes, en el segundo y el sexto y en la primera mitad del tercero y el séptimo. Se considera el giro θ_1 en sentido antihorario y se emplean las ecuaciones 3 y 4.

La segunda condición establece

b) Si $V_{1C} \geq 0$ y $V_{2C} \leq 0$ o $V_{1C} \leq 0$ y $V_{2C} \leq 0$ entonces.

$$\Phi_{x(xy)} = 45^\circ - \theta_1 \quad (\text{Referido al semieje positivo } x). \quad (5)$$

$$\Phi_{y(xy)} = 90^\circ - \Phi_{x(xy)} \quad (\text{Referido al semieje positivo } y). \quad (6)$$

Las ecuaciones 5 y 6 se cumplen en la segunda mitad del tercero y del séptimo octantes en el cuarto y en el octavo y en la primera mitad del primero y del quinto octantes. Se considera el giro θ_1 en sentido horario. Debe tenerse en cuenta que el valor mínimo de $\theta_1=0$; es decir no se consideran valores negativos.

Cuarto paso

Cálculo del vector total VT

$$VT = [(V_{10})^2 + (VT')^2]^{1/2} \quad (7)$$

Quinto paso

Cálculo del ángulo de inclinación del vector total con respecto al plano xy (Figura 7).

$$\theta_{i(xy)} = \cos^{-1} VT' / VT \quad (8)$$

Sexto paso

Determinación de la ubicación espacial del vector VT . Para ello se calculan los ángulos α_x , α_y y α_z que representan la desviación angular con respecto a los semiejes positivos x , y y z , respectivamente.

a) Para calcular α_x , que nos da la desviación angular del vector total respecto al semieje positivo x , tendremos:

$$\alpha_x = \cos^{-1} [\cos \Phi_{x(xy)} \cdot \cos \theta_{i(xy)}] \quad (9)$$

b) Para calcular α_y , que constituye el ángulo que forma el vector total con el semieje positivo y , tendremos;

$$\alpha_y = \cos^{-1} [\cos \Phi_{y(xy)} \cdot \cos \theta_{i(xy)}] \quad (10)$$

Donde $\Phi_{x(xy)}$ y $\Phi_{y(xy)}$ son los ángulos que separan la proyección del vector total (VT') del semieje positivo x y del semieje positivo y .

c) Para calcular α_z puede utilizarse el mismo método, procediendo de la siguiente manera:

I.- Cálculo de la proyección del vector VT' sobre el eje x (Figura 7).

$$X' = VT' \cdot \cos \Phi_{x(xy)} \quad (11)$$

II.- Cálculo de la proyección (VT'_z) del vector total sobre el plano xz .

$$VT'_z = [(V_{10})^2 + (X')^2]^{1/2} \quad (12)$$

III.- Cálculo del ángulo de desviación, $\Phi_{z(kz)}$, del vector VT'_z respecto al eje z .

$$\Phi_{z(kz)} = \cos^{-1} V_{10} / VT'_z \quad (13)$$

IV.- Cálculo del ángulo de inclinación del vector total respecto al plano xz .

$$\theta_{i(kz)} = \cos^{-1} VT'_z / VT \quad (14)$$

V.- Finalmente se calcula α_z , que nos informa sobre la desviación angular del vector total respecto al semieje positivo z .

$$\alpha_z = \cos^{-1} [\cos \Phi_{z(kz)} \cdot \cos \theta_{i(kz)}] \quad (15)$$

Con este sistema de ecuaciones se determinó que la ubicación espacial del vector total de la onda P, en una muestra de 40 novillas, fue en el séptimo octante, con las coordenadas angulares $\alpha_x = 99^\circ$, $\alpha_y = 128^\circ$ y $\alpha_z = 138^\circ$, el de la onda Q en el octavo con $\alpha_x = 86^\circ$, $\alpha_y = 123^\circ$ y $\alpha_z = 126^\circ$, el de la onda R en

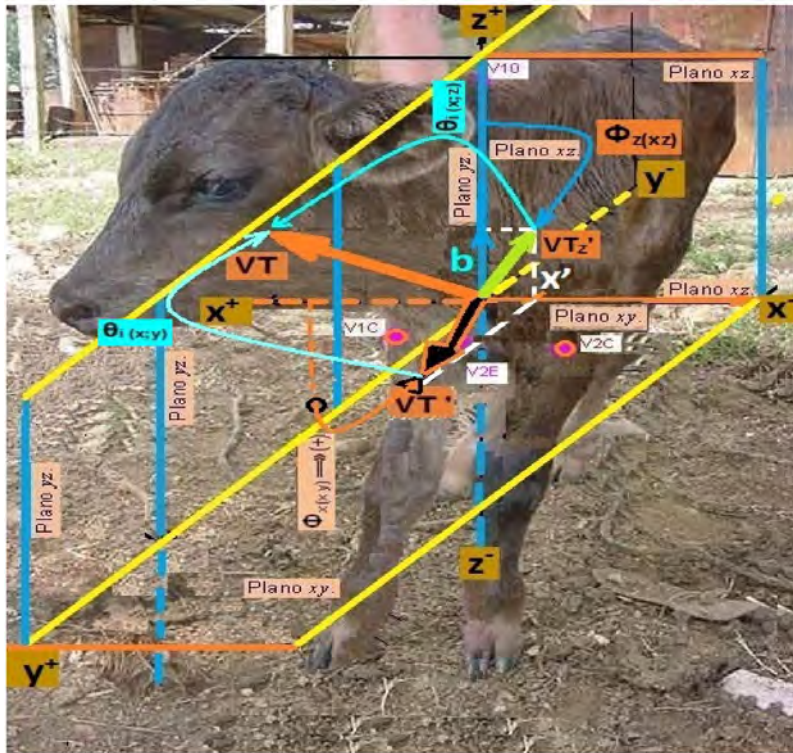


Figura 7. Ángulos de inclinación de VT y de sus proyecciones sobre los Planos xy y xz.

el segundo con $\alpha_x = 95^\circ$; $\alpha_y = 68^\circ$ y $\alpha_z = 24^\circ$ y el de la onda T en el octavo para el cual $\alpha_x = 87^\circ$; $\alpha_y = 132^\circ$ y $\alpha_z = 135^\circ$ (6).

La validez de la Metodología con el empleo de este Sistema Triaxial de Análisis Vectorial (STAV), fue corroborada empíricamente al medir la amplitud y localizar los puntos extremos de los dipolos de cada una de las ondas electrocardiográficas a nivel de la superficie corporal en el plano xz, con el empleo de 8 derivaciones pericardiales^{6,19}. Con ello, se obtuvo que, efectivamente, el sentido de los vectores que describen las ondas P, Q y T es hacia la parte ventral de los animales (séptimo y octavo octantes) y el correspondiente a la onda R es discordante, o sea hacia el dorso, con una ubicación en el segundo octante. Los resultados obtenidos por uno y otro método se compararon entre sí y no se encontraron diferencias significativas. A partir de los resultados que se calculan, según se indica en la metodología, se ubica gráficamente el vector de cada onda. Por otra parte, si se tiene en cuenta la diferente disposición del corazón en los primates no humanos y del hombre, la metodología puede ser totalmente extrapolada a estas especies.

Conclusiones

Se comprueba que con la metodología establecida es posible calcular la ubicación espacial del vector total de cada una de las ondas electrocardiográficas en los cuadrúpedos, a partir de los valores de amplitud leídos en tres derivaciones monopares situadas en dos planos mutuamente perpendiculares. Los resultados a que se arriban permiten diagnosticar las modificaciones en la dirección y sentido de los impulsos eléctricos en el miocardio, lo cual es un factor importante para evaluar las alteraciones cardíacas. Las causas de la gran variabilidad en la polaridad y morfología de las ondas en una extensa zona de la superficie corporal y de una limitada región en las que todas son igualmente estables se debe al sentido discordante en que se dirigen sus respectivos vectores.

Referencias bibliográficas

1. Lanza TG. Métodos para determinar el eje eléctrico en un electrocardiograma. *Rev Mex Cardiol*. 2016;27(s1):s35-s40.
2. Roy T, Peralta GR, Gamarra CLC, Núñez Vera LM, Santacruz SMC. Intervalo QTc prolongado en pacientes de Clínica Médica: estudio multicéntrico. *Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int.* marzo 2020; 7 (1):10-19.
3. Pozas G, Valdés R, Ibarra C. Método de Grant, eje eléctrico de P, eje eléctrico de QRS, eje eléctrico de T, eje eléctrico espacial. *Rev Ciencias Clínicas*. 2012;9(27):18-22.
4. Lanza TG. Algoritmo y pseudocódigo: nueva perspectiva para calcular el eje eléctrico de un electrocardiograma. *Avances Cardiol*. 2014;34(4):280-285.
5. Denis PDA, Martínez GS, Figueredo GAR, Rodríguez VEC. Valor diagnóstico de la R de aVL en la hipertrofia ventricular izquierda. *Univ Med Pinaréña*. 2020;16(1):e382.
6. Pompa N.A., Determinación de la orientación espacial del vector Eléctrico integral de cada onda electrocardiográfica en Cuadrúpedos, tomando como referencia al bovino. *Rev. Salud Anim*. 2003;25(3):186-191.
7. Lank RB, Kingrey BW. Electrocardiograms of normal lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 1959; 20: 273-277.
8. Matsui K, Sugano S. Species differences in the changes in heart and T- wave amplitude after autonomic blockade in thorough bred horses, ponies, cows, pigs, goats and chickens. *Japan Vet. Sci* 1987;49 (4):637-644.
9. Dörner C, Godoy A. Electrocardiografía en equinos fina sangre de carrera. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2009;24(2):18-25.
10. Honda N, Dörner C, Godoy A. Efectos del entrenamiento sobre variables electrocardiográficas en equinos Fina Sangre de Carrera. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2013;28 (1):2-7.
11. Vindas ZJ, Moya AA, Muñoz HP, Rojas MR. Interpretación práctica del electrocardiograma en el Servicio de Emergencias. *Rev Salud*. 2016;1(1):9-22.
12. Zavala VJ. Descripción del electrocardiograma normal y lectura del electrocardiograma. *Taller: Electrocardiografía básica para anestesiólogos*. 2017;40(1):210-213.
13. Morán M. Relevancia de la interpretación del electrocardiograma de reposo en la evaluación pre- participativa de deportistas. *Rev Actual Clinic Meds*. 2018;2(1):8-12.

14. Olvera CHE, Nieto MAJF, Rocha MYF, Morales LS, Ortiz SAG, Díaz CFA. Mejora de habilidades en la interpretación del electrocardiograma mediante un taller con simulación clínica. *EDUMECENTRO* 2020;12(1):30-45
15. Arias AM, Lucas LO, Espinosa E, Lezzi S, Rossi E, San Román E, Pizarro R, Belziti CA, Cagide AM, Doval HC. Características clínicas y evolutivas del síndrome de Takotsubo en un hospital universitario. *Rev Argent Cardiol*. 2018; 86:90-95.
16. Luna LR, Datino T. Electro-Reto. ECG de enero de 2020. *Rev Esp Cardiol*. 2020;73(1):87.
17. Rubio SJC. Actuación de enfermería ante una alteración electrocardiográfica. Eje, onda P y complejo QRS. *Enferm Cardiol*. 2016;23(67):58-65.
18. Asenjo R, Morris R, Sanhueza E, Ortiz M, Cereceda M. Diagnóstico diferencial de las taquicardias de complejo ancho: un desafío permanente. *Revista Chilena de Cardiología*. 2020;39(1):55-65.
19. Pompa N.A. Predicción de la orientación espacial del vector eléctrico integral de cada onda electrocardiográfica en cuadrúpedos, a partir de la determinación de los puntos dipolos de las ondas en el plano transversal xz. *Rev. Salud Anim*. 2003; 25(2):91-97.
20. Suárez AM, Lemus Y, Dulce M, Otero M. Valor del electrocardiograma en el diagnóstico de hipertrofia ventricular izquierda de pacientes en hemodiálisis. *CorSalud*. 2018;10(1):21-31.
21. Schossler LF, Shiguera IUL, de Almeida LA. Miocardiopatía hipertrófica. Reporte de caso. *Rev Urug Cardiol*. 2019;34:301-306.
22. Ramognino F, Ferraro F, Salmon BE, Caruso N, Sánchez C, Bortman G. Hallazgos electrocardiográficos anormales en deportistas amateur: comparación de los criterios de Seattle 2013 y 2017. *Rev Argent Cardiol*. 2019;87:146-151.
23. Costabel JP, Mandó F, Avegliano G. Miocardiopatía dilatada: ¿cuándo y cómo proceder a la investigación etiológica? *Rev Urug Cardiol* 2018;33:343-349.
24. Baquero L M, Quesada ACI. Infarto agudo al miocardio de cara inferior con posterior revascularización. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*. 2018;2:1-4.
25. Borrayo SG, Rosas PM, Pérez RG, Ramírez AE, Almeida GE, Arriaga DJJ. Infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST: Código I. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2018;56(1):26-37.
26. Lightowler-Sahlberg CH. El electrocardiograma bovino. 1ra Parte. Sus componentes normales. *Rev Med Vet Buenos Aires*. 1970;51(3):197-210
27. Begazo CCh, Portocarrero PH, Dávila FR. Parámetros Electrocardiográficos en Terneros Holstein Criados en la Altura y a Nivel del Mar. *Rev Inv Vet Perú*. 2017;28(2):227-235.
28. Hernández JM, Posada AS, Castillo FCA, Restrepo AS. Parámetros electrocardiográficos en caballos de raza Criollo Colombiano, pacientes de un establecimiento veterinario de Antioquia, Colombia. *Rev. Med. Vet*. 2016;32:39-41.
29. Rezakhani A. and Szabuniewicz M. The electrocardiogram of the camel. *Zentb. Vet. Med*. 1977;24(4):277-286
30. Hospital Italiano de Buenos Aires. "Trasplante experimental de hígado en cerdos. Aplicación de Protocolos quirúrgicos". Programa de Trasplante Hepático *Pren.méd.argen*.1996 (83):622-626.
31. Morales A, Carrasco V, Martínez E. Toxicidad cardiaca por anestésicos locales, protocolo de estudio en un modelo experimental porcino. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2017; 11(especial):120-125.
32. Vargas PP, Galindo ZV, Pedraza Adriana. Efecto del entrenamiento en Agility en gran altitud en perros Border Collie en algunas variables electrocardiográficas: análisis preliminar. *Rev Inv Vet Perú*. 2018;29(1):41-54.
33. Upadhyay RC, Sud SC. Electrocardiogram of buffaloes. *Ind. J. Dairy Sci*. 1982;35(1):8-12.
34. Brooijmans A.W.M. Electrocardiography in horses and cattle. Theoretical and clinical aspects. Laboratory of Veterinary Physiology, State University, Utrecht, Netherlands. 1957. p. 102 - 153
35. Upadhyay RC, Sud SC, Joshi HC, Bagha HS. Electrocardiographic studies in Jersey cattle. *Ind. Vet. J*. 1976;53:953-96.
36. D' Roth L. Electrocardiographic parameters in the normal lactating Holstein cow. *The Can. Vet. J*. 1980;21(10):271- 277.
37. Szabuniewicz M., Ortega F.V., Sosa F.A.J., Gómez Maritza y GIL C.B. La electrocardiografía en clínica veterinaria. III parte: Análisis vectorial. *Rev. Fac. Cienc. Vet. U. C. Ven*. 1980;28(1-8):107-112.
38. Gándara RJA, Santander BD, Mora PG, Amaris PO. Taquicardias supraventriculares. Estado del arte. *Rev. Fac. Med*. 2016;64(1): 111-21.
39. Rivera S, Gastón A, Tomas L, Ricapito MP, Mondragón I, Caro, M, Reinoso M, Belardi D, Giniger A, Scazzuso F. Arritmias originadas en los músculos papilares del ventrículo izquierdo: Características clínicas, multiimágenes y ablación por catéter. *Rev Argent Cardiol*. 2017;85:444-452.
40. Rubio SJC. Papel de enfermería en el tratamiento de las principales alteraciones electrocardiográficas: bradiarritmias, taquiarritmias y fibrilación auricular. *Enferm Cardiol*. 2018;25(73):76-84.
41. Paredes A, Bittner A, Vergara I. Compromiso de conciencia y bradicardia. *Rev Chil Cardiol*. 2018;37:55-57.
42. Cruz M, Castro, HJ, Caraballoso L, Martínez LF. Taquicardias ventriculares idiopáticas de las cúspides aórticas: Revisión del tema a propósito de un caso. *CorSalud*. 2018;10(1):80-88.
43. Sisson S. Anatomía de los animales domésticos. 4 ed. Edición Revisión. Editorial Pueblo y Educación. C. de la Habana. p. 696, 1974.

Received: 28 marzo 2020
Accepted: 10 junio 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Seasonal abundance and distribution of phytoplankton in Tanintharyi coastal waters, southern Myanmar

Khin Khin Gyi¹, Wint Thuzar Nwe², Zin Zin Zaw³ and Khin Khin San⁴

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.6

Abstract: The seasonal abundance and distribution of phytoplankton along the Tanintharyi coastal waters were investigated for 24 months from June 2013 to June 2015. A wide fluctuation in cell abundance 72,450-714,396 cells/l at Kawthaung, 47,416-947,501 cells/l at Myeik, 8,930-28,439 cells/l at Kampani, 8,976-17,888 cells/l at Ye and 5,162-16,986 cells/l at Setse were noted during the study period. Amongst, Kawthaung and Myeik stations had the highest phytoplankton abundance, whereas Ye and Setse stations showed remarkably lower abundance. It was noted that Ye and Setse stations were much influenced by freshwater discharge from the Thanlwin River, which deposited huge tons of sediments. The water clarity was lower at these stations compare with others. Therefore, turbidity may affect the occurrence and species abundance of phytoplankton. A clear seasonal trend was found at all five stations with a sharp increase in the pre-monsoon months and a gradual decrease in the monsoon and post-monsoon periods.

Key words: phytoplankton, Tanintharyi, water clarity, turbidity.

1203

Introduction

Seasonal replacements of phytoplankton abundance and composition differ in various environments¹. The values change in species composition, and a variety of environmental factors can mediate the dominance of phytoplankton. Also, the possible causes of the seasonal phytoplankton bloom correlated with the seasonal increase of nutrient supply that primarily increased the abundance of phytoplankton². Other processes, such as meteorological and hydrological events, may drive non-equilibrium dynamics and enhance species diversity³.

On the other hand, transient forms are superimposed to the spatial measurement in such a way that the recurrence and concentration of a specific occasion may shift concurring to the neighborhood morphometry, profundity, favoring, or not and species coexistence. Agreeing to asset competition hypothesis, species differing qualities are precisely corresponding to the number of assets that are restricting at a given time, though natural variance or unsettling influence improves the levels of diversity^{4,10}.

Species diversity, composition, distributions, and abundance of phytoplankton are the critical factors in ecology, directly linked with the regulation and functioning of the ecosystems that are used to assess the biological integrity of the water body⁵. Because the phytoplankton community composition impacts the functioning of the aquatic ecosystems and the global climate, it is essential to understand what factors govern the phytoplankton community assembly and the dynamics⁶. The objective of the study is to obtain a better understanding of the seasonal abundance and distribution of phytoplankton along the Tanintharyi coastline⁷.

along the Tanintharyi coastline, namely, Kawthaung (Lat. 9° 58. 204' N, Long. 98° 33. 701' E), Myeik (Lat. 12° 26. 186' N, Long. 98° 35. 461' E), Kampani (Lat. 14° 05. 288' N, Long. 98° 04. 143' E), Ye (Lat. 15° 11. 585' N, Long. 97° 47. 518' E) and Setse (Lat. 15° 56. 965' N, Long. 97° 36. 330' E) from June 2013 to June 2015 (Fig.1).

The sampling areas were influenced by the monsoon season. Therefore, a calendar year was divided into three seasons for ecological purposes. The division for three seasons was based on changes in the temperature in the annual cycle of the region. The seasons were recognized as the pre-monsoon period (February to May), the monsoon period (June to September) and the post-monsoon period (October to January).

Sample collection

A small-mesh phytoplankton net of 20 µm is used in the sample collection. The phytoplankton samples of the surface water were collected by a plastic bucket of known volume water, 60L. Then, the water passed through the mesh fixed to the bottom of a plastic cylinder. Care was taken to wash all the cells off the sieve. Samples were preserved immediately in a 1% formaldehyde solution for the species identification and counting.

Sample analysis

Sedgwick-Rafter counting chamber was used to count the phytoplankton following the method described by LeGresley and McDermott 2010⁷. Before analysis, the content in the sample bottle was turned gently for making the samples homogeneous. Three replicates of 1mL subsample were taken from a well-mixed sample by using a pipette, and the sample aliquot is then dispensed into the counting cell, and then placed under the light microscope at 40x and 10x magnification. The counting unit of all phytoplankton species is expressed in Cells/L.

Materials and methods

Sampling site

Phytoplankton samples were collected at the five stations

¹ Lecturer, Department of Marine Science, Mawlamyine University, Mon State, Myanmar.

² Assistant Lecturer, Department of Marine Science, Mawlamyine University, Mon State, Myanmar.

³ Lecturer, Department of Marine Science, Patheingyi University, Ayeyarwady Division, Myanmar.

⁴ Lecturer, Department of Marine Science, Sittoung University, Rakhine State, Myanmar.

Corresponding author: khinkhin.marinescience@gmail.com

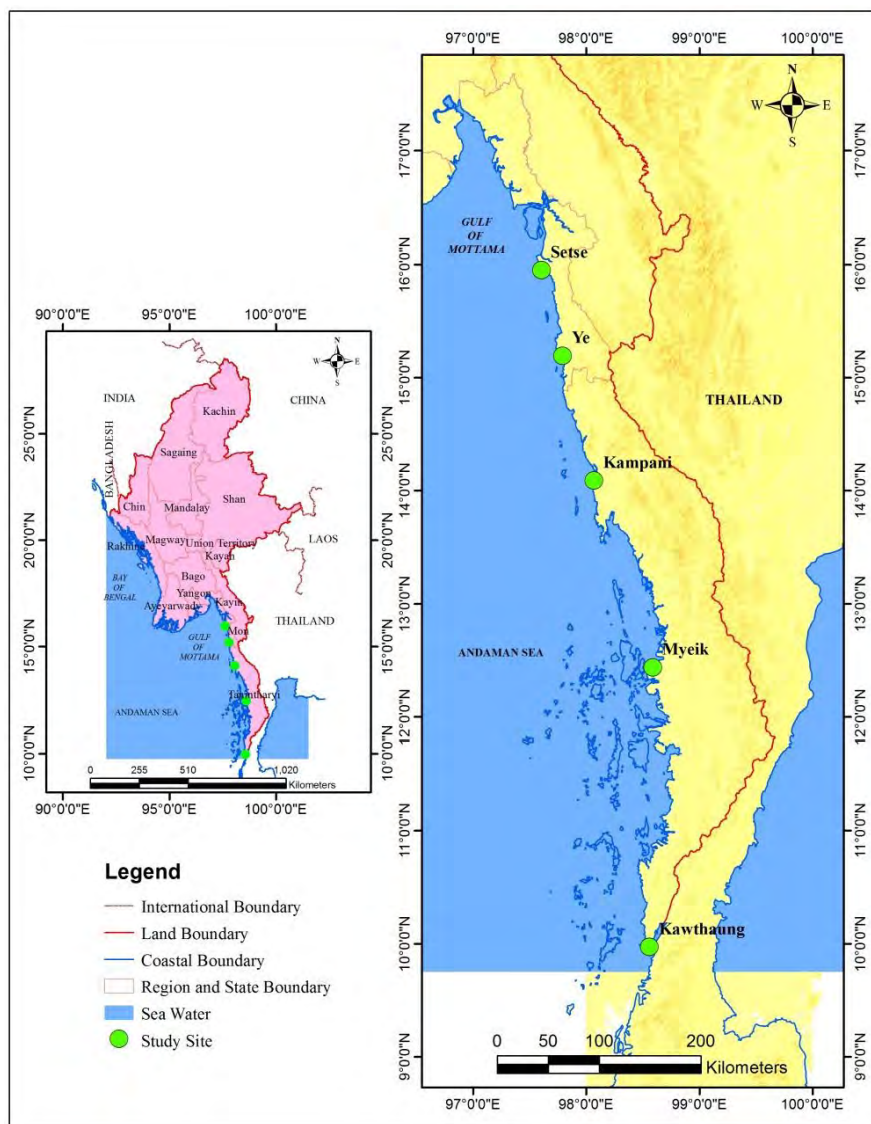


Figure 1. Map showing the sample collection sites in Taninthayi coastal waters.

Results

Kawthaung Station

The abundance of phytoplankton ranged from 72,450-714,396 Cells/L, was observed during the study period from June 2013 to June 2015. The maximum phytoplankton abundance, 714,396 Cells/L was noticed in the pre-monsoon period, especially in April (2015) which was followed by 624,999 Cells/L in April (2014), 493,976 Cells/L in May (2014) and 448,321 Cells/L in May (2015). In contrast, the minimum cell abundance 72,450 Cells/L, 79,000 Cells/L, and 94,862 Cells/L were observed in November (2013), December (2013), and (2014) of the post-monsoon period (Fig. 2).

During the study period, *Guinardia striata* (155,000 Cells/L), *Thalassionema nitzschioides* (147,583 Cells/L), *Hemiaulus sinensis* (135,000 Cells/L), *Lauderia annulata* (44,445 Cells/L), *Nitzschia seriata* (38,500 Cells/L), *Rhizosolenia setigera* (35,439 Cells/L), *Guinardia flaccida* (33,333 Cells/L), *Eucampia cornuta* (28,333 Cells/L), *Thalassiosira subtilis* (27,833 Cells/L), *Rhizosolenia imbricata* (23,333 Cells/L), *Bellerophon horologicalis* (21,667 Cells/L), *Odontella sinensis* (20,333 Cells/L), *Ditylum sol* (17,667 Cells/L), *Chaetoceros curvisetus* (17,444 Cells/L), *Thalassionema frauenfeldii* (15,500

Cells/L), *Melosira nummuloides* (13,333 Cells/L), *Chaetoceros subtilis* (10,833 Cells/L), *Rhizosolenia calcar-avis* (10,000 Cells/L) and *Ceratium furca* (5,334 Cells/L) were observed as dominant species in Kawthaung coastal waters. *Hyalodiscus subtilis*, *Planktoniella sol*, *Asteromphalus flabellatus*, *Biddulphia rhombus*, *Triceratium reticulum*, *Streptotheca indica*, *Syringidium americanum*, *Bacteriastrum hyalium* var. *princeps*, *Striatella unipunctata*, *Lyrella lyra*, *Campyloneis grevillei*, and *Metadinophysis sinensis* were rarely observed, 50-333 Cells/L.

Myeik Station

Phytoplankton abundance varied from 47,416 to 947,501 Cells/L. The maximum values 947,501 and 793,887 Cells/L were seen in April (2014) and (2015), which were followed by 543,892 and 426,379 Cells/L in May (2015 and 2014). In the following months of March (2014, 2015), June (2013, 2014, 2015), and July (2013, 2014), the cell numbers were recorded in the range between 312,248-398,491 Cells/L. Then, the numbers were continually dropped until post-monsoon months and reached the least value of 47,416 Cells/L in December (2013). During the study period, the abundance of phytoplankton was high in the pre-monsoon season, and the peak values were noticed in April, and then in February and May (Fig. 3).

Thalassionema nitzschioides (263,667 Cells/L), *Ditylum*

sol (142,167 Cells/L), *Melosira borreri* (120,833 Cells/L), *Bellerrochea horologicalis* (98,333 Cells/L), *Odontella sinensis* (61,000 Cells/L), *Thalassiosira subtilis* (58,333 Cells/L), *Rhizosolenia setigera* (53,583 Cells/L), *Nitzschia seriata* (41,333 Cells/L), *Lauderia annulata* (28,500 Cells/L), *Thalassionema frauenfeldii* (25,833), *Odontella mobiliensis* (19,667 Cells/L), *Hemiaulus sinensis* (18,167 Cells/L), *Cylindrotheca closterium* (13,667 Cells/L), *Ceratium furca* (13,333 Cells/L), *Nitzschia sigma* (10,917 Cells/L) and *N. longissima* (10,167 Cells/L) were plentifully collected during the study period. *Planktoniella sol*, *Eunotogramma laevis*, *Biddulphia biddulphiana*, *B. rhombus*, *Triceratium dubium*, *Streptotheca indica*, *Syringidium americanum*, *Centronella reicheltii*, *Lyrella lyra*, *Oestrupia musca*, *Amphora cymbifera*, *A. lineolata*, *Metadinophysis sinensis*, and *Cladopyxis hemibranchiata* were rarely observed.

Kampani Station

Phytoplankton abundance extended in the range between 8,930 and 28,439 Cells/L. The maximum abundance 24,358 Cells/L, 27,904 Cells/L, 21,978 Cells/L and 25,483 Cells/L, 28,439 Cells/L, 22,438 Cells/L were observed in pre-monsoon months, especially in March, April, and May of 2014 and 2015. During the monsoon period, the abundance fluctuated between 11,004 and 19,597 Cells/L. In contrast, the lowest number of 8,930 Cells/L was found in October 2013 of the post-monsoon period (Fig. 4).

During the study period, *Fragilaria capucina* (5,792 Cells/L), *Bacteriastrum delicatulum* (5,089 Cells/L), *Paralia sulcata* (4,700 Cells/L), *Bacteriastrum hyalinum* (4,644 Cells/L), *Thalassionema nitzschioides* (3,471 Cells/L), *Cylindrotheca closterium* (3,108 Cells/L), *Tabellaria fenestrata* (3,050 Cells/L), *Climacosphenia moniligera* (2,844 Cells/L), *Rhizosolenia imbricata* (2,833 Cells/L), *Ceratium furca* (2,778 Cells/L), *Prorocentrum micans* (2,461 Cells/L), *Cyclotella striata* (1,739 Cells/L), *Dictyocha finbula* (1,613 Cells/L), *Chaetoceros diversus* (1,250 Cells/L) and *Ditylum sol* (1,125 Cells/L) were abundantly collected. In contrast, *Druridgea compressa*, *Actinopteryx senarius*, *Streptotheca indica*, *Centronella reicheltii*, *Cymbella lanceolata*, *Oestrupia musca*, *Diploneis splendida*, *Amphora cymbifera*, *Plagiodiscus nervatus*, *Campylodiscus noricus*, *Metadinophysis sinensis*, *Cladopyxis hemibranchiata*, *Oxytoxum sceptrum*, *Podolampas palmipes*, and *Protoperidinium compressum* were rarely observed.

Ye Station

Phytoplankton abundance ranged between 8,976–17,888 Cells/L. The maximum number 17,888 Cells/L was found in April (2014) followed by 17,439 Cells/L in April (2015) and 16,967 Cells/L in May (2014) whereas the minimum number 8,976 was observed in October 2013, followed by 9,877 Cells/L in October 2014, respectively. A seasonal trend of phytoplankton abundance with decreased values was noted during the monsoon and post-monsoon periods. However, the numbers of phytoplankton were progressively increased and stretched to maximum abundance in April of the pre-monsoon period (Fig. 5).

The phytoplankton such as *Rhizosolenia setigera* (5,872 Cells/L), *Asterionellopsis glacialis* (4,078 Cells/L), *Skeletonema costatum* (3,583 Cells/L), *Fragilaria crotonensis* (2,894 Cells/L), *Ditylum sol* (2,106 Cells/L), *Prorocentrum micans* (1,892 Cells/L), *Cylindrotheca closterium* (1,672 Cells/L), *Thalassionema nitzschioides* (1,511 Cells/L), *Proboscia alata* (1,328 Cells/L), *Chaetoceros subtilis* (1,149 Cells/L), *Thalassiosira rotula* (1,083 Cells/L) and *Ceratium furca* (856 Cells/L)

were plentifully observed during the study period. Conversely, *Coscinodiscus asteromphalus*, *Triceratium favus*, *Syringidium americanum*, *Lithodesmium undulatum*, *Centronella reicheltii*, *Synedra unla*, *Cymbella lanceolata*, *Diploneis smithii*, *Pleurasigma pelagicum*, and *Gonyaulax spinifera* were rarely collected.

Setse Station

Phytoplankton abundance varied from 5,162 to 16,986 Cells/L. The maximum number 16,986 Cells/L was recorded in April (2015), followed by 16,935 Cells/L in April (2014) and 16,739 Cells/L in March (2015) of pre-monsoon months. On the other hand, the minimum abundance of 5,162 and 7,426 Cells/L were seen in the heavy rainfall months, especially in August (2013 and 2014). The number of phytoplankton again increased to 9,633–11,452 Cells/L in the post-monsoon period of October, November, and December 2013 and 2014 (Fig. 6).

Fragilaria crotonensis (5,944 Cells/L), *Ceratium furca* (4,442 Cells/L), *Thalassionema nitzschioides* (3,983 Cells/L), *Lauderia annulata* (3,542 Cells/L), *Dinophysis caudata* (2,146 Cells/L), *Prorocentrum micans* (2,100 Cells/L), *Cylindrotheca closterium* (1,694 Cells/L), *Nitzschia seriata* (1,675 Cells/L), *Chaetoceros densus* (1,529 Cells/L), *Ditylum sol* (1,217 Cells/L), *Thalassiosira subtilis* (1,083 Cells/L), *Thalassionema frauenfeldii* (1,033 Cells/L), *Odontella mobiliensis* (1,028 Cells/L), *Proboscia alata* (1,025 Cells/L), *Coscinodiscus lineatus* (838 Cells/L), *Chaetoceros lorenzianus* (838 Cells/L) and *Paralia sulcata* (769 Cells/L) were abundantly seen during sampling periods. In contrast, *Asteromphalus cleveanus*, *Rhizosolenia setigera*, *Bacteriastrum varians*, *Climacosphenia moniligera*, *Grammatophora marina*, *Surirella ovalis*, and *Ceratium tripos* were hardly seen during the study period.

Discussion

The present study was mainly emphasized on the seasonal variations of phytoplankton abundance at the five stations of Tanintharyi coastal waters, namely, Kawthaung, Myeik, Kampani, Ye and Setse. A wide fluctuation in cell abundance was noted at all stations such as 72,450–714,396 Cells/L at Kawthaung, 47,416–947,501 Cells/L at Myeik, 8,930–28,439 Cells/L at Kampani, 8,976–17,888 Cells/L at Ye and 5,162–16,986 Cells/L at Setse, respectively. The highest cell abundance was observed at Kawthaung and Myeik whereas the least abundance was detected in Ye and Setse stations. It was noted that a clear seasonal trend in phytoplankton abundance was seen at all five stations with a sharp peak in the pre-monsoon period, especially in April, after that a gradual decrease in monsoon and post-monsoon periods.

The 42 common phytoplankton species observed at Tanintharyi coastal waters were *Melosira nummuloides*, *M. borreri*, *Thalassiosira subtilis*, *T. rotula*, *Skeletonema costatum*, *Paralia sulcata*, *Cyclotella striata*, *Lauderia annulata*, *Coscinodiscus lineatus*, *C. radiatus*, *Odontella sinensis*, *O. mobiliensis*, *Eucampia cornuta*, *Hemiaulus sinensis*, *Bellerrochea horologicalis*, *Ditylum sol*, *Rhizosolenia imbricata*, *R. setigera*, *Proboscia alata*, *Guinardia striata*, *G. flaccida*, *Bacteriastrum delicatulum*, *B. hyalinum*, *Chaetoceros curvisetus*, *C. diversus*, *C. densus*, *C. lorenzianus*, *C. subtilis*, *Asterionellopsis glacialis*, *Fragilaria crotonensis*, *F. capucina*, *Tabellaria fenestrata*, *Climacosphenia moniligera*, *Thalassionema nitzschioides*, *T. frauenfeldii*, *Nitzschia sigma*, *N. longissima*, *N. seriata*, *Cylindrotheca closterium*, *Prorocentrum micans*, *Dinophysis caudata*, and *Ceratium furca*. Taylor 1975⁸ reported *Guinardia flaccida* was noted as the predominant diatom species in Thailand which was in agreement with the present result



Figura 2. Monthly variations of phytoplankton abundance (Cells/L) at Kawthaung station from June 2013 to June 2015.



Figura 3. Monthly variations of phytoplankton abundance (Cells/L) at Myeik station from June 2013 to June 2015.



Figura 4. Monthly variations of phytoplankton abundance (Cells/L) at Kampani station from June 2013 to June 2015.



Figura 5. Monthly variations of phytoplankton abundance (Cells/L) at Ye station from June 2013 to June 2015.



Figure 6. Monthly variations of phytoplankton abundance (Cells/L) at Setse stations from June 2013 to June 2015.

found at Kawthaung station. *Thalassionema nitzschioides* and *T. frauenfeldii* were abundantly seen at Tanintharyi waters throughout the present study period agrees well with the finding of Kamba and Yuki 1980⁵. Aquino *et al.* 2015¹ reported *Odontella mobiliensis*, *Chaetoceros subtilis*, *Thalassionema nitzschioides*, *Gyrosigma balticum*, *Bacillaria paxillifera*, *Cylindrotheca closterium*, and *Nitzschia lorenziana* were the widespread species in the Passos River estuary, Brazil. That result coincided with the present investigation. Moreover, our findings of dominant phytoplankton species in Tanintharyi coastal waters were similar to the results reported by Khin Yu Nwe 2011⁶, Yin Yin Htay 2014¹¹, and 2019¹². Zar Ni Ko Ko 2014¹³ reported *Coscinodiscus*, *Hemidiscus*, *Rhizosolenia*, *Proboscia*, *Guinardia*, *Eucampia*, *Ditylum*, *Odontella*, *Thalassionema*, *Nitzschia*, *Dinophysis*, and *Prorocentrum* were abundantly found in Elphinstone Island waters, Myeik Archipelago. His finding was in agreement with the present study. In his study, phytoplankton abundance was high in November and low in August. However, in the present study, the seasonal trend indicated the highest abundance in April and the lowest in December at Myeik area.

Zaw Moe Aung 2011¹⁴ described *Coscinodiscus*, *Odontella*, *Ditylum*, *Nitzschia*, and *Ceratium* species were very common in Setse waters. Moreover, Aung Myo Hsan 2013² reported *Coscinodiscus marginatus*, *C. radiatus*, *Minidiscus trioculatus*, *Cyclotella striata*, *Skeletonema costatum*, *Leptocylindrus danicus*, *Syringidium americanum*, *Thalassionema nitzschioides*, and *T. frauenfeldii* were frequently observed in Thanlwin River mouth to Setse at Mon coastal waters and high phytoplankton abundance was recorded in the pre-monsoon months. The present result agrees well with their statements. Besides, Thida Nyunt 2013⁹ reported phytoplankton abundance was high from November to May (post-monsoon to pre-monsoon) in Mon coastal waters. Her observation was much similar to the present study.

Phytoplankton communities at the five stations along Tanintharyi coastline, viz., Kawthaung, Myeik, Kampani, Ye, and Setse showed noticeable variations in cell abundance. The maximum cell abundance of phytoplankton was found in pre-monsoon months at all stations which were noted that a mesotrophic environment favor species richness and density.

Conclusions

Phytoplankton community in Tanintharyi coastal waters showed noticeable variations in species occurrence and abundance, space, and time. The present study observed the highest phytoplankton abundance in the pre-monsoon season at all five stations. An extensive variation in phytoplankton abundance was detected in the monsoon through earlier months of post-monsoon periods due to significant variations in environmental parameters that were strongly affected by monsoon season in the Indian Ocean. Phytoplankton abundance at Kawthaung and Myeik recorded as maximum among five stations because of more diverse kinds and frequently occurring phytoplankton species at these water columns. The existence of mangrove forests and the creation of tide shelter by a chain of numerous islands also support high species diversity of phytoplankton at Kawthaung, Myeik, and Kampani stations compare with Ye and Setse stations where less diverse phytoplankton species were found.

soon periods due to significant variations in environmental parameters that were strongly affected by monsoon season in the Indian Ocean. Phytoplankton abundance at Kawthaung and Myeik recorded as maximum among five stations because of more diverse kinds and frequently occurring phytoplankton species at these water columns. The existence of mangrove forests and the creation of tide shelter by a chain of numerous islands also support high species diversity of phytoplankton at Kawthaung, Myeik, and Kampani stations compare with Ye and Setse stations where less diverse phytoplankton species were found.

Acknowledgements

The authors deeply indebted to Dr. Aung Myat Kyaw Sein, Rector of Mawlamyine University, and Dr. San San Aye, Pro-Rector of Mawlamyine University, for their permission to undertake this research. We wish to thank Dr. Khin Maung Cho, Pro-Rector (Retd.), Mawlamyine University, for his kind suggestions in preparing the manuscript. Special thanks are to the Department of Marine Science, Mawlamyine University for providing lab facilities.

Funding

None.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Bibliographic references

1. Aquino, E.P., Figueiredo, L.G.P., Borges, G.C.P., Ferreira, L.C., Passavante, J.Z.D.O., Gloria, M.D. and Silva-Cunha, G.D. Seasonal and spatial variation in phytoplankton community structure of an estuary in Northeastern Brazil. *Tropical Ecology*. 2015. 56(1): 125-131.
2. Aung Myo Hsan. A study on the occurrence and abundance of phytoplankton along the Thanlwin river mouth. MRes Thesis. Department of Marine Science, Mawlamyine University. 2013. 166 pp.
3. Dussaram, K. Variation in the phytoplankton abundance, biomass and diversity of first-order streams having different upstream habitats. Department of Limnology, Institute of Ecology and Evolution, Uppsala University. 2007. 46 pp.
4. Hutchinson, G.E. The paradox of the plankton. *The American Naturalist*. 1961. 95(882):137-145.
5. Kamba, M. and Yuki, K. Plankton of Burmese coasts. Institute of Oceanic Research and Development. Tokai University. 1980. 2: 89-142.
6. Khin Yu Nwe. Study on the species identification, composition, distribution and abundance of phytoplankton from Myeik adjacent waters. Unpublished MRes Thesis. Department of Marine Science, Myeik University. 2011. 108 pp.

7. LeGresley, M. and McDermott, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis: hemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (Eds.) Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. IOC Manuals and Guides no.55. 2010. 25-30.
8. Taylor, F.J.R. The phytoplankton of water adjacent to a tropical Asian mangrove area. A report to UNESCO. 1975. 32 pp.
9. Thida Nyunt. Phytoplankton communities in Mon coastal waters. PhD Thesis. Department of Marine Science, Mawlamyine University. 2013. 282 pp.
10. Tilman, D. Resource competition and community structure. Monographs in Population Biology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1982. 17: 1-296.
11. Yin Yin Htay. Ecology of phytoplankton communities in Myeik coastal waters. PhD Thesis, Department of Marine Science, Mawlamyine University. 2014. 501 pp.
12. Yin Yin Htay, Tin Tin Kyu and Moe Lwin Lwin. Species composition and distribution of some phytoplankton in Myeik Archipelago, southern Myanmar. 2019. Journal of Aquaculture & Marine Biology. 8(5): 163-169.
13. Zar Ni Ko Ko. Study on the phytoplankton common in the Elphin-stone Island waters area, Myeik Archipelago. MRes Thesis. Department of Marine Science, Myeik University. 2014. 121 pp.
14. Zaw Moe Aung. Studies on the primary productivity of marine phytoplankton in Setse waters. MRes Thesis, Department of Marine Science, Mawlamyine University. 2011. 98 pp.

Received: 24 April 2020

Accepted: 15 June 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba

Phytochemical screening of extracts obtained from the *Sapindus saponaria* L plant that grows in Cuba

Anairis Pujol García^{1a*}, Beatriz Tamargo^{1b}, Eva Salas¹, Camilo Calzadilla¹, Reinaldo Acevedo¹, Gustavo Sierra²

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.7

Resumen: Las plantas medicinales son consideradas una fuente importante de componentes biológicamente activos, que pueden ser usados en el tratamiento de disímiles enfermedades. En particular el potencial medicinal del género *Sapindus* L. ha sido estudiado por autores de varios países y dentro de este género, la especie *Sapindus saponaria* L se ha aplicado en el tratamiento de diversas enfermedades. Para la especie *S. saponaria* L se refieren 32 usos y 14 efectos biológicos comprobados. Dentro de los efectos biológicos más referenciados están acaricida, antihemorrágico, anti protozoario, antiulceroso, citotóxico, molusquicida y nematocida. Además, el pericarpio del fruto es la parte más empleada, aunque también se han empleado las hojas, ramas, corteza y semillas. Los principales efectos biológicos se encuentran relacionados con elevados contenidos de saponinas y flavonoides en los extractos obtenidos de diferentes partes de la planta. El objetivo de este trabajo es determinar los principales componentes de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba mediante el tamizaje fitoquímico de las diferentes partes de la planta. Para ello, se realizó una marcha experimental con extracciones alcohólicas y acuosas del pericarpio del fruto, la corteza del tallo y hojas de la planta. Los resultados del tamizaje en ambas extracciones y análisis de componentes revelaron que el pericarpio del fruto y hojas son ricas en flavonoides mientras que el pericarpio del fruto posee un alto contenido de saponinas. La composición de *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba es similar a la composición de *S. saponarias* que crecen en otras regiones de Latinoamérica.

Palabras clave: *Sapindus saponaria* L, saponinas, flavonoides, tamizaje fitoquímico.

Abstract: Medicinal plants are considered an essential source of biologically active components, which can be used in the treatment of different diseases. In particular, the medicinal potential of the genus *Sapindus* L. has been studied by authors from various countries, and within this genus, the species *Sapindus saponaria* L has been applied in the treatment of various diseases. For the *S. saponaria* L species, 32 uses and 14 proven biological effects refer. Among the most referenced biological effects are acaricide, antihemorrhagic, anti-protozoan, antiulcer, cytotoxic, molluscicide, and nematocidal. Besides, the pericarp of the fruit is the most used part, although the leaves, branches, bark, and seeds have also been used. The main biological effects are related to the high content of saponins and flavonoids in the extracts obtained from different parts of the plant. The objective of this work is to determine the main components of the *Sapindus saponaria* L plant that grows in Cuba, employing phytochemical screening of the different parts of the plant. For this, an experimental run was carried out with alcoholic and aqueous extractions of the fruit pericarp, the stem bark, and leaves of the plant. The results of the screening in both extractions and component analysis revealed that the rind of the fruit and leaves are rich in flavonoids while the pericarp of the fruit has a high content of saponins. The composition of *Sapindus saponaria* L that grows in Cuba is similar to the composition of *S. Saponaria* that grow in other regions of Latin America.

Key words: *Sapindus saponaria* L, saponins, flavonoids, phytochemical screening.

Introducción

Sapindus saponaria L. es un árbol que puede alcanzar tamaño de 18-20 metros de altura, aunque comúnmente en zonas urbanas alcanza una altura de aproximadamente 12 metros. Posee un tronco más o menos cilíndrico con diámetros de 40-45 cm, de corteza color gris claro, lenticelada cuando joven, un poco lisa, con pequeñas oquedades, tornándose finalmente agrietada y escamosa en el estado adulto. Posee una copa globosa e irregular con amplitud de 8-10 m. La *Sapindus saponaria* L. originaria de América tropical, se distribuye desde el sur de Estados Unidos, Centroamérica, Venezuela, Ecuador, Perú, Colombia y Brasil. Ha sido introducida además en los trópicos del viejo mundo, a las islas Filipinas, parte de Oceanía y el oeste de la India. En Colombia se encuentra en los cañones de los ríos Patía, Chicamocha, Cauca y además en el valle del

río Magdalena¹, mientras que en Cuba abunda en las sabanas arcillosas del sur de Pinar del Río².

En las hojas y en los tallos de *Sapindus saponaria* L. se han detectado los flavonoides, luteolín y rutín y la presencia de saponinas y taninos en el pericarpio del fruto. La semilla contiene los triterpenos y el esteroide beta-sitosterol. En las partes aéreas se han detectado el stigmasterol, el ácido oleanólico, la luteolina, el orientin, el isoorientin, la luteolina-7-O- β -glucuronido y la rutina³.

Sobre la base de lo antes planteado este trabajo tiene como objetivo: determinar los principales componentes de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba mediante el tamizaje fitoquímico de las diferentes partes de la planta.

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba.

² Grupo de las Industrias de la Biotecnología y Farmaceuticas de Cuba (BioCubafarma). La Habana. Cuba.

Materiales y métodos

Recolección y preparación del material vegetal

El material vegetal se colectó en el área del Bosque Semcaducifolio del Jardín Botánico Nacional. Se recolectaron los frutos, la corteza del tallo y las hojas. Una parte de la muestra se depositó en el herbario del Jardín Botánico Nacional para la posterior herborización de la planta.

Las partes del material vegetal afectadas por insectos o con signos de daño se desecharon, las otras se lavaron con abundante agua corriente para eliminar los restos de tierra, seguido de tratamiento con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 a 10 minutos y enjuague posterior con abundante agua destilada. A continuación se secaron sobre papel de filtro a temperatura ambiente y se conservaron en una desecadora para su posterior procesamiento y análisis.

Tamizaje fitoquímico y preparación de los extractos

El material vegetal, hojas, pericarpio del fruto y corteza del fruto, fue procesado de forma independiente para la preparación de los extractos. Las hojas secas fueron molidas en molino de cuchillas, mientras que el pericarpio y tallos se maceraron hasta obtener una masa homogénea que se pesó, utilizando una balanza analítica (Sartorius AG, China). Para la extracción e identificación de los metabolitos secundarios en los extractos, se siguió la marcha experimental que se propone en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Universidad de la Habana⁴. La figura 1 resume en un diagrama dicha marcha, que, brevemente, consistió en una extracción secuencial de los componentes en el material vegetal utilizando inicialmente éter etílico, etanol y finalmente agua.

Ensayos para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios

La identificación cualitativa de los metabolitos secundarios en los diferentes extractos (etéreos, alcohólicos y acuosos) de las partes de la planta estudiadas, se realizó siguiendo

los procedimientos del Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Universidad de la Habana⁴ como se muestra continuación:

Determinación de alcaloides. Ensayo de Dragendorff.

Se tomó una alícuota del extracto y se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado. Se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta que el pH se tornó en valores ácidos, posteriormente se añadieron 3 gotas del reactivo de *Dragendorff*. Los resultados del ensayo se consideraron positivos si se apreciaron las siguientes características: Opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Determinación de azúcares reductores. Ensayo de Fehling.

Se adicionó a una alícuota del extracto 2 mL de reactivo y se calentó en baño de agua de 5 a 10 minutos. El ensayo se consideró positivo (+++) si la solución tomó coloración roja o apareció un precipitado rojo.

Determinación de saponinas. Ensayo de la espuma

Se tomó una alícuota del extracto y se diluyó en 5 veces su volumen en agua, agitándose fuertemente el tubo de ensayo, de 5 a 10 minutos. El ensayo se consideró positivo (+++) si apareció una espuma de 2 mm de espesor como mínimo y persistente por más de 2 minutos.

Determinación de flavonoides. Ensayo de Shinoda.

Se tomó una alícuota del extracto y se añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña porción de cinta de magnesio metálico. Después de 5 minutos se añadió 1 mL de alcohol amílico. Se consideró un ensayo positivo (+++) cuando el alcohol amílico se coloreó de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso en todos los casos.

Determinación de compuestos fenólicos y/o taninos. Ensayo de cloruro férrico.

A una alícuota del extracto se añadió acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de una solución de tricloruro férrico.

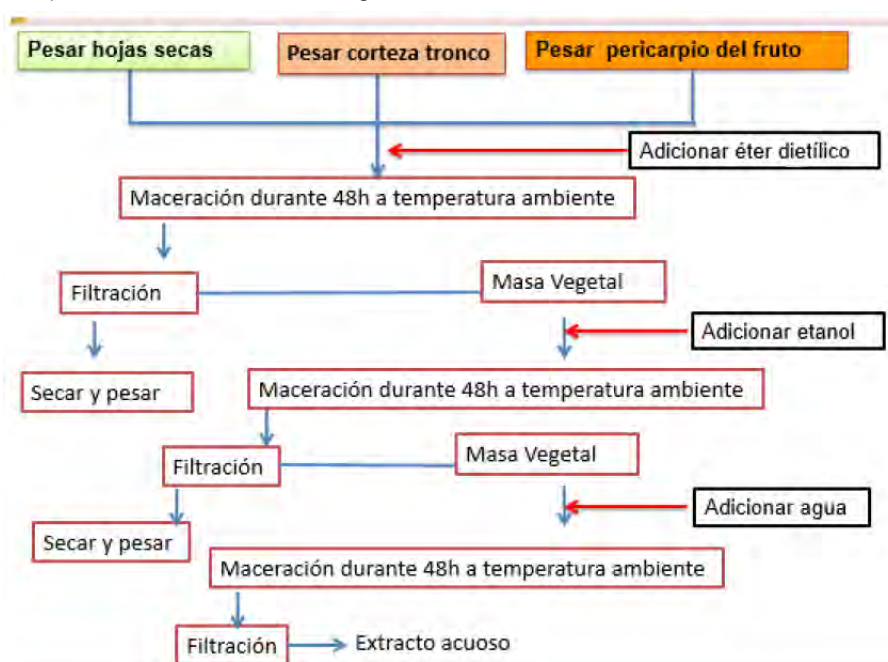


Figura 1. Diagrama que resume la marcha experimental del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de *Sapindus saponaria* L., que crece en Cuba

co al 5% en solución salina fisiológica. El ensayo se consideró positivo (+++) para compuestos fenólicos en general, al observarse un cambio de coloración a rojo-vino; para taninos del tipo pirocatecólicos una coloración verde intensa y para taninos del tipo pirogalotánicos una coloración azul.

Determinación de secuencia C6-C3-C6 en flavonoides. Ensayo de antocianidina.

Se calentaron 2 mL del extracto alcohólico por 10 min con 1 mL de HCl concentrado. Se dejó enfriar y se adicionó 1 mL de H₂O y 2 mL de alcohol amílico. Se agitó y se dejaron separar las dos fases. La aparición de coloración roja o marrón en la fase amílica indica que el ensayo es positivo

Determinación de estructuras del tipo polisacarídicas. Ensayo de mucílagos.

Una alícuota del extracto se enfrió a una temperatura de 0°C a 5°C y se observó si la solución tomó una consistencia gelatinosa. El ensayo se consideró positivo (+++) si la muestra tomó consistencia gelatinosa.

Determinación de triterpenos y esteroides. Ensayo de Liebermann-Burchard.

Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejaron caer 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. El ensayo es positivo si el cambio de coloración es rápido; de rosado a azul muy rápido (+++), a verde intenso visible rápido (++), a verde oscuro-negro al final de la reacción (+).

Este método permite diferenciar las estructuras esteroideas de las triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que en las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.

Determinación de aminoácidos libres o aminas. Ensayo de Ninhidrina.

Se tomó una alícuota del extracto alcohólico se mezcló con 2 mL de solución de Ninhidrina al 2 % en agua. La mezcla se calentó 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla una coloración azul violácea.

Determinación de Quinonas. Ensayo de Bornetanger.

Se evaporó el extracto alcohólico en baño de agua y el residuo se re-disolvió en 1 mL de cloroformo, luego se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5 % en agua, posteriormente se agitó mezclando las fases, y se dejó en reposo hasta su separación. El ensayo se considera positivo si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado (++) o rojo (+++).

Cuantificación de Saponinas

Ensayo de hemólisis de eritrocitos

La determinación cuantitativa de saponinas en los extractos se realizó modificando la técnica descrita en el protocolo "Red Blood Cell Test System" y adaptada por Tamargo y Sierra⁵.

Obtención y preparación de la sangre

La sangre fue colectada de carneros saludables procedentes del CENPALAB, se utilizó tubos plásticos de centrifuga (Corning, EUA) que contenían 5 mL de tampón citrato en los cuales se adicionaron 45 mL de sangre por cada uno, se homogeneizó suave, para obtener a última hora una concentración 1:10 citrato: sangre.

Aislamiento de los eritrocitos y obtención de la suspensión

Se centrifugaron 2 mL de sangre a 1500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, se aplicó una centrifuga para viales Eppendorf (Heraeus, Alemania). Se extrajo el sobrenadante de la superficie al cuidado y el precipitado se lavó 4 veces con Tampón Fosfato Salino isotónico, pH 7,4 (TFSi). La determinación del número de eritrocitos en suspensión se realizó mediante conteo en cámara de Neubauer, para lo cual se tomó un alícuota de la suspensión de eritrocitos, se realizaron diluciones seriadas hasta 1/100 000 en TFSi, se calculó el número total de células para 1 mL de la suspensión y finalmente el volumen necesario para obtener 8×10^9 células en suspensión.

Preparación de las muestras

Se disolvió cada una de las muestras liofilizadas de los extractos de tallo, semilla y fruto en el volumen de TFSi necesario para obtener disoluciones a concentraciones de 1 mg/mL en cada caso. Paralelo se preparó una disolución de saponina patrón (SIGMA, EUA) Quillaja saponaria Molina a una concentración de 0,5 mg/mL en TFSi.

Procedimiento del ensayo

En viales independientes Eppendorf de 1,5 mL se pipetearon los volúmenes siguientes de cada muestra de extracto y de la saponina patrón al respecto: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μ L. Detrás se completó cada vial con TFSi hasta alcanzar un volumen final de 975 μ L. En otros dos viales independientes se añadieron 975 μ L de agua destilada y 975 μ L de TFSi, para obtener el 100 % y el 0 % de hemólisis, respectivamente. A continuación se añadió una alícuota de 25 μ L de la suspensión de eritrocitos que contenía un aproximado de 8×10^9 células/mL a cada vial y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, se agitó suave, en una zaranda (Stuart Scientific, Inglaterra). De seguida, se centrifugaron a 1500 x g durante un minuto, 300 μ L del sobrenadante, se depositaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar) y en conclusión se determinó la absorbancia de las muestras y el patrón a 540 nm, en un lector de placas (Amersham, EUA).

Resultados y discusión

El tamizaje fitoquímico se basa fundamentalmente en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, a través de reacciones y análisis químicos bien descritos en la literatura. El tamizaje fitoquímico se le realiza consecutivamente a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural con el fin de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada disolvente de diferentes polaridades.

Los resultados de los tamizajes fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de *S. saponaria* L que crece en Cuba se muestran en la tabla 1.

En los tamizajes fitoquímicos realizados a las hojas con los 3 disolventes utilizados, se sugiere la presencia de abundantes compuestos grasos, alcaloides, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, pues con el ensayo de cloruro férrico se apreció el desarrollo de una coloración verde intensa como está descrito para un resultado positivo para taninos pirocatecólicos, aminoácidos libres o aminas, flavonoides, antocianinas y principios amargos. No se detectan agrupamientos lactónicos, catequinas, glicósidos cardiotónicos, mucílagos, triterpenos/esteroides, quinonas, benzoquinonas ni resinas

Hojas de <i>Sapindus saponaria</i> L.		Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Ensayos	Metabolitos	Resultados		
Sudán	Compuestos grasos	+++	X	X
Dragendorff	Alcaloides	-	+++	+++
Baljet	Agrupamiento lactónico	-	-	X
Liebermann. B	Triterpenos/esteroides	-	-	X
Catequinas	Catequinas	X	-	X
Resinas	Resinas	X	-	-
Fehling	Azúcares reductores	X	+++	+++
Espuma	Saponinas	X	+++	+++
Cloruro Fe	Compuestos fenólicos	X	+++	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres ó aminas	X	-	+++
Borntrager	Quinonas benzoquino	X	-	X
Shinoda	Flavonoides	X	+++	+++
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	X	-	X
Antocianidina	Antocianinas	X	+++	X
Mucilagos	Mucilagos	X	X	-
Principios amargos	Principios amargos	X	X	+++

Leyenda: + Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado, X No realizado.

Tabla 1. Resultado del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de las hojas de *Sapindus saponaria* L., que crece en Cuba.

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de la corteza del tallo de *Sapindus saponaria* L., que crece en Cuba.

Corteza del tallo de <i>Sapindus saponaria</i> L.		Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Ensayos	Metabolitos	Resultados		
Sudan	Compuestos grasos	+++	X	X
Dragendorff	Alcaloides	-	+++	+
Baljet	Agrupamiento lactónico	+++	-	X
Liebermann. B	Triterpenos/esteroides	-	-	X
Catequinas	Catequinas	X	-	X
Resinas	Resinas	X	+++	-
Fehling	Azúcares reductores	X	+++	+++
Espuma	Saponinas	X	+++	+
Cloruro Fe	Compuestos fenólicos	X	+++	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres ó aminas	X	+++	X
Borntrager	Quinonas benzoquino	X	-	X
Shinoda	Flavonoides	X	+++	+++
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	X	-	X
Antocianidina	Antocianinas	X	+++	X
Mucilagos	Mucilagos	X	X	-
Principios amargos	Principios amargos	X	X	+

Leyenda: + Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado, X No realizado.

Los resultados de los tamizajes fitoquímicos de los extractos de la corteza del tallo antes de liofilizar se muestran en la tabla 2.

En los tamizajes fitoquímicos realizados a la corteza del tallo con los 3 disolventes utilizados, se sugiere la presencia de abundantes compuestos grasos, alcaloides, azúcares reductores, agrupamientos lactónicos, aminoácidos libres o aminas, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y resinas. Se detectaron escasos principios amargos. No se detectan catequinas, triterpenos/esteroides, quinonas benzoquinonas, mucilagos, principios amargos ni glicósidos cardiotónicos.

Los resultados de los tamizajes fitoquímicos de los extrac-

tos etéreo, alcohólico y acuoso del pericarpio del fruto se muestran en la tabla 3.

En los tamizajes fitoquímicos realizados a los extractos de *Sapindus saponaria* L. del pericarpio del fruto con los 3 disolventes utilizados, se sugiere la presencia de azúcares reductores, aminoácidos libres o aminas, saponinas, taninos, pirocatecolicos, flavonoides y triterpenos/esteroides, este último solo para el extracto con éter dietílico.

Por otro lado, no se detectan compuestos grasos, alcaloides, agrupamientos lactónicos y catequinas, ni glicósidos cardiotónicos.

Pericarpio del fruto de <i>Sapindus saponaria</i> L.		Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Ensayos	Metabolitos	Resultados		
Sudan	Compuestos grasos	+	X	-
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-
Baljet	Agrupamiento lactónico	-	-	-
Libermann. B	Triterpenos/esteroides	+++	+	-
Catequinas	Catequinas	X	-	-
Resinas	Resinas	X	+++	+++
Fehling	Azúcares reductores	X	+++	+++
Espuma	Saponinas	X	+++	+++
Cloruro Fe	Compuestos fenólicos	X	+++	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres ó aminas	X	+++	++
Borntrager	Quinonas benzoquinó	X	-	-
Shinoda	Flavonoides	X	-	-
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	X	-	-
Antocianidina	Antocianinas	X	-	-

Leyenda: + Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, +++ Presencia abundante, No detectado, X No realizado.

Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del pericarpio del fruto de *Sapindus saponaria* L. que crece en Cuba.

Ensayo de Hemólisis

El ensayo de hemólisis, también conocido como ensayo de fragilidad osmótica, analiza el efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica. Las saponinas pueden producir hemólisis a grandes diluciones, por lo que resultan tóxicas para el ser humano administradas directamente al torrente sanguíneo⁶.

La figura 2 muestra las gráficas de actividad hemolítica en % versus el logaritmo de concentración de cada uno de los extractos liofilizados de pericarpio del fruto, hojas y corteza del tallo de Jaboncillo.

La actividad hemolítica sobre los eritrocitos de carnero, de los extractos acuosos de Jaboncillo liofilizados, preparados a una concentración de 1mg/mL en TFSi, es dependiente de la concentración del extracto, por tanto, a mayor concentración, mayor actividad hemolítica.

El extracto del pericarpio del fruto fue el que mostró mayor actividad hemolítica media (CH50), siendo la concentración de 101,4 µg/mL la que provoca el 50% de hemólisis de los eritrocitos de carnero. Mientras que, los extractos de las hojas y de la corteza del tallo no provocan la hemólisis de los eritrocitos, al menos en las concentraciones ensayadas.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el tamizaje fitoquímico donde se obtuvo que, el extracto del pe-

ricarpio del fruto posee mayor cantidad de saponinas (referido a la prueba de la espuma) mientras que, en los extractos de hojas y de corteza del tallo, se detectaron las saponinas en menor cantidad.

Los resultados obtenidos coinciden con los de Díaz, 2015⁷, cuando analizó la actividad hemolítica de extractos de semillas de *Chenopodium quinoa* W. y demostró que a mayor concentración de saponinas es mayor la actividad hemolítica media.

Por otro lado los resultados de la evaluación de la CH50 de los extractos de la *S. saponaria* L que crece en Cuba, difieren con los obtenidos por Mena⁸, que al analizar extractos acuosos de pericarpio del fruto, semillas y corteza del tallo de la planta *Sapindus saponaria* L., que crece en Ecuador en la provincia de Manabí, encontró que los extracto del pericarpio del fruto, semilla y corteza del tallo causaron el 50% de hemólisis de los eritrocitos a concentraciones mucho menores (1,72, 59,5 y 150,9 µg/mL respectivamente) que los encontrados, para los extractos acuosos del pericarpio del fruto y de la corteza del tallo de la planta que crece en Cuba, preparados a la misma concentración (1mg/mL). Por lo que, los extractos de Jaboncillo que crece en Ecuador resultaron tener mayor cantidad de saponinas y ser en correspondencia con ello, más hemotóxicos que los de la misma planta recolectada en nuestro

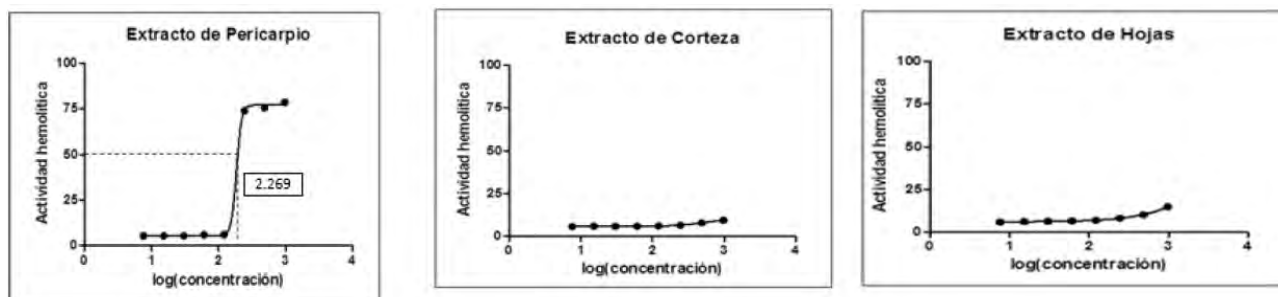


Figura 2. Actividad hemolítica media de extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L., que crece en Cuba.

país. La diferencia entre los resultados encontrados pudiera deberse a que las condiciones climáticas, altitud, composición de nutrientes del suelo, luz solar y otros factores que inciden en la producción de los metabolitos secundarios de las plantas, no son las mismas por tanto en condiciones diferentes de crecimiento, las plantas no producen los mismos metabolitos secundarios, ni en las mismas proporciones⁹.

Si bien las propiedades surfactantes de las saponinas favorecen el uso popular de estas especies, también le confieren una actividad biológica muy peculiar que es la capacidad de destruir las membranas de los eritrocitos y causar la hemólisis de los mismos. Tal efecto fue observado para los extractos acuosos del pericarpio del fruto y en menor medida en el de las hojas y corteza del tallo de *Sapindus saponaria* L. evaluados en este trabajo y mostrado los resultados en la figura 2. La actividad hemolítica ha sido observada por muchos investigadores no solo para los extractos de *Sapindus saponaria* L. sino también para extractos de otras plantas que igual a esta son ricas en saponinas ya sean esteroidales o triterpénicas⁵.

Conclusiones

Como consideraciones finales de este trabajo debemos decir que el tamizaje fitoquímico mostró la presencia de metabolitos secundarios en hojas, corteza del tallo y pericarpio del fruto de la planta siendo, los de mayor abundancia saponinas, flavonoides, azúcares reductores y taninos, lo cual pudiera estar relacionado con las propiedades medicinales que se le atribuyen a la planta^{10,11}. Así mismo, las saponinas y flavonoides son los metabolitos secundarios de mayor representatividad en todos los extractos acuosos de las partes de la planta, siendo más abundante las saponinas en el pericarpio del fruto y los flavonoides en las hojas.

Teniendo en cuenta la composición de los extractos se plantean promisorias las evaluaciones farmacológicas de la planta *Sapindus saponaria* L. que crece en Cuba ante diversas patologías.

Referencias bibliográficas

1. Cogollo KA. Bondades del fruto del jaboncillo (*Sapindus saponaria*) como un detergente biodegradable [Tesis de pregrado]. Instituto Alexander Von Humboldt: Departamento de Ciencias Básicas. Barranquilla, Colombia; 2008.
2. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba, Segunda edición. Editorial Científico Técnica. La Habana; 2012.
3. Tomás G, Huamán J, Aguirre R, Barrera T. Extracción y clasificación de la saponina del *Sapindus saponaria*. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, 2014; 13 (2): 36-39.
4. Miranda, M C. Manual de prácticas de laboratorio, farmacognosia y productos naturales. Universidad de la Habana, 2000
5. Tamargo B, Sierra GV. *Sapindus saponaria* L. Actividad antiproliferativa: Extractos acuosos de la planta *Sapindus saponaria* L. Metabolitos secundarios y actividad antiproliferativa. Editorial Académica Española; 2016.
6. Lorent JH, Quetin J, Mingeot MP. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. Org Biomol Chem. 2014; 12(44): 8803-22.
7. Díaz L. Saponinas y otros metabolitos secundarios en semillas de *Chenopodium quinoa* [Tesis de pregrado]. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, Cuba; 2015.
8. Mena L. Actividad hemolítica y antiproliferativa de los extractos acuosos de la planta *Sapindus saponaria* L. [Tesis de pregrado]. Instituto de Farmacia Alimentos, Universidad de La Habana; 2013.
9. Wang L. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008; 15: 2528-2532
10. Abreu O. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. Rev. Cub. Plant. Med, 2005; 10: 3-4.
11. Ahumada A. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.): un subproducto con alto potencial biológico, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2016; 45(3): 438-469.

Received: 25 junio 2020

Accepted: 20 julio 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Effect of sulphuric acid on roses crop (*Rosa sp.*)

Lorena Marivel Dávila Pullas

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.8

Abstract: The chemical effects of sulfuric acid produced by a sulfuric acid-generating machine include lowering the pH of the water to increase the bioavailability of nutrients in the soil and then be easily absorbed by the plant. This research determined the effect of sulphuric acid produced by the SAG machine on the productivity of the cultivation of roses (*Rosa sp.*) in the OK Roses S.A. floricultural farm, in Cotopaxi, Ecuador. The research method was descriptive, quantitative, and it had a quasi-experimental design. Primary data collection was obtained from the productivity field records and laboratory analyses of water, soil, and foliage. The results showed that the generation of sulphuric acid produced by the SAG machine lowers the pH and bicarbonates in the water. This process allowed the elements bioavailability from soil to plant like Mg and S and microelements like Fe, Mn, Cu, and Zn. The productivity index stem-plant⁻¹ month⁻¹ increased by 16.16% over two years.

Key words: roses crop, *Rosa sp.*, sulphuric acid.

1215

Introduction

Roses are the best known and sold flowers in the world. According to some researches, Lamz¹, Navarro², García³, and Food and Agriculture Organization of the United Nations⁴ salt stress causes physiological and biochemical changes in the metabolism of rose cultivation, conditioning its productivity. For Gardi⁵ and Xu⁶ the quality parameters required by the international market for fresh rose have contributed to the accelerated deterioration of the soil-water-plant-environment system, mainly due to the high residuality of acidifying agrochemicals applied to this monoculture; causing compaction, destruction of aggregates, and disappearance of macropores from the first 30 cm of the soil. According to Martínez⁷, this limits the ionic availability of nutrients, which limits the agroeconomic efficiency, productivity growth, and profitability of the crop. In the opinion of Sánchez⁸, soil degradation is also linked to irrigation with sodium bicarbonate groundwater.

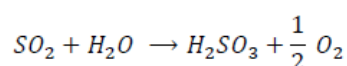
Investigations conducted in Morocco by Bourakhouadar⁹ in alkaline waters and saline/sodium soils concluded that the use of irrigation water treated with a SAG machine (sulphuric acid-generating) produced rapid desalination, and decreased sodium. This improves soil permeability and aggregation, facilitating the leaching of salts. The water that initially had an alkaline pH of 8.4, by SAG machine intervention was reduced to 6.0. The HCO₃⁻ bicarbonates decreased from 3.5 meq L⁻¹ to 0.95 meq L⁻¹. In the same way, Ahmad¹⁰ said the barley lots with SAG treated water, and zero tillage increased 19% (Kg/acre) in the yield. Technical records at the OK Roses S.A. flower farm indicated the water of irrigation is alkaline because that exceeds 200 ppm of bicarbonates and pH over 8 points. This condition limits the ionic availability of nutrients and decreases the productivity of stems for export. In this context, this research focused on analyzing the quality of irrigation water with the intervention of the SAG machine, determining the influence of the sulphuric acid produced by the SAG machine on the bioavailability of soil nutrients, and finally, evaluating the productivity of Rosa Freedom cv and Rosa Vendela cv.

Methods

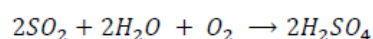
The floricultural farm is located in the inter-Andean region of Ecuador, Cotopaxi, Latacunga at 2910 meters above sea level. The soil is clay loam. The daily total irrigation sheet is 469.47 m³. The absolute maximum average temperature is 20.3°C. The precipitation annual average is 396.6 mm. The population was represented by the cultivation of *Rosa sp.* Freedom and Vendela cultivars under the greenhouse with an initial productivity index of 0.76 stem-plant⁻¹ month⁻¹ for the Freedom cv, and 0.89 stem-plant⁻¹ month⁻¹ for the Vendela cv. The total production area was 56200 m². Data for Freedom cv were obtained in block one of 7602 m², and data for Vendela cv were obtained from block six of 4671 m².

The SAG machine is based on the principle of co-production of sulphuric acid and hydrogen with proportions that are friendly to water, soil, and air. This technology neutralizes waters saturated with mineral-salts, also saline or sodium soils. Buhidar¹¹ explains the physical-chemical process begins with the introduction of alkaline water through a pressurized line that maintains the constant internal pressure into the machine. Then elemental sulfur with a purity of 99.9% is incorporated and burned in a combustion chamber at a temperature above 205 °C. One-tenth of the oxygen-rich water supply is introduced under pressure forward two "venturi." This process creates a vacuum. The elemental sulfur (S) ignites in the combustion chamber and melts. The molten sulfur is oxidized to create sulfur dioxide (SO₂), which spreads down the pipe to mix with water, and it forms sulfurous acid with pH 2 in (Equation I), then sulphuric acid with pH 6.5 in (Equation II).

(I)



(II)



The hydration values (Equation II) for the production of sulphuric acid are defined as $64.06 \text{ g/mol} + 18.015 \text{ g/mol} + 31.998 \text{ g/mol} = 98.078 \text{ g/mol}$.

The SAG machine was installed on the flower farm in May 2016. Data was collected and analyzed at two-time points. The first period was from May 2014 to January 2016. The second period was from May 2016 to April 2018.

Laboratory analyses of water, soil, and foliage were performed. The inferential statistic was applied to the obtained data from inductive reasoning. The approach was quantitative, and the design quasi-experimental. Analysis of Variance (ADEVA) was used with Fisher's mean test ($\alpha=0.05$) to determine the stem-plant⁻¹month⁻¹ productivity index of the two cultivars.

The analysis focused on the following variables:

Variables analyzed in water were Hydrogen potential (pH) and bicarbonates (HCO_3). Variables analyzed in the soil were pH, C.E., N, P, K, Ca, Mg, S, Na, B, Mn, Cu, Zn, and Fe. Variables analyzed in the foliage were N, P, K, Ca, Mg, S, Na, B, Mn, Cu, Zn, and Fe. Variables analyzed in the productivity were Productivity Index (P.I.) about stem-plant⁻¹ month⁻¹ and stem-length (S.L.) for export.

Results and Discussion

Effects on water

The water pH decreased from 8.28 to an average of 6.47 on the scale, complying with the technical requirements for fertigation processes in rose cultivation. Bicarbonates dropped from 319 ppm to an average of 64.77 ppm (Figure 1). According to Aza¹², bicarbonates above 200 ppm hinder the absorption of microelements, as well as the capture of macroelements like Ca and Mg. These two parameters in the water directly influenced the ionic availability of nutrients in the soil.

Bourakhoudar⁹ concluded that irrigation with SAG-treated water produced rapid desalination, and sodium decreased. This improved permeability and soil aggregation, which in turn facilitated the leaching of salts. The water initially had an alkaline pH of 8.4, but by the intervention of the SAG machine, it was reduced to 6.0. The E.C. suffered a slight increase from 0.56 to 0.64 dS m⁻¹. The HCO_3 -bicarbonates initially from 3.5 meq L⁻¹ decreased to 0.95 meq L⁻¹.

Effects on soil

The results indicated that the pH of the root zone (water bulb) at 20 cm from the ground, decreased by 0.24 and 0.25 in blocks one and six in Freedom and Vendela cultivars, respectively. This meant 1.6 times more acid, according to Scott¹³. In a free soil like it is the case of this farm, "a CE 0.5 mS cm⁻¹ represents an energy consumption of 67.5%, and a CE 1.0 mS cm⁻¹ represents an energy consumption of 80.6%"¹⁴. It decreases in C.E. could indicate a lower energy expenditure of the plant with the installation of the SAG machine, and directly influence productivity rates.

Soil and foliar analyses revealed the nutritional availability that the soil is providing as assimilable to the plant. After the intervention of the SAG machine, the bioavailability of macro and micronutrients were directly reflected in the plant tissue (Table 1).

Effects on plant

The data indicated the concentrations of Mg and S became "Normal" in the plant, which is 0.36% and 0.25% by Freedom cv, and 0.37% and 0.27% by Vendela cv, respectively. In the same way, micronutrients like Fe, Mn, and Cu presented "Normal" concentrations in the Vendela cv, that is, 146.33 mg kg⁻¹, 147.33 mg kg⁻¹, and 7.84 mg kg⁻¹, respectively. These data indicated that the implementation of the SAG machine improves the nutritional balance of the plant, which can be verified in the productivity of the crop.

The results obtained by the Analysis of Variance ADEVA, with the Fisher's mean test ($\alpha=0.05$) for the productivity index stem-plant⁻¹ month⁻¹ of Freedom and Vendela cultivars, indicated that the factors "SAG Machine" and "Cultivar" are statistically significant; however, it was not significant for the "Machine: cultivar" interaction.

The analysis for the factor "SAG Machine" (Figure 2) indicated that the mean productivity index stem plant⁻¹ month⁻¹ for both cultivars Freedom and Vendela, reached 0.99, that is, 16.16% more than 0.83 stem-plant⁻¹ month⁻¹ before establishing the SAG machine. So the SAG machine had a positive effect on the productivity index stem-plant⁻¹ month⁻¹ in the cultivation of *Rosa sp.* According to Aza¹² the best productivity index of the Freedom cv in Ecuadorian flower farms is 1.0 stem-plant⁻¹ month⁻¹ with more demanding quality parameters like bud size, vase life, size, and foliage color.

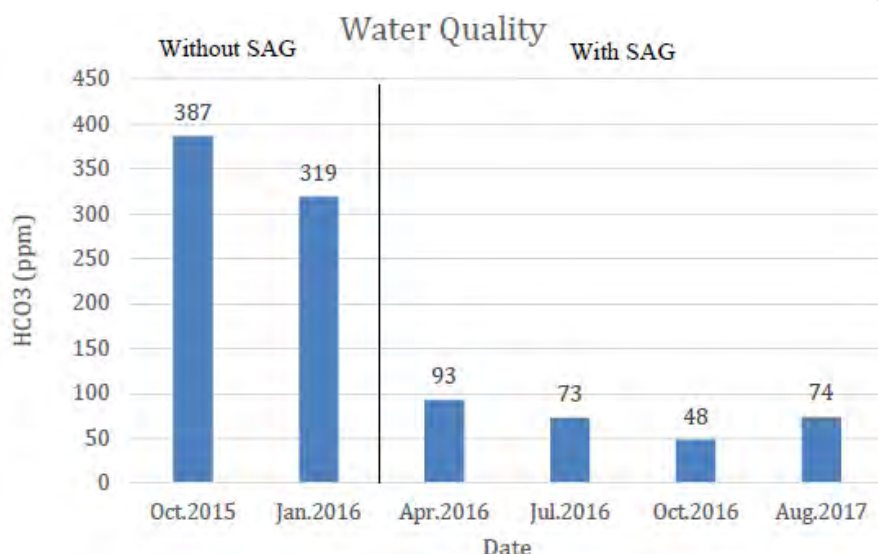


Figura 1. Bicarbonates present in the water before and after of the SAG machine intervention. Note: Taken from water analyses by AGQ Labs & Technological Services (2015-2017)

Block	Cultivar	Variable	Soil				Plant				Absorption rate by the plant	
			Without SAG (ppm)	With SAG (ppm)	Optimum range in soil (ppm)	Extraction method	Without SAG	With SAG (% and mg kg ⁻¹)	Optimum range in the plant (% and mg kg ⁻¹)	Variation in % of assimilation by the plant	Without SAG	With SAG
1	Fre	N	3029.00	2860.25	1000-1500	Kjeldhl/dumas	3.87	3.62	3-5%	-6.43	Normal	Normal
6	Ven	N	2037.00	2046.00	1000-1500	Kjeldhl/dumas	4.49	3.99	3-5%	-11.25	Normal	Normal
1	Fre	P	213.00	168.25	30-60	Olsen	0.26	0.31	0.20-0.30%	19.23	Normal	High
6	Ven	P	207.00	249.00	30-60	Olsen	0.31	0.33	0.20-0.30%	5.16	Normal	High
1	Fre	K	1305.90	957.95	195-312	Ammonium Acetate	2.01	2.15	1.6-2.5%	7.05	Normal	Normal
6	Ven	K	887.60	610.00	195-312	Ammonium Acetate	1.99	2.22	1.6-2.5%	11.46	Normal	Normal
1	Fre	Ca	4909.60	4639.03	1600-2800	Ammonium Acetate	1.05	1.02	1-2%	-2.54	Normal	Normal
6	Ven	Ca	3687.20	2965.80	1600-2800	Ammonium Acetate	1.47	1.40	1-2%	-5.10	Normal	Normal
1	Fre	Mg	1227.40	936.95	180-300	Ammonium Acetate	0.44	0.36	0.3-0.4%	-17.42	High	Normal
6	Ven	Mg	851.90	669.60	180-300	Ammonium Acetate	0.44	0.37	0.3-0.4%	-15.68	High	Normal
1	Fre	S	-	-	-	-	0.16	0.25	0.20-0.40%	53.13	Low	Normal
6	Ven	S	-	-	-	-	0.18	0.27	0.20-0.40%	50.00	Low	Normal
1	Fre	Na	344.80	235.63	58-174	Ammonium Acetate	249	260.44	0.01-0.04%	4.60	Very High	Very High
6	Ven	Na	186.20	128.70	58-174	Ammonium Acetate	249	264.40	0.01-0.04%	6.18	Very High	Very High
1	Fre	B	4.34	7.03	0.6-1.0	DPTA	251	262.00	40-80 mg kg ⁻¹	4.38	Very High	Very High
6	Ven	B	4.63	6.77	0.6-1.0	DPTA	252	262.30	40-80 mg kg ⁻¹	4.09	Very High	Very High
1	Fre	Mn	19.20	8.49	1-5	DPTA	49.8	105.00	100-300 mg kg ⁻¹	110.84	Very Low	Normal
6	Ven	Mn	33.00	12.50	1-5	DPTA	52.9	147.33	100-300 mg kg ⁻¹	178.51	Very Low	Normal
1	Fre	Cu	7.87	6.27	0.4-1.0	DPTA	5.93	6.49	7-17 mg kg ⁻¹	9.42	Low	Bajo
6	Ven	Cu	13.00	12.00	0.4-1.0	DPTA	4.9	7.84	7-17 mg kg ⁻¹	59.95	Very Low	Normal
1	Fre	Zn	11.70	12.43	1-2	DPTA	47.4	62.80	15-50 mg kg ⁻¹	32.49	Normal	High
6	Ven	Zn	25.00	28.80	1-2	DPTA	11.5	44.15	15-50 mg kg ⁻¹	283.91	Low	Normal
1	Fre	Fe	39.90	22.26	4-10	DPTA	403	192.33	80-150 mg kg ⁻¹	-52.27	Very High	High
6	Ven	Fe	78.40	32.00	4-10	DPTA	339	146.33	80-150 mg kg ⁻¹	-56.83	Very High	Normal

Tabla 1. Macro and micronutrients behavior in the soil and ranges of absorption by the plant in Freedom and Vendela cultivars with SAG machine. Note: Taken from the soil and foliar analyses by AGQ Labs & Technological Services (2014-2018)

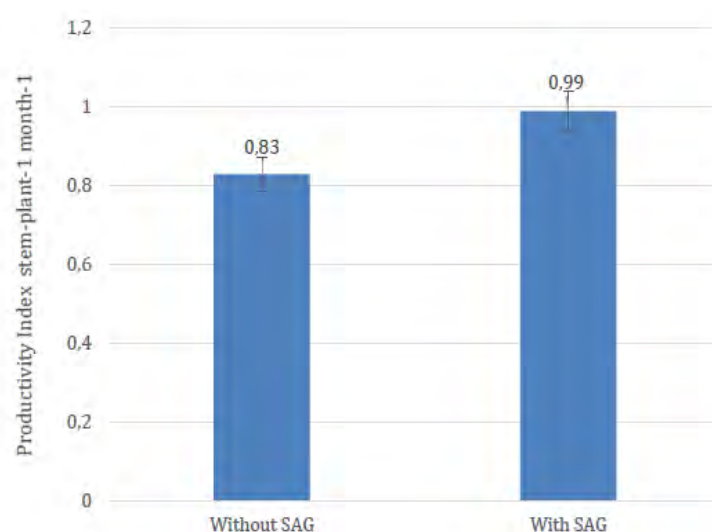


Figura 2. Productivity Index of Freedom and Vendela cultivars with SAG machine.

In Pakistan, Ahmad¹⁰ indicated the maximum yield was obtained in the barley lots where it was irrigated exclusively with water treated with SAG machine, and zero tillage. The increase in productivity was 19% and 15%. Soil pH dropped using SAG-treated water, while irrigation with untreated water increased pH.

On the other hand, there was not a statistic effect on the stem-length (S.L.) by use SAG machine.

Conclusions

The quality of irrigation water for rose cultivation at the OK Roses S.A. flower farm improved in two parameters after

using the SAG machine as an alternative means of agricultural production. It lowered the pH from 8.28 to an average of 6.47. It decreased bicarbonates (HCO₃) from 31.9 ppm to an average of 64.77 ppm. The data indicated that the ionic availability of micronutrients like Fe, Mn, and Cu; also, secondary nutrients like Mg and S was improved, which was verified in the increase of productivity indexes of Freedom and Vendela cultivars. The productivity indexes were 0.99 stem-plant⁻¹ month⁻¹, that is, 16.16% more than 0.83 stem-plant⁻¹ month⁻¹ before establishing the SAG machine. Framed in the results, the alternative hypothesis was accepted "The productivity of rose Freedom and Vendela cultivars is greater with the implementation of the SAG machine as an alternative means of production in the Ecuadorian flower farm."

Acknowledgements

The research was supported by the OK Roses S.A. farm of Ecuador. I thank Professors Ingrid Martínez Ph.D. and Alonso Zuleta Ph.D. for help in the revision of the manuscript for this paper.

Bibliographic references

1. Lamz A, González M. [Salinity as a problem in agriculture: plant improvement an immediate solution]. *Tropical Crops* [Internet]. Oct-Dec, 2013 [cited 2020 Jan 10]; 34:4, 31-42. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362013000400005.
2. Navarro GG, Navarro GS. Saline and sodium soils. In *Agricultural Chemistry: Chemistry of the soil and essential nutrients for plants*. 3rd ed. Madrid, Spain: Editions Mundi-Prensa; 2013.
3. García Á, Correa D. Use of Soil Quality Indicators as a strategy to prevent its degradation. In A. García [Presidency] *Soil Fertility and Plant Nutrition*. Symposium held at the XII Ecuadorian Congress of Soil Science. Quito, Ecuador; 2010.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Advances in the assessment and monitoring of salinization and status of bio-saline agriculture: Report of an expert consultation held in Dubai, United Arab Emirates, 26–29 November 2007. No. 104; 2009.
5. Gardi C, Angelini M, Barceló S, Comerma J, Cruz C, Encina, A, Jones A, Krasilnikov P, Mendonça ML, Montanarella L, Muñoz O, Schad P, Vara MI, Vargas R, editors. *Soil Atlas of Latin America and the Caribbean*. European Commission - Publications Office of the European Union, L-2995. Luxembourg; 2014.
6. Xu RK, Ji GL. Effects of H₂SO₄ and HNO₃ on soil acidification and aluminium speciation in variable and constant charge soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. July 04, 2000; 129: 33-43.
7. Martínez E, Fuentes J, Acevedo E. [Soil organic carbon and soil properties]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* [Internet]. 2008 [cited 2020 Feb 12]; 8(1): 68-96: [about 1 p.]. Available from: <https://sci-hub.tw/10.4067/S0718-27912008000100006>.
8. Sánchez RM, Guerra DL, Scherger M (Food and Agriculture Organization of the United Stae, National Institute of Agricultural Technology of Argentina). Evaluation of the irrigated areas affected by salinity and / or sodicity in Argentina. 2015 Report. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/anexosyapendices/5._Documento_Estimaci%C3%B3n_Areas_Salinas_en_Argentina.pdf
9. Bourakhouadar J. Rehabilitation of saline/sodic soils by the use of a sulfuric acid [Master thesis]. Hassan II Agricultural and Veterinary Institute. Rabat, Morocco; 1999.
10. Ahmad N. Evaluation of effectiveness of sulphurous acid generator in treanting the sodic water under different scenarios for wheat crop [Master thesis]. Lahore, Pakistan: University of Engineering and Technology, Centre of Excellence in Water Resources Engineering; 2002.
11. Buhidar BD. Sulfurous vs. Sulfuric [Technical report]. TMDL Specialist at Idaho Department of Environmental Quality. Idaho, Utha, USA; 2019.
12. Aza, S. Productivity index of Rosa sp. Freedom and Vendela cultivars. (L. Dávila, Interviewer) Tabacundo, Pichincha: Finca Florícola Bella Rosa. October 26, 2018.
13. Scott MT. How Does One pH Compare to Another? *Better Crops*. 2011; 95:2; 27p. Available from: <http://www.ipni.net/publication/bettercrops.nsf/0/59D631264C3510FD8525797C007813DF/%-24FILE/Better%20Crops%202011-2%20p27.pdf>
14. Padilla W. Nutrient absorption curves of the Rockefeller variety rose under macro-tunnel conditions at the Agroganadera Espinosa Chiriboga Company, Cotopaxi - Ecuador [Degree thesis]. Honduras: Zamorano University, Faculty of Agricultural Sciences; 2007.

Received: 30 April 2020

Accepted: 11 July 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Sun ultraviolet radiation in Ibarra, Ecuador and its relation to vitamin D synthesis

Graciela M. Salum¹, Paola P. Echeverría Ortíz¹, Jackeline P. Pereira Carillo¹, Gandhi F. Villalba Meneses¹ and Rubén D. Piacentini^{2,3}

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.9

Abstract: In the present work, we determined the necessary time to unchain the synthesis of vitamin D for a phototype II skin in Ibarra, Ecuador. In a specific sky situation, the range of exposure time at Sun radiation is 4 to 6 minutes depending on the month of the year, but with clouds, it is needed about 70% more exposure time. This time range is easily reached in normal conditions, but during a lockdown period, as in pandemic situations like the COVID 19 one or for people that need to live, work or study inside, if they are exposed to the direct Sun for the minutes indicated above, they will have a natural vitamin D supplement that will improve its health.

Key words: solar UV radiation, vitamin D, Ibarra, Ecuador.

Introduction

The solar resource in Ecuador has some particularities since this country is in the central line and is crossed by the high altitude Andes mountains. But this amount of Sun may not be sufficient if the population does not spend enough time outdoors. One of the implications of this fact is that the exposure might not be enough to synthesize vitamin D. In the present work, we analyzed if the solar radiation in the UVB 280-315 nm range is sufficient for synthesizing vitamin D in Ibarra, Ecuador, a high altitude near the equatorial site.

Before the solar irradiance (power per square meter) reaches the terrestrial surface, each range of radiation (ultraviolet UV, visible Vis, and infrared I.R.) suffers an attenuation, due to the different constituents of the atmosphere. Ibarra is an Ecuadorian city at about 2384 meters above sea level. According to D'Orazio *et al.*¹, the UV solar radiation (100-400 nm) can be divided into three ranges: UV-A 400 to 315 nm, UV-B 315 to 280 nm, and UV-C 280 to 100 nm. These ranges are defined mainly following the biological effects that are analyzed. The highest attenuation of solar radiation by the atmosphere occurs in the higher frequency range: the UV-C range, blocking practically all this radiation. At the UV-B range, the attenuation is higher than at the UV-A range, both ranges reaching the terrestrial surface.

Although ultraviolet radiation has several deleterious effects on human health^{1,2,3,4,5,6}, UV radiation remains beneficial as it triggers the synthesis of vitamin D at the skin^{7,8,9}. There are two forms of vitamin D: D₂ vitamin and D₃ vitamin. Plants and fungus synthesize the former, and the second one results from the solar radiation incidence on the human skin. The UV-B radiation penetrates the skin, where it is absorbed by the 7-dehydrocholesterol molecule yielding the formation of vitamin D₃⁴.

The minimum erythral dose (MED) is the necessary dose to produce the solar reddening of the skin, called *erythema*. According to the NRPB report¹⁰, the lowest appropriate level of vitamin D (D₂ plus D₃) is 10 mg/L. Holick's rule establishes that a dose of a quarter of MED is enough to produce sufficient vitamin D on the skin^{7,11,12}. Consequently, we used this Holick's rule for the definition of the Vitamin D synthesis dose, and then we related it to the erythral irradiance, to determine the minimum time exposure.

Methods

Considering that:

$$\text{energy [J]} = \text{power [W]} \cdot \text{time [s]}$$

then

$$\text{time [s]} = \frac{\text{energy [J]}}{\text{power [W]}}$$

To determine the necessary time to produce the synthesis of vitamin D, it is necessary to know the energy that produces the erythral effect (or MED), and the solar power that reaches the terrestrial surface that produces the skin redness (or erythral solar irradiance).

MED data for a phototype II was obtained from the Fitzpatrick scale of the MED in the function of phototype^{7,11,12}, and then this value was divided by 4, according to Holick's law¹.

The erythral solar irradiance was calculated with the Tropospheric Ultraviolet and Visible (TUV) radiation model¹³ for each month to know about its annual evolution in Ibarra at a clear sky situation. Then, we found the months with maximum and minimum values of solar radiation.

The last consideration made was the cloud cover that is very frequent in Ibarra city. This situation was re-analyzed the necessary exposure time to reach the dose to produce the synthesis of vitamin D with the cloudy sky situation.

Results and Discussion

Figure 1 shows the annual evolution of monthly mean solar erythral ultraviolet irradiance (an indication of the solar exposure risk) at a clear sky and solar noon in Ibarra, Ecuador. Also, this figure shows the interpolation to derive daily values. It can be seen that the highest irradiance occurs in February to April and again (due to the intertropical geographical position) from September to November. The lowest irradiance occurs in June-July. To highlight the importance of this irradiance, we modeled with the TUV algorithm¹³ for the 15th day of each month, at solar noon considering clear sky days (cloudiness less than 25%). The annual average value is 339.2±22.1 mW/m². These irradiances represent a U.V. index value (obtained

¹ School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urcuquí, Ecuador.

² Grupo Física de la Atmósfera, Radiación Solar y Astropartículas, Instituto de Física de Rosario IFIR -CONICET/Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura (FCEIA), Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

by the multiplication of the irradiance by the factor $40 \text{ m}^2/\text{W}$ in the range of 13.6 ± 0.9 . We can see that the monthly mean UV index has valued all year round larger than 11, the lowest limit for qualifying it as "Extreme". However, and mainly for countries in the intertropical region, Zaratti *et al.* proposed to modify the relation between the numerical values and the corresponding qualifications, extending to upper values the lower limits¹⁴.

Figure 2 shows spectral solar irradiance as a function of the wavelength, calculated with the same algorithm for Ibarra, Ecuador, in bright sky days, at solar noon, for February 15th, 2019, and June 15th 2019. This figure shows the difference between both days that is a consequence of the changes in ozone and aerosols contents in the atmosphere and the change of zenith angle (angle between solar rays incidence and the vertical line in the place)¹⁵.

A previous work¹⁶ presented the calculation of exposure time a person with a phototype III must spend under sun irradiance to reach the minimum Vitamin D dose. The calculated range of daily Sun exposure time varies between 3 and 5 minutes for bright sky days at solar noon in Urcuquí, Ecuador, located at 20.2 km from Ibarra. The phototype depends on the Fitzpatrick scale that classifies the skins in six types (from I to VI) according to its photo-response to the ultraviolet exposure¹.

In the present work, we determined the necessary time to unchain the synthesis of vitamin D through the skin for persons with a phototype II in Ibarra. For this purpose, we considered a MED of 300 J/m^2 , and then the dose for vitamin D synthesis, applying the Holick's rule, is 75 J/m^2 . In the case of February 15th, the minimum exposure time is 4 minutes around the solar

noon at 12:12 local time (= UT - 5 hours). This exposure time is shorter than the necessary exposure time on June 15th; that is 6 minutes (see Table 1). However, it is essential to consider that these times are calculated in the case of a clear sky situation.

Huaca *et al.*¹⁷ presented an analysis of actual values of erythemal UV radiation in Ibarra city where the radiation suffers a reduction due to the presence of clouds, having an average of cloudiness of 78.5% in this city. In this climatological situation, the radiation is sharply reduced by clouds; for example, erythemal solar radiation for the day, September 3rd 2017, from 9 am to 3 pm was reduced to 72.5%. Therefore, it is necessary to extend the exposure time in normal conditions.

It must be pointed out that the time integral of the erythemal UV irradiance in the whole day (called erythemal UV irradiation), for a typical cloudy day, is 33.6% lower than a day without clouds. So, it was determined that to reach the dose for vitamin D synthesis at solar noon, we need 5 minutes of exposure (see the black line in Figure 3). If the day is clear sky, the time needed would be 3 min (see blue line in the same figure).

The time range from 3 to 5 min for vitamin D synthesis at Ibarra, Ecuador, is easily reached in normal conditions. However, the COVID-19 pandemic makes the people stay at home and do not frequently go out, reducing, consequently, their solar time exposure. Therefore, the required sun exposure usually is not achieved, and special care must be paid to the exposure of persons to solar radiation, at least several mins around noon.

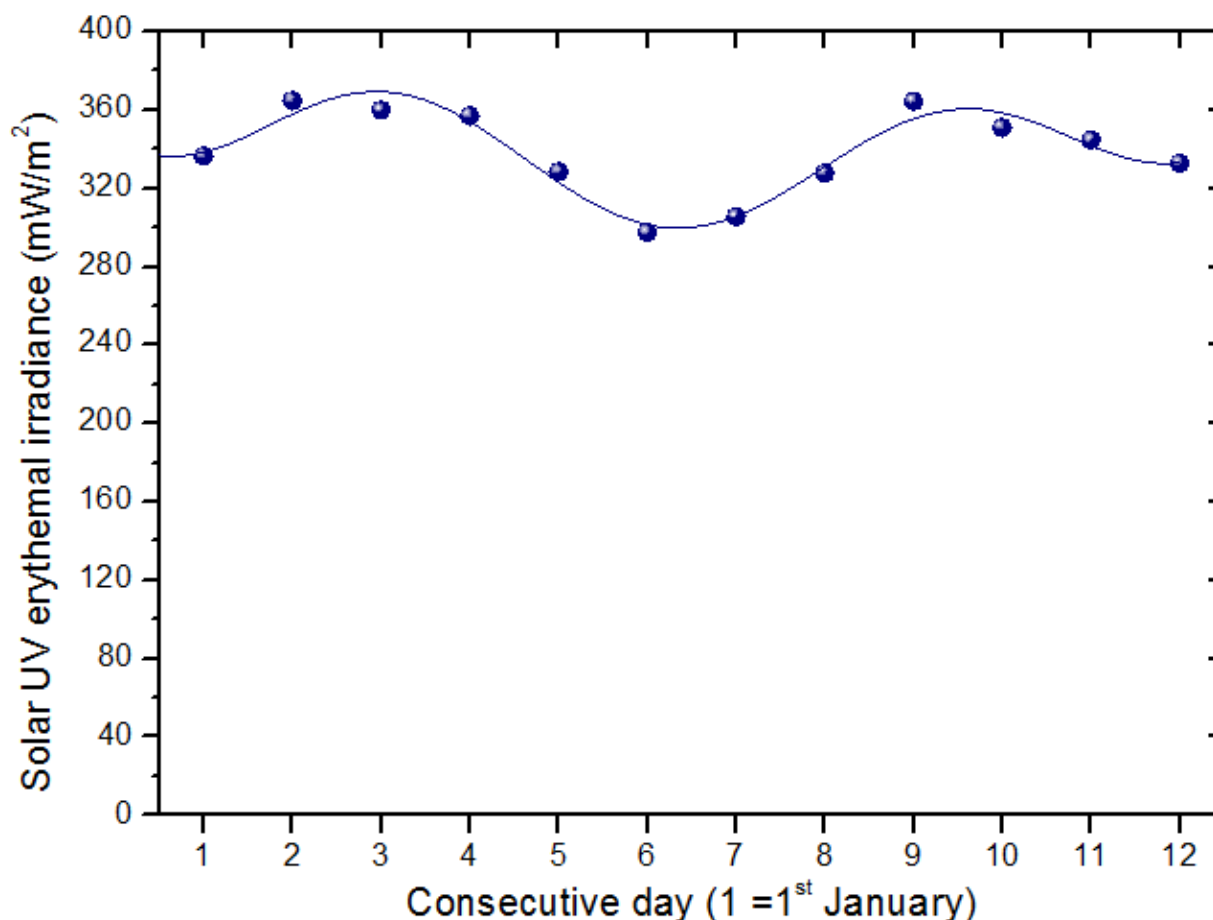


Figure 1. Annual evolution of monthly mean solar erythemal ultraviolet irradiance at solar noon, in Ibarra, Ecuador, modeled for 15th of each month.

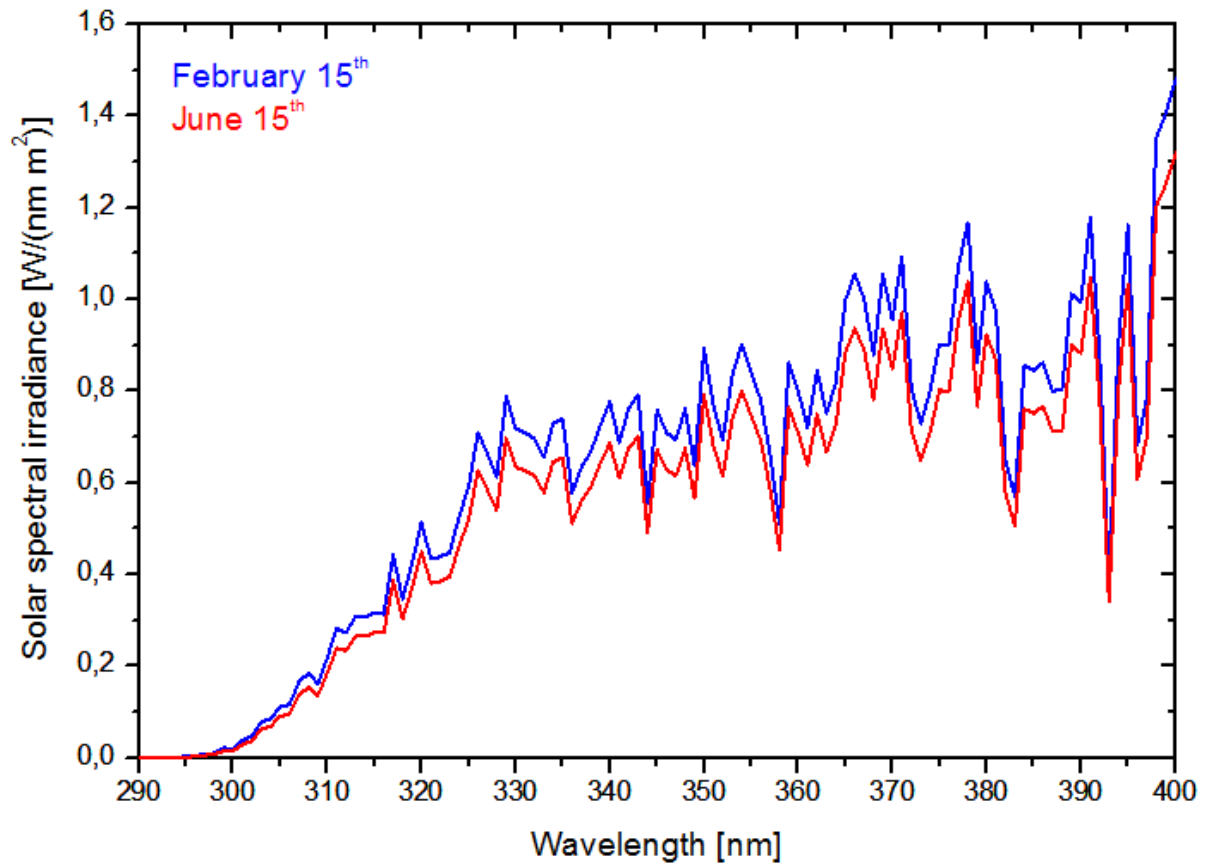


Figure 2. Spectral solar irradiance modeled with the TUV algorithm, at Ibarra, Ecuador, for February 15th 2019 (in blue line) and for June 15th 2019 (in red line), around noon in dates near the maximum and minimum solar erythemal irradiance (or U.V. index), in a typical year.

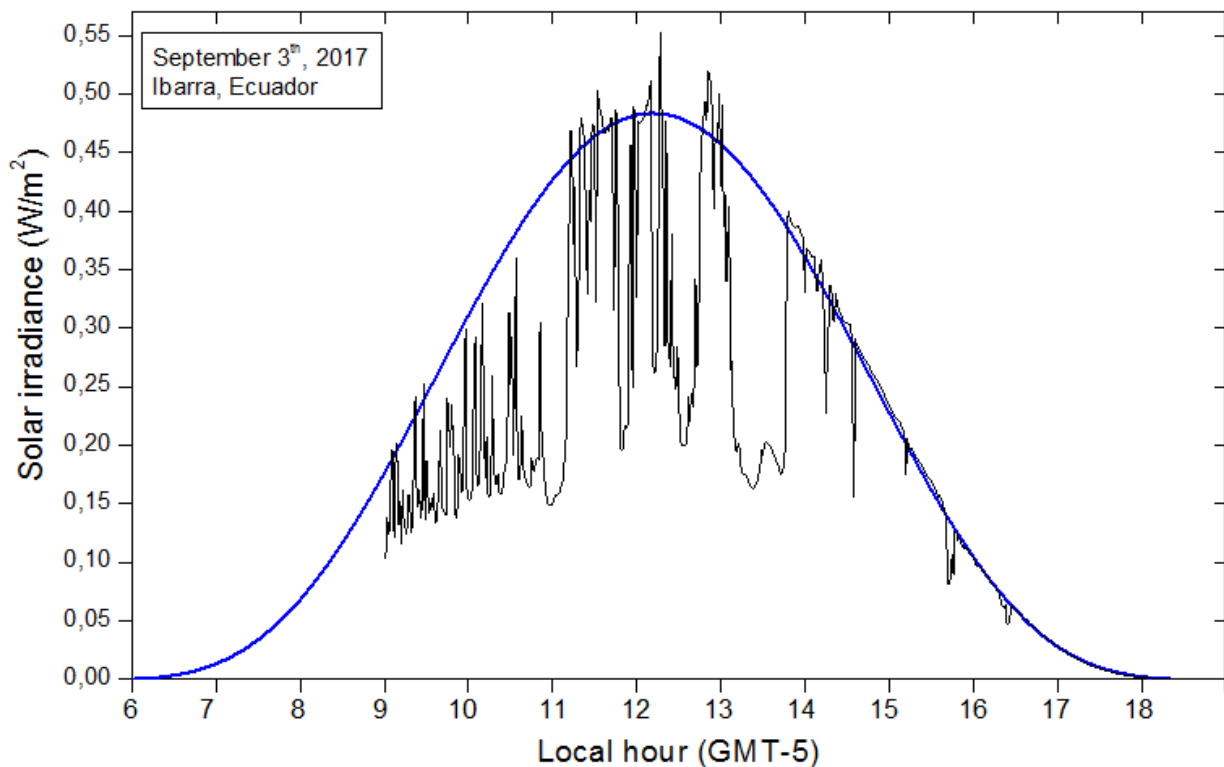


Figure 3. The daily evolution of erythemal irradiance modeled (blue line) and measured (black line) with a biometer Kipp&Zonnen of the Universidad Técnica del Norte in Ibarra the day September 3rd 2017 (adapted from Huaca *et al.*¹⁷).

Date of 2019	Time	Dose (J/m ²)	Minimum exposure time (minutes)
February 15 th	12:24 – 12:28	87.55	4
June 15 th	12:09 – 12:15	89.25	6

Table 1. Vitamin D synthesis in the skin of a person of phototype II, exposed at Ibarra, Ecuador. Dose and minimum exposure time for bright sky days.

Conclusions

In conclusion, we would like to point out that in Ibarra (and adjacent regions), for the synthesis of vitamin D at the skin of a person with phototype II:

In clear sky days around noon, it is needed to be exposed to solar UV radiation between 4 minutes (around the maximum, see Figure 1) and 6 min (around the minimum, see the same Figure 1), all year round.

In typical cloudy days, this time needs to be increased significantly, but always in the range of some minutes. For example, for the cloudy day of September 3rd, 2017, the time exposure increases from 3 mins (if the day would be of clear sky) to 5 min.

These results show that, with a minimum time exposure of several minutes around noon and during all the year (due to the very small monthly variation of the solar radiation in Ibarra, Ecuador, an almost equatorial site), vitamin D can be synthesized to produce a reasonable quantity of this vitamin in the skin of a person with phototype II, if it is exposed about 6 minutes, the most significant value determined in the present work, for the worst condition of a cloudy sky.

We also like to point out that a very recent publication¹⁸ presented results obtained in Europe that establish a direct connection between the deficiency in Vitamin D (that reduces the ability of the human immune system to react, as shown by Baeke *et al.*¹⁹) and the COVID-19 disease

- Webb A. R. and Engelsen O., 2006. Calculated Ultraviolet Exposure Levels for a Healthy Vitamin D Status. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 1697-1703.
- Madronich S. and Flocke S. Theoretical estimation of biologically effective UV radiation at the Earth's Surface. In: *Solar Ultraviolet Radiation* (Editors Christos S. Zerefos and Alkiviadis F. Bais), Springer. 1989; 23-48.
- Zaratti F., Piacentini R.D., Guillén H.A., Cabrera S.H., Ben Lileye J. & McKenzie R.L. Proposal for a modification of the UVI risk scale. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2014;13, 980.
- Iqbal M. An Introduction to Solar Radiation. Academic Press. 1983. Canadá.
- Salum G.M., García Molleja J., Regalado Díaz B.A., Guerrero León L.A. & Berrezueta C. Calculation of the Sun exposure time for the synthesis of vitamin D in Urcuquí, Ecuador. International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO2017), Granada, España. Available in: arXiv:1706.01541 (2017).
- Huaca J.M., Salum G.M. & Piacentini R.D. Solar erythral irradiance in Ibarra, Ecuador (high altitude equatorial city). Ground and satellite measurements and model calculations. *Revista Bionatura*. 2018;3(1).
- Ilie P.C., Stefanescu S. & Smith L. The role of Vitamin D in the prevention of Coronavirus Disease 2019 infection and mortality. Pre-print in Research Square. 2020 (DOI: 10.21203/rs.3.rs-21211/v1).
- Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C. & Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*. 2010;10:482-496.

Received: 6 May 2020

Accepted: 11 July 2020

Bibliographic references

- D'Orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A. & Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:12222-12248.
- Rivas M., Rojas E. and Calaf G.M. Prediction of skin cancer occurrence by ultraviolet solar index. *Oncology Letters*. 2012;3:893-896
- Majidi M., Milani B.Y., Movahedan A., Wasielewski L. and Djalilian A.R. The Role of Ultraviolet Radiation in the Ocular System of Mammals. *Photonics*. 2014;1:347-3
- Cabrera S. Chapter 11: Radiación ultravioleta solar y vitamina D. In: *Radiación ultravioleta y salud*. ISBN 956-11-1790-8. 2005. Santiago de Chile, Chile.
- Gallagher R.P. and Lee T.K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2006; 92(1):119-131.
- Longstreth, J., de Gruijl, F. R., Kripke, M. L., Abseck, S., Arnold, F., Slaper, H. I., Velders G., Takizawa Y., van der Leun J. C. Health risks. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1998; 46:20-39.
- Holick M.F. Vitamin D Deficiency: What a Pain It Is. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1457-1459.
- Holick M.E. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and vitamin D for health. *Anticancer Research*. 2016;36:1345-1356.
- Dowdy J.C., Sayre R.M., & Holick M.F. Holick's rule and vitamin D from sunlight. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2010;121:328-330.
- NRPB. Health effect from ultraviolet radiation. Report of an Advisory Group on Non-ionising Radiation. National Radiological Protection Board. 2002;13(1).
- Holick M.F. 2004. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:362-71.

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Evaluación de la calidad de vida como predictor de supervivencia en el cáncer Quality of life assessment as a predictor of survival in cancer

Carmen Viada^{1*}, Carlos Bouza², Javier Ballesteros³, Martha Fors⁴, Mabel Alvarez¹, Aliuska Frias¹, Lazara Garcia¹, Yanela Santiesteban¹, Yuliannis Santiesteban¹, Mayra Ramos¹

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.10

Resumen: La calidad de vida y la supervivencia son variables a tener en cuenta en ensayos clínicos de pacientes oncológicos. Es importante investigar la relación que existe entre ellas para los distintos tipos de cáncer. Se unieron las bases de datos de todos los pacientes oncológicos incluidos en los ensayos clínicos que se ejecutaron en el país, en el período 2000-2020. La calidad de vida se evaluó a través de las encuestas utilizadas en cada protocolo de investigación. Se realizó un análisis del tiempo transcurrido entre la inclusión del paciente y el fallecimiento para determinar el tiempo de supervivencia. Se comprobó que las variables de supervivencia de los pacientes incluidos en ensayos clínicos, mostraron valores superiores a los reportados para los pacientes con similares localizaciones del tumor no incluidos en estas investigaciones. Las localizaciones de mayor supervivencia fueron: pulmón (14.03 meses), cabeza y cuello (19.63 meses) y esófago (16.85 meses). En el caso de la calidad de vida se obtuvo que, globalmente, los pacientes mantuvieron un excelente estado general y la mayoría se incorporó a las actividades domésticas y laborales. Los pacientes incluidos en ensayos clínicos mostraron un incremento de la supervivencia y calidad de vida.

1223

Palabras clave: calidad de vida, ensayos clínicos, oncología, supervivencia.

Abstract: The quality of life and survival are variables to take into account in the clinical trial of oncologic patients. It is essential to the researcher the relationship between both different types of cancer. It merges the database with all the oncological patients who were included in the clinical trials that were executed in Cuba, in the period 2000-2020. The quality of life was evaluated through the surveys used in each investigation protocol. It was carried out an analysis of the time elapsed between the patient's inclusion and the death to determine the time of survival. It was proven that the variables of the patients' survival included in clinical trials, showed superior values to those not reported for the patients with similar localizations of the tumor included in these investigations. The localization of more survival was: lung (14.03 months), head and neck (19.63 months) y esophagus (16.85 months). In the case of the quality of life, it was obtained that, globally, the patients maintained an excellent general state and most incorporated into domestic and labor activities. The patients included in clinical trials showed an increment in the survival and quality of life.

Key words: quality of life, clinical trials, oncology, survival.

Introducción

El cáncer constituye un problema de salud mundial, afecta a todos los países, independientemente de la raza, cultura, nivel de desarrollo económico y sistema político. En el mundo entero cada año se detectan unos 18 millones de casos nuevos. Constituye la principal causa de mortalidad a nivel mundial. Se le atribuyen 9 millones de defunciones (o aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en 2018. Se espera que para el 2030 aumenten a 20 millones los casos nuevos, el 60% de ellos en países en desarrollo, que cuentan sólo con el 5% de los recursos destinados a combatir este mal. El número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 25 millones en 2040^{1,2,3}.

Temido por la población, estudiado por los científicos, el cáncer es un problema de salud mundial que nos agrede año tras año con su carga de angustia y esperanzas.

Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el cáncer es una enfermedad prevenible y curable. Un tercio de los casos pueden ser prevenidos, otro tercio curado si se diagnostica tempranamente y el otro podría tener al menos una mejor calidad de vida^{1,2}.

En Cuba el cáncer es la segunda causa de muerte para todos los grupos de edades y la primera de años potenciales de vida perdidos, aun cuando su comportamiento ha variado

en el tiempo. El riesgo real de morir por cáncer en Cuba tuvo un incremento del 78,21% entre los años 1970 y 2006, con una tendencia ascendente que se acentuó a partir de los primeros años de la década del 80. En el año 2006 la tasa cruda de mortalidad por cáncer casi duplicó la existente al inicio de la década del 70⁴.

En el año 2018, se reportan 106 199 defunciones, 750 menos que en el 2017. La tasa de mortalidad general es de 9.4 defunciones por cada 1 000 habitantes, inferior en 1.1% a la del año anterior, la tasa ajustada por edad es de 4.6, una décima menor. Según clasificación en tres grupos de causas de muerte, la tasa de mortalidad, por enfermedades crónicas no transmisibles es la más elevada, 769.8 defunciones por cada 100 000 habitantes, le sigue en orden decreciente, la tasa de mortalidad por enfermedades transmisibles, las causas de muerte materna, perinatal y nutricional, 90.9, y la mortalidad por causas externas, 73.4. En relación con las 10 primeras causas de muerte, las enfermedades del corazón ocupan el primer lugar con una tasa de 228.2 por 100 000 habitantes, seguida de la muerte por tumores malignos, cuya tasa es de 221.3, ambas causas explican el 47.6 % del total de las defunciones del año 2018^{5,6}.

El manejo terapéutico del paciente oncológico se basa

¹ Centro de Inmunología Molecular, Habana, Cuba.

² Facultad de Matemática y Computación, Universidad de la Habana, Cuba.

³ Universidad del País Vasco, País Vasco, España.

⁴ Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.

Corresponding author: carmen@cim.sld.cu

fundamentalmente en la aplicación de terapias oncoespecíficas: cirugía, quimioterapia y radioterapia. En las últimas tres décadas este se ha complementado con una cuarta modalidad de tratamiento denominada inmunoterapia, que se fundamenta en dirigir la respuesta inmune contra las células tumorales para lograr la reparación, estimulación o amplificación de los mecanismos inmunitarios involucrados en la detención del crecimiento y de la diseminación del tumor^{7,8}.

Habitualmente los resultados de las intervenciones terapéuticas que se emplean en el paciente oncológico se evalúan en términos objetivos, valorando únicamente los conceptos clásicos de curación, supervivencia, morbilidad, etc. Pero estos parámetros no tienen en cuenta, en la mayoría de las ocasiones, la opinión del paciente, estableciendo como prioridad fundamental obtener la curación. Cuando no es posible la curación lo que se plantea es el aumento de la supervivencia, pero en muchas ocasiones el beneficio que se consigue en términos de supervivencia es escaso. Esto ha conducido a la búsqueda de otros objetivos de tratamiento, como por ejemplo el intervalo libre de enfermedad y el beneficio clínico (tiempo que conseguimos mantener al paciente sin síntomas relacionados con su tumor); además ha propiciado, el inicio de un cambio en la mentalidad de los oncólogos clínicos, obligando a introducir en los ensayos clínicos innovaciones metodológicas que incluyan conceptos como calidad de vida^{9,10}.

La definición calidad de vida es extremadamente complicada dentro del ámbito de la salud. Aunque existen múltiples y variadas definiciones sobre lo que es calidad de vida, afortunadamente cada vez existe un mayor consenso sobre la misma, la mayoría hacen referencia a la evaluación subjetiva de la vida entendida como un todo, o la valoración de los pacientes sobre la satisfacción con su nivel de funcionamiento normal comparándolo con el que ellos creían que era posible o ideal. Generalmente la evaluación es realizada mediante encuestas y formularios que incluyen una serie de preguntas o afirmaciones relacionadas con diversos aspectos de la vida de los pacientes y que se denominan globalmente cuestionarios de calidad de vida relacionada con la salud^{9,10}.

Cuba se encuentra en una posición de avanzada en el desarrollo de fármacos inmunoterapéuticos. En el país se encuentra registrado un anticuerpo monoclonal, una vacuna terapéutica y actualmente se desarrollan más de 30 ensayos clínicos de vacunas y otros productos de la biotecnología. A tono con la tendencia internacional dichas investigaciones han incluido en sus análisis para la evaluación de la respuesta el concepto de calidad de vida.

Los resultados preliminares obtenidos muestran un incremento positivo en las variables de respuesta al tratamiento, lo que ha conllevado a que los productos en ensayo clínico sean considerados por los oncólogos cubanos como una opción terapéutica más en el manejo del paciente. El objetivo general del trabajo fue evaluar la calidad de vida de los pacientes incluidos en ensayos clínicos oncológicos y para ello evaluamos la calidad de vida de los pacientes incluidos en ensayos clínicos oncológicos y su influencia en la supervivencia de los pacientes y se determinó el tiempo de supervivencia de los pacientes incluidos en ensayos clínicos oncológicos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio longitudinal, prospectivo, en los servicios de oncología del país, en el periodo comprendido entre los años 2000 y 2020.

Universo

Pacientes oncológicos incluidos en ensayos clínicos.

Muestra

Se realizó un muestreo opinático partiendo de criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

1. Pacientes cubanos de ambos sexos, con diagnóstico de cáncer en algunas de las localizaciones siguientes: pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cabeza y cuello y esófago.

Criterios Diagnóstico

Cáncer de NSCLC

Carcinoma de pulmón avanzado de células no pequeñas en estadio IIIB o IV, definido según TNM.

Cáncer de cabeza y cuello

Adenocarcinoma de cabeza y cuello estadio III o IV o con enfermedad metastásica evolutiva al momento del diagnóstico, con confirmación cito-histológica de su enfermedad.

Cáncer de esófago

Adenocarcinoma de Esófago estadio III o IV o con enfermedad metastásica evolutiva al momento del diagnóstico, con confirmación cito-histológica de su enfermedad.

2. Pacientes con edades mayores o iguales a 18 años.

3. Pacientes que hayan otorgado el consentimiento informado.

4. Pacientes incluidos en alguno de los protocolos de ensayos clínicos que se ejecutan en los servicios de oncología del país.

Pulmón: EC056 Fase II (65), EC081 Fase III (RPCEC00000161, N=228), EC111 Fase III (25), EC120 Fase IV (RPCEC00000181, N=558) y EC157 Fase IV (RPCEC00000205, N=231)

Cabeza y cuello: EC055 Fase III (93), EC113 Fase IV (RPCEC00000089, N=144) y CIMAB4 Fase IV (RPCEC00000145, N=42)

Esófago: EC075 Fase II (RPCEC00000014, N=38), EC144 Fase III (13) y EC163 Fase IV (RPCEC00000215, N=176)

Operacionalización de variables

Calidad de vida

Aprovechamiento general de la vida. Aspectos del sentido del bienestar de una persona y capacidad de llevar a cabo diversas actividades. Bienestar, felicidad, satisfacción de la persona que le permite una capacidad de actuación o de funcionar en un momento dado de la vida. Es propio de cada individuo, que está muy influido por el entorno en el que vive como la sociedad, la cultura y las escalas de valores.

Supervivencia

Se define como el tiempo que transcurre desde la fecha de diagnóstico de la enfermedad hasta el fallecimiento del paciente, independientemente de la causa del mismo.

Metodología

Evaluación de calidad de vida (CV)

Se determinó mediante el análisis de las encuestas de ca-

lidad de vida aplicadas en los diferentes protocolos de ensayos clínicos en que se incluyeron los pacientes. Se analizaron las encuestas aplicadas en dos momentos: antes de la inclusión en el ensayo clínico y en la evaluación correspondiente al 9º mes de tratamiento. Los pacientes que interrumpieron el tratamiento antes de esta evaluación no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los cuestionarios de calidad de vida utilizados son instrumentos validados por la European Organization in the Research and Treatment of Cancer (EORTC) obtenidos por vía electrónica.

Estos instrumentos evalúan las dimensiones que global e integralmente comprende la calidad de vida:

La puntuación máxima para los temas de funcionamiento y estado de salud global indica un buen funcionamiento (saludable) y una elevada calidad de vida, respectivamente, mientras que un marcaje alto en la evaluación de síntomas representa un alto grado de sintomatología o problema de salud.

Los cuestionarios utilizados fueron^{11,12}:

General

EORTC QLQ-C30. Con la estructura siguiente:

Cinco escalas funcionales

funcionamiento físico, rol, emocional, cognitivo y social.

Tres escalas de síntomas

fatiga, dolor, y náusea/vómitos.

Una escala global de salud/calidad de vida.

Ítems individuales que evalúan síntomas adicionales.

Todas las escalas e ítems individuales se convierten en una puntuación de 0 a 100.

Específicos

Cáncer de pulmón: EORTC QLQ-LC13

Cabeza y Cuello: EORTC QLQ-HN35

Esófago: EORTC QLQ-OES24

Evaluación de la supervivencia (SV)

Se analizaron los datos de todos los pacientes incluidos por cada localización tumoral. Los resultados se reportaron en meses, se expresaron en forma de intervalos y medias y se

compararon con los reportados en la literatura para las localizaciones analizadas. En el caso de los pacientes que se mantienen vivos se consideró la fecha de último contacto.

Análisis estadístico

Para la Regresión de Cox se utilizaron las escalas de funcionalidad y de síntomas en el momento inicial, para estimar cuál de ellas predecía mejor la supervivencia de los pacientes para las distintas localizaciones de cáncer. Para comparar las Curvas de Kaplan-Meier, se categorizaron las escalas funcionales (1: 100% de la Funcionalidad y 0: <100% de la Funcionalidad) y las escalas de síntomas (0: 0% de síntomas y 1: > 0% de síntomas). Se estimó la media y mediana y sus intervalos de confianza respectivamente del tiempo de supervivencia y aplicó la "Prueba de log rank" con ayuda del paquete estadístico SPSS 25.0 para Windows y un nivel de significación de 0,05.

Resultados

La muestra de pulmón quedó constituida por 1107 pacientes incluidos en los distintos protocolos. En la Tabla 1 aparece la regresión de Cox para los pacientes de pulmón. Las escalas funcionales que influyen en la supervivencia son la global, físico y emocional y los síntomas que influyen en la supervivencia son el dolor y la pérdida de apetito ($p < 0.05$). En la Figura 1 se observan las curvas de Kaplan Meier para las 5 escalas que dieron significativas. La mediana de los pacientes con el 100% de la escala global fue de 11.83 meses y con < 100% fue de 7.89 meses ($p = 0.018$, Fig. 1A). La mediana de los pacientes con el 100% de la escala física fue de 14.03 meses y con < 100% fue de 6.87 meses ($p = 0.000$, Fig. 1B). La mediana de los pacientes con el 100% de la escala emocional fue de 13.21 meses y con < 100% fue de 6.87 meses ($p = 0.000$, Fig. 1C). La mediana de los pacientes con el 0% del síntoma dolor fue de 8.53 meses y con > 0% fue de 4.11 meses ($p = 0.000$, Fig. 1D). La mediana de los pacientes con el 0% de pérdida de apetito fue de 8.97 meses y con > 0% fue de 4.17 meses ($p = 0.000$, Fig. 1E).

La muestra de cabeza y cuello quedó constituida por 279 pacientes incluidos en los distintos protocolos. En la Tabla 2 aparece la regresión de Cox para los pacientes de cabeza y cuello. Las escalas funcionales que influyen en la supervivencia son la física y el rol y el síntoma que influye en la super-

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Global0	-,005	,002	5,214	1	,022	,995	,992	,999
Físico0	-,009	,003	13,703	1	,000	,991	,986	,996
Rol0	-,001	,002	,455	1	,500	,999	,995	1,002
Emocional0	,005	,002	5,164	1	,023	1,005	1,001	1,009
Cognitivo0	,000	,002	,036	1	,850	1,000	,996	1,005
Social0	-,001	,002	,550	1	,458	,999	,995	1,002
Fatiga0	-,001	,003	,195	1	,659	,999	,994	1,004
Nausea0	,001	,002	,123	1	,725	1,001	,996	1,005
Dolor0	-,005	,002	7,559	1	,006	,995	,992	,999
Disnea0	-,002	,001	1,173	1	,279	,998	,995	1,001
Disfonia0				0 ^a				
Insomnio0	-,002	,001	1,220	1	,269	,998	,996	1,001
Apetito0	-,004	,001	9,474	1	,002	,996	,993	,998
Constipacion0	-,001	,001	,161	1	,688	,999	,997	1,002
Diarrea0	,002	,002	,610	1	,435	1,002	,997	1,007
Financiero0	,002	,001	2,857	1	,091	1,002	1,000	1,005

a. Grado de libertad reducido debido a covariables constantes o dependientes linealmente disfonia0 = 100 - disnea0

Tabla 1. Variables en la ecuación de Regresión de Cox para Pulmón

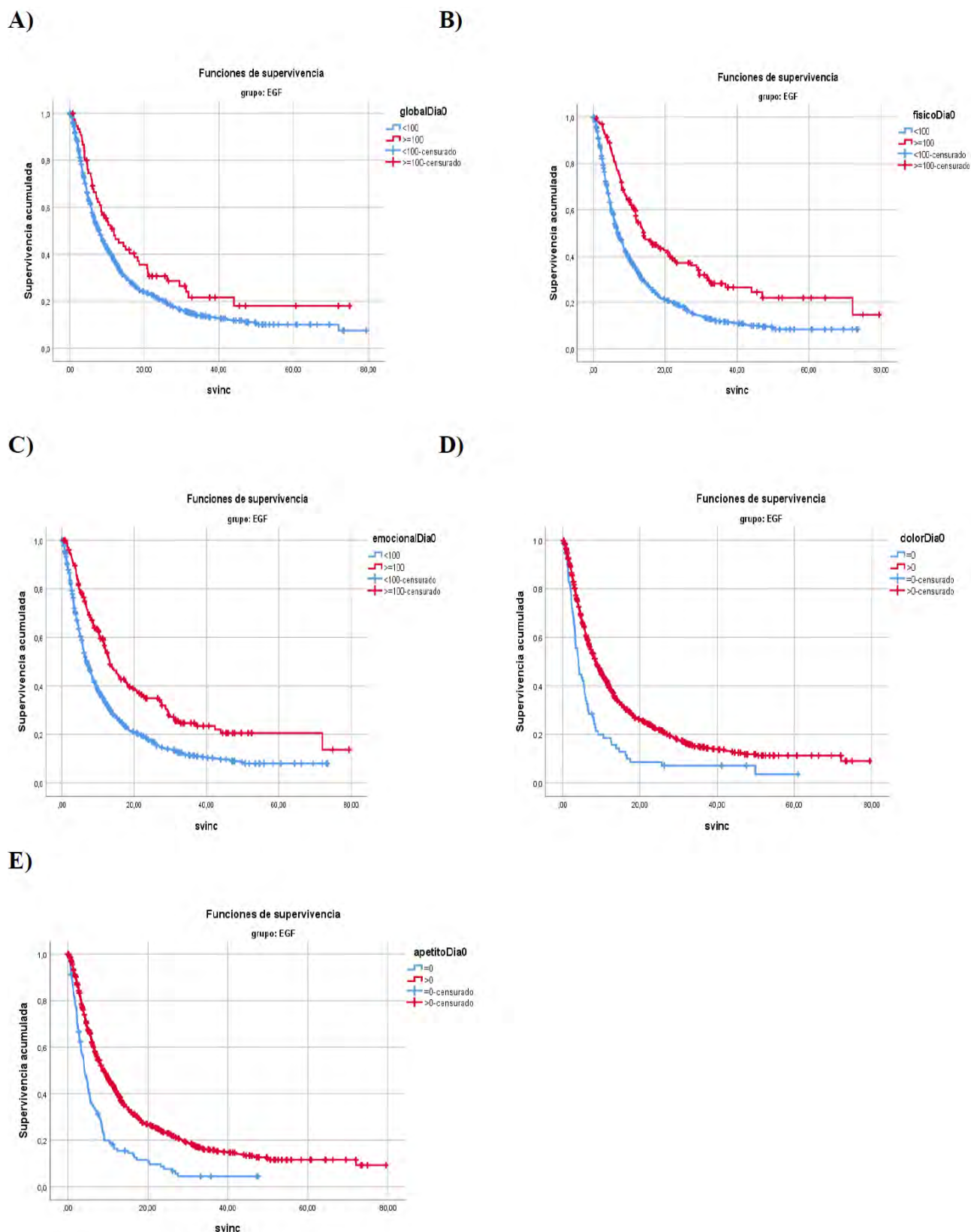


Figura 1. Curvas de Kaplan-Meier para Pulmón.

vivencia es el dolor ($p < 0.05$). En la Figura 2 se observan las curvas de Kaplan Meier para las 3 escalas que dieron significativas. La mediana de los pacientes con el 100% de la escala física fue de 17.17 meses y con $< 100\%$ fue de 11.53 meses ($p = 0.045$, Fig. 2A). La mediana de los pacientes con el 100% de la escala rol fue de 14.87 meses y con $< 100\%$ fue de 11.30 meses ($p = 0.031$, Fig. 2B). La mediana de los pacientes con el

0% del síntoma dolor fue de 19.63 meses y con $> 0\%$ fue de 11.33 meses ($p = 0.001$, Fig. 2C).

La muestra de esófago quedó constituida por 227 pacientes incluidos en los distintos protocolos. En la Tabla 3 aparece la regresión de Cox para los pacientes de esófago. La única escala que influye en la supervivencia es el síntoma dolor ($p < 0.05$).

	B	SE	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Global0	,006	,004	1,998	1	,157	1,006	,998	1,014
Fisico0	-,017	,005	10,165	1	,001	,983	,973	,994
Rol0	-,009	,004	5,099	1	,024	,991	,984	,999
Emocional0	,003	,004	,530	1	,467	1,003	,996	1,010
Cognitivo0	,003	,004	,426	1	,514	1,003	,995	1,011
Social0	,004	,003	1,703	1	,192	1,004	,998	1,011
Fatiga0	-,004	,005	,790	1	,374	,996	,987	1,005
Nausea0	,000	,004	,001	1	,975	1,000	,992	1,008
Dolor0	,010	,003	8,975	1	,003	1,010	1,003	1,016
Disfonia0	,001	,003	,027	1	,869	1,001	,994	1,007
Insomnio0	,004	,003	1,734	1	,188	1,004	,998	1,009
Apetito0	-,005	,003	2,606	1	,106	,995	,990	1,001
Constipacion0	,005	,003	3,299	1	,069	1,005	1,000	1,010
Diarrea0	,007	,005	1,414	1	,234	1,007	,996	1,017
Financiero0	,000	,003	,027	1	,869	1,000	,994	1,005

Tabla 2. Variables en la ecuación de Regresión de Cox para Cabeza y Cuello.

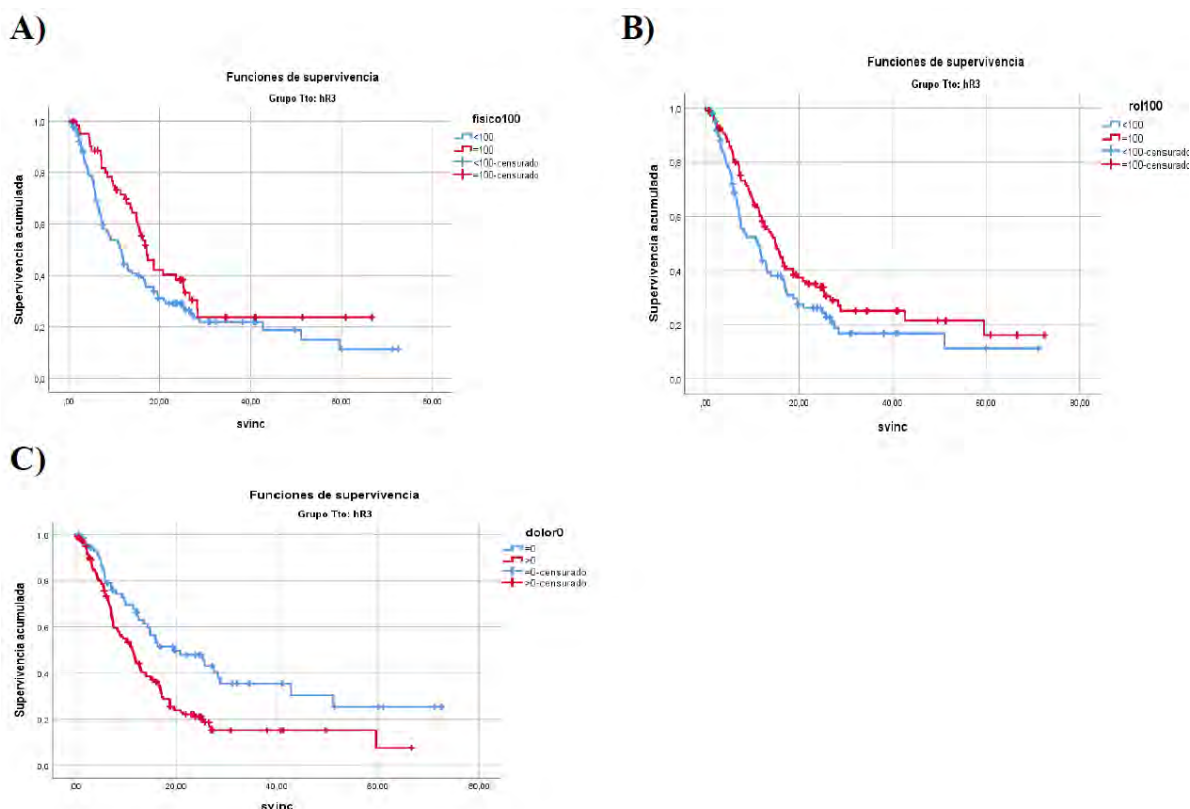


Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier para Cabeza y Cuello.

En la Figura 3 se observan las curvas de Kaplan Meier para la única escala significativa. La mediana de los pacientes con el 0% del síntoma dolor fue de 16.85 meses y con >0% fue de 11.89 meses ($p=0.001$, Fig. 3).

Discussion

Evaluación de la calidad de vida (CV)

Al realizar un análisis de los resultados se observa que

es esperado atendiendo a que en el momento de la evaluación los pacientes han concluido los tratamientos oncoespecíficos, ya sea cirugía, quimioterapia y/o radioterapia, que afectan considerablemente sus condiciones tanto físicas, psicológicas como sociales siendo la dimensión física la más afectada no solo por los síntomas de la enfermedad sino también por los efectos adversos que están asociados a los tratamientos impuestos^{13,14}.

Esta dimensión física además influye en el comportamiento del resto de las dimensiones, aunque en el caso de la psicológica y la social también juega un papel importante el

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI para Exp(B)	
							Inferior	Superior
	,003	,005	,309	1	,578	1,003	,993	1,013
Fisico0	-,008	,010	,730	1	,393	,992	,973	1,011
Rol0	,007	,008	,715	1	,398	1,007	,991	1,023
Emocional0	,005	,008	,340	1	,560	1,005	,988	1,022
Cognitivo0	,000	,007	,002	1	,963	1,000	,986	1,015
Social0	-,008	,007	1,282	1	,257	,992	,977	1,006
Fatiga0	,009	,009	,913	1	,339	1,009	,991	1,027
Nausea0	-,014	,008	2,971	1	,085	,986	,971	1,002
Dolor0	,015	,007	4,126	1	,042	1,015	1,001	1,030
Disfonia0	-,007	,007	,898	1	,343	,993	,980	1,007
Insomnio0	-,009	,006	2,511	1	,113	,991	,980	1,002
Apetito0	,007	,005	1,785	1	,182	1,007	,997	1,017
Constipacion0	-,003	,006	,372	1	,542	,997	,986	1,008
Diarrea0	-,008	,005	2,845	1	,092	,992	,983	1,001
Financiero0	-,004	,006	,359	1	,549	,996	,984	1,009

Tabla 3. Variables en la ecuación de Regresión de Cox para Esófago.

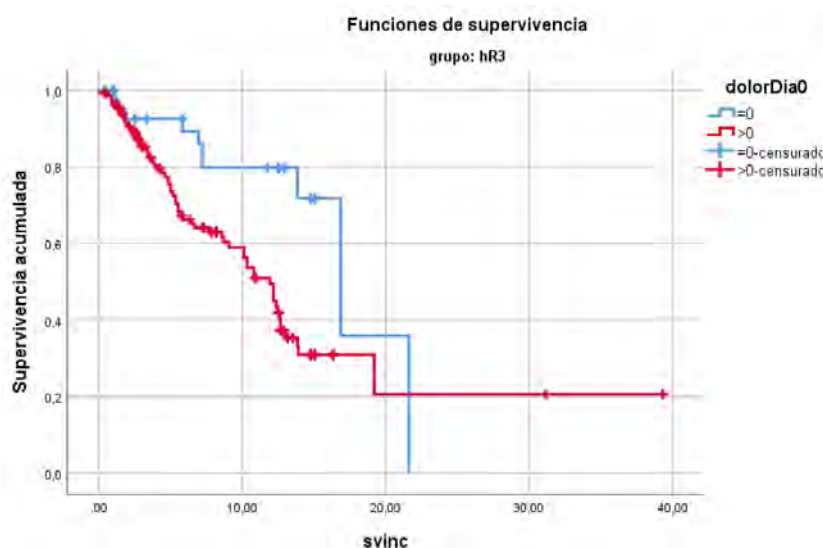


Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier para Esófago.

manejo que la familia hace del paciente y que muchas veces limita sus actividades aun cuando sus condiciones físicas no lo requieran¹⁵.

Hubo una mejoría en la calidad de vida de los pacientes con cáncer de pulmón en las dimensiones global, físico y emocional y una disminución de los síntomas de dolor y pérdida del apetito. Por otro lado, los pacientes de cabeza y cuello experimentaron una mejoría en la calidad de vida en las dimensiones física y rol y una disminución del síntoma dolor. Por último, los pacientes con cáncer de esófago, tuvieron una disminución del síntoma dolor.

Desde el punto de vista físico la mejoría es explicable por dos factores fundamentales: en primer lugar, por la reducción de los eventos adversos del tratamiento¹⁶ y en segundo lugar por la eficacia que han demostrado los productos en ensayos clínicos utilizados por los pacientes incluidos en el estudio.

Desde el punto de vista psicológico el aumento de los porcentajes en las categorías de la calidad de vida puede estar relacionado con el hecho de que el paciente se siente tratado en un momento de su enfermedad oncológica en que, de manera general, no se imponen tratamientos oncoespecíficos. Otro as-

pecto que puede influir en este comportamiento puede ser que estos tratamientos no requieren hospitalización del paciente y que la mejoría física evidente hace que el paciente muestre una aptitud mejor ante la vida que durante los tratamientos citotóxicos.

Todas estas razones hacen que los pacientes logren incorporarse a las actividades diarias, ya sean domésticas o laborales, la mejoría de los síntomas y de la aptitud ante la vida presupone una mejor relación con amigos y familiares, todo esto hace que el comportamiento de la dimensión social aumente sus porcentajes positivos.

Según estudios realizados los pacientes durante su tratamiento con productos en ensayos clínicos muestran una mejor calidad de vida que los tratados convencionalmente¹⁷. Al comparar los resultados obtenidos en este estudio se constata que el comportamiento coincide con esta afirmación y en el mismo influyen factores como el mencionado hecho de la diferencia en los eventos adversos asociados a los tratamientos, pero también la forma de manejo del paciente incluido en ensayo clínico. Las normas que rigen las investigaciones clínicas exigen que los pacientes sean tratados de forma estrictamente

protocolizada, velando por sus derechos y bienestar y esto hace que su vida sea finalmente más saludable. Estas razones hacen que muchos autores planteen la necesidad de que las exigencias de la práctica médica habitual se acerquen cada vez más a las de las investigaciones clínicas.

Evaluación de la supervivencia (SV)

Para el análisis de la supervivencia se tomaron como referencia los valores descritos por la literatura para cada localización y luego de recibir el tratamiento oncoespecífico. En todos los casos el tiempo promedio de supervivencia de la muestra superó el valor reportado.

Este es un resultado esperado si tenemos en cuenta que algunos autores plantean que la calidad de vida es el pronosticador más importante de supervivencia entre los pacientes que tienen cáncer y en varias investigaciones publicadas se ha observado un incremento proporcional de ambos factores¹⁸. Por tanto, los resultados obtenidos del análisis de calidad de vida tienen una relación directa con los del análisis de la supervivencia^{19,20,21}.

Estos resultados subrayan la importancia de ayudar a los pacientes a mejorar la calidad de vida en la medida que podamos para poderles ayudar a vivir más tiempo y mejor.

Conclusiones

Los pacientes incluidos en ensayos clínicos oncológicos mostraron un incremento en la calidad de vida, lo cual influyó positivamente en el aumento de la supervivencia. El tiempo de supervivencia de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos fue superior al compararlo con lo reportado por la literatura.

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud [sitio Web en Internet]. Cáncer, Inc.; 2010 [actualizado Ene 2010; citado Feb 2010]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
2. World Health Organization. Globocan 2018. The Global Cancer Observatory, May 2019.
3. Figueredo K. Cuidados paliativos: una opción vital para pacientes con cáncer de mama. Rev haban cienc méd. [serie en Internet]. 2008 Oct–Dic [citado Nov 2009]; VII (4): [aprox. 4p.]. Disponible en: http://www.ucmh.sld.cu/rhab/rhcm_vol_7num_4/rhcm09408.htm
4. Sansó FJ, Alonso P, Torres RM. Mortalidad por cáncer en Cuba. Revista Cubana de Salud Pública. [serie en Internet]. 2010 [citado Nov 2009]; 36(1): [aprox. 14p.]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol_36_01_spu09110.pdf
5. Bess S, Alonso I, Sánchez E, López LM y col. Anuario Estadístico de Salud 2018. ISBN: 1561-4433. Abr 2019. <http://bvscuba.sld.cu/anuario-estadístico-de-cuba/>
6. Bermejo W, Abreu G, Rubio MC, Romero T. Programa Integral para el Control del Cáncer en Cuba 2020. ISBN: 978-959-313-783-6. <http://ecimed.sld.cu>
7. Arango MC, González A. Vacunas terapéuticas en cáncer. Ensayos clínicos actuales. Rev cubana med. [serie en Internet]. 2002 [citado Nov 2009]; 41(6): [aprox. 5p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-752320020006000009&lng=es&nrm=iso
8. Lerma JM. Marcadores tumorales en la inmunoterapia contra el cáncer. Revista Salud Pública y Nutrición. 2009; 7.
9. Contreras J. Definición y áreas de la calidad de vida en oncología. Oncología (Barc). [serie en Internet]. 2005 [citado Dic 2009]; 28(3): [aprox. 5p.]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0378-48352005000300002&script=sci_arttext
10. Arrarás JI, Dueñas T, Meiriño R, Prujá E, Villafranca E, Valerdi JJ. La Calidad de Vida en el paciente oncológico: estudios del Servicio de Oncología del Hospital de Navarra en el Grupo de Calidad de Vida de la EORTC. Anales. [serie en Internet]. 1998 [citado Dic 2009]; 21(1): [aprox. 4p.]. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol21/n1/revis2a.html>
11. EORTC [sitio Web en Internet]. Quality of Life, Inc.; 2010 [citado Feb 2010]. Disponible en: <http://groups.eortc.be/qol/>
12. EORTC [sitio Web en Internet]. Activities, Inc.; 2010 [citado Feb 2010]. Disponible en: http://groups.eortc.be/qol/qolg_activities.htm
13. Perry S, Kowalski T, Chang C. La calidad de vida de evaluación en las mujeres con cáncer de mama: ventajas, la aceptabilidad y la utilización. Health and Quality of Life Outcomes. [serie en Internet]. 2007 [citado Nov 2009]; (5): [aprox. 5p.]. Disponible en: http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1877797
14. Espantoso R, Fernández C, Padierna C, et al. Calidad de vida en pacientes oncológicos un año después de finalizado el tratamiento. Revista de Psicooncología. [serie en Internet]. 2007 [citado Nov 2009]; 4(1): [aprox. 5p.]. Disponible en: http://www.psiquiatria.com/articulos/psicologia/psicologia_oncologica/33974/
15. Torres A, Sanhueza O. Modelo estructural de enfermería de calidad de vida e incertidumbre frente a la enfermedad. Cienc. Enferm. [serie en Internet]. 2006 [citado Nov 2009]; 12(1): [aprox. 4p.]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95532006000100002&script=sci_arttext
16. Muriel C, Cervera JM, Constela M, Sánchez I, Neira M. Evaluación del tratamiento del dolor crónico en pacientes oncológicos con buprenorfina transdérmica. Rev. Soc. Esp. Dolor. [serie en Internet]. 2008 [citado Nov 2009]; 15(5): [aprox. 4p.]. Disponible en: <http://revista.sedolor.es/articulo.php?ID=563>
17. Sánchez R, Ballesteros M, Gómez A. Medición de la calidad de vida en ensayos clínicos de pacientes con cáncer. Un estudio bibliométrico. Rev Colom Cancerol. [serie en Internet]. 2009 [citado Dic 2009]; 13(1): [aprox. 5p.]. Disponible en: [http://www.cancer.gov.co/documentos/RevistaCC2009%20Vol%2013\(1\)/rcc2009v13n1a05.pdf](http://www.cancer.gov.co/documentos/RevistaCC2009%20Vol%2013(1)/rcc2009v13n1a05.pdf)
18. Terra [sitio Web en Internet]. USA. La calidad de vida predice la supervivencia del cáncer de pulmón, Inc.; 2010 [actualizado Ene 2010; citado Feb 2009]. <http://www.terra.com/salud/articulo/html/sal16901.htm>
19. Montazeri A. Quality of life data as prognostic indicators of survival in cancer patients: an overview of the literature from 1982 to 2008. Health and Quality of Life Outcomes. 2009, 7:102. <http://www.hqlo.com/content/7/1/102> doi: 10.1186/1477-7525-7-102
20. Montazeri A. Is quality of life data predictive of survival in cancer patients? A rapid and systematic review of the literature. Iranian Journal of Cancer Prevention 2009, Vol 2, No 1: 1-14.
21. White N, Reid F, Harris A, Harries P, Stone P. A systematic review of predictions of survival in palliative care: How accurate are clinicians and who are the experts? PLoS ONE 2016,11(8): e0161407. doi: 10.1371/journal.pone.0161407

Received: 11 junio 2020

Accepted: 18 julio 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Depresión: Una experiencia del Hospital del Adulto mayor, Quito, Ecuador, 2018 Depression: An experience of the Hospital for the Elderly, Quito, Ecuador, 2018

María Erazo¹, Martha Fors²

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.11

Resumen: El Instituto Nacional de Salud Mental, ha revelado que aproximadamente el 15%, de adultos mayores, han presentado al menos un episodio de depresión, en su etapa de transición hacia la vejez. El objetivo de este trabajo fue establecer la prevalencia de depresión y los posibles factores asociados con la misma, en población de adultos mayores del Hospital de Atención Integral del Adulto Mayor, durante el período de marzo a mayo del 2018. Se hizo un estudio observacional de prevalencia. Se aplicó el Test de Yesavage y se utilizó la Escala socio familiar de Gijón. Se compararon proporciones utilizando estadígrafos distribuidos Chi cuadrado, se utilizó Pruebas T de student para comparación de medias. Se analizaron factores de riesgo, asociados con el desarrollo de la depresión mediante la regresión logística bivariada y multivariada. Se calcularon intervalos Odds ratios y sus intervalos de confianza al 95%. La prevalencia de depresión en adultos mayores fue del 55,0%, con predominio en el sexo masculino quienes representaron el 59,2%, en sujetos divorciados y viudos con el 72,7% y el 72,1% respectivamente, con un nivel de instrucción secundaria, correspondiente al 67,0%, en residentes del área rural con el 60,0%, en adultos mayores con diagnóstico de enfermedad de Parkinson, quienes alcanzaron el 77,3%, en hospitalizados con el 68,2%, en lo referente al riesgo social, se observó que a mayor riesgo social, mayor porcentaje de depresión. Existe una alta prevalencia de depresión en población de adultos mayores, con factores predisponentes, que pueden ser modificables, si se realiza la atención del adulto mayor por parte de un equipo multidisciplinario, si se toman medidas de prevención, antes del desarrollo de la misma, con un soporte emocional.

Palabras clave: Depresión, adulto mayor, Test de Yesavage, Test de Gijón.

Abstract: The National Institute of Mental Health has revealed that approximately 15% of older adults have had at least one episode of depression in their transition to old age. The objective of this work was to establish the prevalence of depression and the possible factors associated with it, in the elderly population of the Comprehensive Care Hospital for the Elderly, during the period from March to May 2018. An observational study of prevalence. The Yesavage test was applied, and the Gijón socio-family scale was used. Proportions were compared using Chi-square distributed statistics, Student's t-tests were used to compare means. Risk factors associated with the development of depression were analyzed using bivariate and multivariate logistic regression. Odds ratios and their 95% confidence intervals were calculated. The prevalence of depression in older adults was 55.0%, with a predominance of males representing 59.2%, in divorced and widowed subjects with 72.7% and 72.1% respectively, with a secondary education level, corresponding to 67.0%, in residents of rural areas with 60.0%, in older adults diagnosed with Parkinson's disease, which reached 77.3%, in hospitalized with 68.2%. Regarding social risk, it was observed that the higher the social risk, the higher the percentage of depression. There is a high prevalence of depression in the elderly population, with predisposing factors, which may be modifiable, if the care of the elderly is carried out by a multidisciplinary team, if preventive measures are taken, before their development, with emotional support.

Key words: Depression, older adult, Yesavage test, Gijón test.

Introducción

La depresión es un trastorno mental que afecta el estado de ánimo; en la actualidad su prevalencia ha ido en aumento, presentándose y afectando mayoritariamente a los grupos más vulnerables, en esta ocasión se destaca a la población de adultos mayores. De acuerdo al Instituto Nacional de Salud Mental, se estima que alrededor del 15% de los individuos mayores de 65 años, han presentado al menos un episodio de depresión, en su etapa de transición a la vejez¹.

Se considera que el envejecimiento es un fenómeno mundial que por diversos factores ha ido en aumento, por ejemplo, el aumento de la esperanza de vida, la disminución de la tasa de natalidad, el avance tanto a nivel científico como tecnológico, entre otros. Se estima que para el año 2050 la población de adultos mayores será del 22%². En nuestro país existen 1.049.824 personas, cuya edad es igual o mayor a los 65 años, representando el 6,5% de la totalidad de la población³.

El Ecuador es un país que se encuentra en un proceso

de transición demográfica hacia el envejecimiento. En 1970, la población de adultos mayores constituía el 4,2% de la totalidad, en el 2012 formaron parte del 6,7% de la población y se considera que en el 2050 este porcentaje incrementará al 16%⁴. Motivo por el cual se estima que la prevalencia del trastorno depresivo tendrá un incremento directamente proporcional con el envejecimiento. Es relevante considerar que Ecuador ocupa el puesto décimo primero, con una prevalencia del 4,6% de depresión, en América Latina. Se estima que para el año 2050, la prevalencia de este trastorno será del 22%. En cifras absolutas esto quiere decir que aproximadamente 2 mil millones de personas, mayores de 60 años, para ese entonces podrán sufrir de depresión⁵.

Existe limitada información en nuestro país referente a la prevalencia de este trastorno psiquiátrico en población mayor a 65 años, tampoco se conocen cuáles pudieran ser los factores que influyen en su aparición, es por esta razón que se

¹ Doctora en Medicina. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador.

² Doctora en Ciencias Médicas. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador.

propone realizar este estudio.

Materiales y métodos

Estudio Observacional, descriptivo, transversal (prevalencia) donde se incluyeron pacientes adultos mayores de 65 años de edad en adelante, del Hospital de Atención Integral del Adulto Mayor, hospitalizados o de manera ambulatoria. Se excluyeron pacientes con diagnóstico de demencia, con deterioro cognitivo de moderado a severo y pacientes con enfermedades terminales, así como pacientes que rechazaron la participación en el estudio.

Tamaño de muestra

Considerando una población finita (20000 adultos mayores), una precisión del 3%, un nivel de confianza del 95%, una prevalencia esperada del 5% y un porcentaje de posibles pérdidas de 5% se incluyeron un total de 211 sujetos.

La fórmula utilizada para determinar el tamaño de la muestra fue la siguiente:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Para la selección de los sujetos se utilizó un muestreo estratificado. Los sujetos se dividieron en dos estratos: pacientes ambulatorios y pacientes hospitalizados. Dentro de cada estrato se realizó un muestreo aleatorio simple partiendo de un listado provisto por el Departamento de Estadística de la institución.

Instrumentos de medición

Se aplicaron el test de Yesavage y la escala sociofamiliar de Gijón.

Análisis estadístico

Se calcularon frecuencias absolutas y relativas para variables cualitativas y media, medianas y desviación estándar para las cuantitativas. Se utilizó para comparaciones de proporciones en caso de variables cualitativas la prueba Chi cuadrado) y la prueba T de Student para comparar medias en caso de variables cuantitativas. Se consideró un valor de p de < 0.05 como estadísticamente significativo. Se realizó una regresión logística bivariada y multivariada, para determinar si existe asociación entre la depresión y algunos posibles factores de riesgo para su aparición. Los datos se procesaron en el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) en su versión 24.0.

Resultados

Se pudo establecer que existe un predominio del sexo femenino representando el 53,6% de la totalidad de participantes, mientras que al sexo masculino corresponde el 46,4% restante. En cuanto al estado civil, se observó que prevalecía la condición de casado/a con un 44,1%, seguido de la condición de viudo/a con el 40,8%, a continuación, el estado de soltero/a con el 10,0% y finalmente la condición de divorciado/a con un 5,2%, ningún participante del estudio se encontraba dentro de la condición de unión libre, como respuesta a su estado civil. En referencia al nivel de escolaridad, la mayor parte de los par-

ticipantes alcanzaron un nivel de instrucción de primaria incompleta correspondiente al 29,9%, seguido de un 18,0% que correspondía al nivel de secundaria completa, muy seguido del nivel de primaria completa con el 17,1% y el de secundaria incompleta con el 16,1%, se pudo evidenciar que el menor porcentaje se atribuyó al bachillerato incompleto, representando el 0,5% sin embargo, tres participantes de la totalidad, confirmaron haber llegado a obtener un nivel de instrucción superior completa, significando el 1,4%. Se pudo establecer además que el 10,0% de la población no tenía ningún nivel de escolaridad, en tanto que, no se encontró a ningún participante perteneciente a la categoría de nivel de instrucción superior incompleta y estudios de cuarto nivel.

El área de residencia, los antecedentes patológicos personales y la condición de cada paciente también fueron características analizadas en la población, en cuanto al área de residencia se pudo identificar que, de los 211 participantes, 191 personas habitan en la zona urbana, mientras que los 90 restantes, en la zona rural, representando el 90,5% y el 9,5% respectivamente. Acerca de los antecedentes patológicos personales se tomaron en cuenta cuatro patologías específicas: Hipotiroidismo, Enfermedad de Parkinson, Artritis Reumatoide y Enfermedad coronaria; se encontró que el 43,1% de los participantes no tenían ninguna patología asociada, referente a las mencionadas en el estudio, representando la mayoría (Tabla 1)

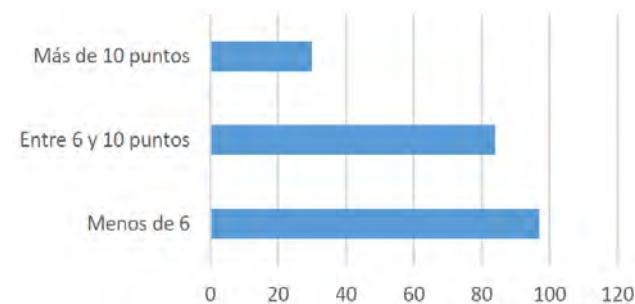


Figura 1. Sujetos según puntaje de Yesavage.

En la Figura 1, se observa que la mayoría de los sujetos, con el 46,0%, obtuvieron un puntaje menor a 6 en el Test de Yesavage, compatible con que no presentaban depresión. El 39,8% presentaban entre 6 y 10 puntos, lo que coincide con una leve depresión, y el 14,2% restante alcanzaron una puntuación mayor a 10, lo que determina una depresión establecida. Además, se constató que la media de puntaje de Yesavage fue de 6,1 con una DE de 3,1.

En la Tabla 2, se visualiza la prevalencia de la depresión de acuerdo con las características analizadas en la muestra, obteniendo como resultado que se presentó depresión leve y depresión establecida en el 54,0% de los sujetos, de los cuales 49,6% fueron del sexo femenino y el 59,2% restante, del masculino; estos resultados no presentaron significación estadística ($p > 0,05$), sin embargo, se pudo determinar el predominio de la depresión en el sexo masculino sobre el femenino. En cuanto al estado civil, el mayor porcentaje de depresión se evidenció en los sujetos divorciados y en los viudos, con el 72,7% y el 72,1% respectivamente. Existe una diferencia estadística significativa entre el nivel de depresión y el estado civil ($p = 0,05$). En relación a la escolaridad, en la categoría de secundaria, el 67,0% de sujetos obtuvieron más de 6 puntos y el 33,0% menos de 6, siendo la única categoría en la que la mayoría de sujetos presentaron depresión, en el nivel superior, la totalidad de sujetos no presentaron depresión, con un valor de $p = 0,00$, demostrando una diferencia estadística significativa. En cuan-

	No	%
Sexo		
Masculino	98	46,4
Femenino	113	53,6
Estado civil		
Soltero	21	10,0
Casado	93	44,1
Divorciado	11	5,2
Viudo	86	40,8
Escolaridad		
Ninguna	21	10,0
Primaria	99	37,0
Secundaria	72	34,1
Bachillerato	16	7,6
Superior completa	3	1,4
Área de residencia		
Urbana	191	90,5
Rural	20	9,5
Antecedentes patológicos personales		
Hipotiroidismo	50	23,7
Enfermedad de Parkinson	22	10,4
Enfermedad Coronaria	29	13,7
Artritis Reumatoide	19	9,0
Ninguna de las anteriores	91	43,1
Condición		
Ambulatoria	126	59,7
Hospitalización	85	40,3

Tabla 1. Características generales de la muestra.

to al lugar de residencia y el nivel de depresión, pese al predominio de la misma en los sujetos residentes del área rural, no existió una diferencia marcada. En lo referente a los antecedentes patológicos personales, en la Enfermedad de Parkinson el 77,3% de los sujetos presentaron depresión, constituyendo la mayor proporción, entre todas las patologías mencionadas en el estudio, seguida de la Artritis reumatoide, la Enfermedad coronaria y el Hipotiroidismo, se pudo establecer que existen diferencias estadísticas significativas entre el nivel de depresión y los antecedentes patológicos personales ($p=0,00$). De acuerdo a la condición del paciente, los sujetos hospitalizados que presentaron depresión alcanzaron el 68,2%, representado la mayoría, lo que implica que un mayor nivel de depresión se encontró en los pacientes hospitalizados, esto quiere decir que existen diferencias estadísticas significativas entre el nivel de depresión y la condición del paciente con un valor del 0,01.

La Escala de Gijón integra cinco aspectos que son situación familiar, situación económica, vivienda, relaciones sociales y apoyo de la red social, en la primera categoría, el mayor porcentaje, correspondía a los sujetos que vivían sin dependencia física ni psíquica, con el 44,5%, a continuación se encontraban los sujetos que viven con cónyuge de similar edad con el 24,6%, los que viven con familia y/o cónyuge y presenta algún grado de dependencia con el 15,2%, los que viven solos y tienen hijos próximos con el 8,5% y finalmente representando la minoría

con el 7,1%, los que viven solos y carecen de hijos o viven alejados. En la segunda categoría, la mayoría de sujetos tenían un ingreso desde salario mínimo a pensión mínima contributiva, con un 46,9%, correspondiente a un ingreso de sueldo por jubilación y con tan sólo el 1,4%, siendo la minoría, se encontraban los sujetos con un ingreso desde 1.5 veces el salario mínimo hasta el salario mínimo exclusive. En la tercera categoría se pudo identificar que la mayor parte de los sujetos habitaban en una vivienda adecuada a sus necesidades, representando el 91,5% y tan solo el 0,5%, tenían condiciones inadecuadas en su vivienda. En la cuarta categoría, se pudo establecer que el 40,8% de sujetos, siendo la mayoría, mantenían relaciones sociales, el 26,5% mantenían relaciones sociales o sólo con familia o sólo con vecinos, el 22,7% sostenían relaciones sociales con familia y vecinos, el 8,5% de sujetos no salen del domicilio, pero reciben visitas y el 1,4% restante, siendo la minoría, no salen del domicilio ni reciben visitas. En la quinta categoría, el 62,6% de sujetos recibían apoyo social de voluntariado social y ayuda domiciliaria, el 36,0% recibía apoyo de familia y vecinos, el 0,9% no tenía ningún apoyo y el 0,5% restante tenían requerimiento de cuidados permanentes. (Tabla 3)

Se observa que los sujetos con una escolaridad secundaria tienen 1,40 (OR 2,40) veces la posibilidad de tener una probable depresión o depresión que aquellos sujetos con una educación primaria.

Test de Yesavage	Menos de 6 puntos		Más de 6 puntos		Total	Valor de p
	No	%	No	%		
Sexo						
Masculino	40	40,8	58	59,2	98	0,16
Femenino	57	50,4	56	49,6	113	
Estado civil						
Soltero/a	10	47,6	11	52,4	21	*0,05
Casado/a	51	54,8	42	57,0	93	
Divorciado/a	2	18,2	9	72,7	11	
Viudo/a	34	39,5	52	72,1	86	
Unión de hecho	0	0	0	0	0	
Escolaridad						
Primaria	65	54,2	55	45,8	120	*0,00
Secundaria	29	33,0	59	67,0	88	
Superior	3	100,0	0	0	3	
Área de residencia						
Urbana	89	46,6	102	53,4	191	0,57
Rural	8	40,0	12	60,0	20	
Antecedentes patológicos personales						
Hipotiroidismo	18	36,0	32	64,0	50	*0,00
Parkinson	5	22,7	17	77,3	22	
Cardiopatía	10	34,5	19	65,5	29	
Artritis reumatoide	6	31,6	13	68,4	19	
Ninguna de las anteriores	58	63,7	33	36,3	91	
Condición						
Ambulatorio	70	55,6	56	44,4	126	*0,01
Hospitalizado	27	31,8	58	68,2	85	

Tabla 2. Prevalencia de depresión.

También se observa que los sujetos hospitalizados tienen 1,68 (OR 2,68) veces más posibilidades de tener esta condición que aquellos adultos mayores ambulatorios. Cuando se analizan los OR ajustados, se encuentra que estas dos variables siguen constituyendo factores de riesgo. (Tabla 4)

Discusión

La prevalencia de la depresión en adultos mayores del presente estudio fue del 55,0%, mayor a la reportada en la ciudad de Cuenca donde se realizó un estudio en el centro de promoción para el envejecimiento activo del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social en el 2014, donde se encontró una prevalencia del 33,33%, de igual manera un estudio realizado en la ciudad de Guayaquil en el Centro gerontológico "Dr. Arsenio de la Torre Marcillo" del Instituto Ecuatoriano de Seguridad

Social, en el año 2013, reportó una prevalencia del 21,0%. Por el contrario, México reporta una prevalencia del 74,3%, dato que reveló la Encuesta Nacional de Salud y Envejecimiento. Otro estudio realizado en la Habana, Cuba, en el 2017, reporta una prevalencia del 17,6%, representando la prevalencia más baja de los estudios analizados.

Aunque no se evidenció significación estadística, se pudo determinar el predominio de la depresión en el sexo masculino. Según la investigación de Sigüenza⁶, la mayor prevalencia se observó en las mujeres, con el 28,2% y tan sólo el 5,1% en los hombres; el estudio de Espinoza y Vacacela⁷, reporta el 17% en mujeres y el 4% en hombres; al igual que en México, el mayor porcentaje perteneció a la población femenina con el 55,8%. Un estudio realizado en Colombia, de manera similar revela mayor riesgo de probabilidad de depresión en el sexo femenino con un porcentaje del 64,2%.

En relación a los factores de riesgo, al analizar el estado

	No.	%
Situación familiar		
Vive con familia sin dependencia físico/psíquica	94	44,5
Vive con cónyuge de similar edad	52	24,6
Vive con familia y/o cónyuge y presenta algún grado de dependencia	32	15,2
Vive solo y tiene hijos próximos	18	8,5
Vive solo y carece de hijos o viven alejados	15	7,1
Situación económica		
Más de 1.5 veces el salario mínimo	8	3,8
Desde 1.5 veces el salario mínimo hasta el salario mínimo exclusive	3	1,4
Desde el salario mínimo a pensión mínima contributiva	99	46,9
LISMI – FAS – Pensión no contributiva	47	22,3
Sin ingresos o inferiores al apartado anterior	54	25,6
Vivienda		
Adecuada a necesidades	193	91,5
Barreras arquitectónicas en la vivienda o portal de la casa (peldaños, puertas estrechas, baños...)	17	8,1
Humedades, mala higiene, equipamiento inadecuado (sin baño completo, agua caliente, calefacción...)	1	0,5
Ausencia de ascensor, teléfono	0	0,0
Vivienda inadecuada (chabolas, vivienda declarada en ruina, ausencia de equipamientos mínimos)	0	0,0
Relaciones sociales		
Relaciones sociales	86	40,8
Relación social sólo con familia y vecinos	48	22,7
Relación social sólo con familia o vecinos	56	26,5
No sale del domicilio, recibe visitas	18	8,5
No sale y no recibe visitas	3	1,4
Apoyo social		
Con apoyo familiar y vecinal	76	36,0
Voluntariado social, ayuda domiciliaria	132	62,6
No tiene apoyo	2	0,9
Pendiente del ingreso en residencia geriátrica	0	0,0
Tiene cuidados permanentes	1	0,5

Tabla 3. Escala de Gijón.

No ajustados		Ajustados		
	OR(IC95%)	p	OR(IC95%)	p
Sexo				
Masculino	Referencia		Referencia	
Femenino	0,67 (0,39-1,17)	0,16	0,94 (0,41-1,46)	0,44
Estado civil				
Soltero	Referencia		Referencia	
Casado	0,74 (0,29-1,93)	0,55	0,54 (0,19-1,479)	0,23
Divorciado	4,09 (0,70-23,66)	0,27	3,99 (0,66-24,06)	0,13
Viudo	1,39 (0,53-3,62)	0,50	0,97 (0,34-4,97)	0,95
Escolaridad				
Primaria	Referencia		Referencia	
Secundaria	2,40(1,35- 4,25)	0,01	1,80(1,01- 3,57)	0,05
Superior	0,00 (0,00-0,00)	0,99	0,00 (0,00-0,00)	0,99
Área de residencia				
Urbana	Referencia		Referencia	
Rural	1,30 (0,51-3,34)	0,57	1,74 (0,61-3,34)	0,29
Condición				
Ambulatorio	Referencia		Referencia	
Hospitalizado	2,68 (1,50-4,77)	0,00	2,19(1,12-4,27)	0,02

Tabla 4. Asociación entre la depresión y factores de riesgo para su aparición.

civil se pudo determinar que el mayor porcentaje de depresión pertenecía a los sujetos divorciados y viudos, con el 72,7% y el 72,1% respectivamente. En el estudio de Sigüenza el reporte fue el siguiente: el mayor porcentaje de depresión se encontró en los solteros con el 27%, seguido de los viudos con el 23,1%. En la investigación de Espinoza y Vacacela, predominó en los sujetos viudos con el 10%, seguido de los solteros con el 4%. En México, los hombres solteros presentaron 1.203 veces más de probabilidades de desarrollar depresión que los casados, en cambio para las mujeres divorciadas incrementa el riesgo a 1.003 veces. Según el estudio de Segura Cardona y Cols.⁸, un mayor riesgo de presentar depresión, fue descrito en viudos con el 36,4%, seguido de los casados con el 30,8%. El nivel de escolaridad, es otra variable que se ha analizado en diversos estudios, concluyendo que existe una relación inversamente proporcional, en la cual, a mayor nivel de instrucción, menor nivel de depresión.

Se ha investigado la relación de la depresión con las enfermedades crónicas, hallando que, en Uruguay se encontró una prevalencia de depresión del 25%, en población adulta mayor con Insuficiencia cardíaca, prevalencia que alcanza el 50% a medida que avanza la enfermedad. En esta investigación de los pacientes que tenían diagnóstico de enfermedad coronaria, el 65,5% tuvieron depresión.

Otra enfermedad que ha sido estudiada ampliamente es el Parkinson, estimándose que alrededor del 25% y 50% de pacientes con esta patología han presentado sintomatología depresiva, misma que contribuye con su deterioro funcional. La relación existente entre el Parkinson y la depresión, de acuerdo a una revisión sistemática de 51 artículos publicados desde el año 2000 hasta el 2014, en las bases de datos Science Direct, Ebsco y PsycNet, revela la existencia de diversas hipó-

tesis. Con estos datos y los obtenidos en este estudio, el cual indica que el 77,3% de sujetos con Enfermedad de Parkinson tuvieron depresión, representando el mayor porcentaje entre todas las patologías mencionadas, se demuestra claramente la relación existente como factor de riesgo para el desarrollo de depresión.

Mediante el presente estudio se pudo establecer que, a mayor nivel de riesgo social, mayores probabilidades de desarrollar depresión. Según el estudio de Sigüenza, en el cual se tomó en cuenta la situación familiar, se encontró que el 53,0% de las personas que vivían con su familia, no presentaron depresión.

En la vejez, suele existir un incremento de las necesidades y una disminución de los recursos disponibles, registros oficiales dejan ver que alrededor del 26,2% de adultos mayores en el mundo tienen un ingreso económico menor al requerido de acuerdo a sus necesidades básicas, se considera que su principal fuente de ingreso está dada por el apoyo familiar representando el 59,3% para las mujeres y el 48,4% para los hombres, debido a esta condición, se considera a los adultos mayores como una población vulnerable, con dependencia económica.

En cuanto a las relaciones sociales, se pudo determinar por el presente estudio que el 25,1% de sujetos que mantenían relaciones sociales fuera del domicilio no presentaron depresión, en tanto que el, 15,6% en la misma condición presentaron depresión. Análogos resultados se obtuvieron en el estudio de Segura Cardona y Cols., realizado en Colombia, donde el 68,6% de sujetos que no realizaban ningún tipo de actividad social, presentaron depresión, mientras que para aquellos que realizaban algún tipo de actividad y pertenecían a grupos sociales, el porcentaje de riesgo de desarrollar depresión osciló, entre el 0,1% al 11,5%.

Conclusiones

Existe una alta prevalencia de depresión en población de adultos mayores, con factores predisponentes, que pueden ser modificables, si se realiza la atención del adulto mayor por parte de un equipo multidisciplinario, si se toman medidas de prevención, antes del desarrollo de la misma, con un soporte emocional.

Agradecimientos

Agradecemos a todos los sujetos del Hospital de Atención Integral del Adulto Mayor que gentilmente participaron en este estudio. También agradecemos al personal de esta institución que facilitaron la recolección de la información.

Referencias bibliográficas

1. Crespo J. Prevalencia de depresión en adultos mayores de los asilos de los cantones Azogues, Cañar, Tambo y Déleg de la provincia del Cañar, en el año 2011 [Internet]. Cuenca – Ecuador. 2011 [citado 13 de Mayo de 2018]. Recuperado a partir de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/3497/1/MED68.pdf>
2. Depresión [Internet]. OMS – Organización Mundial de la Salud. 2018 [citado 07 de Marzo de 2018]. Recuperado a partir de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
3. Dirección Población Adulta Mayor [Internet]. Ministerio de Inclusión Económica y Social. 2013 [citado 07 de Marzo de 2018]. Recuperado a partir de: <https://www.inclusion.gob.ec/direccion-poblacion-adulta-mayor/>
4. Freire W, Waters W. Condiciones de Salud en los Adultos Mayores en el Ecuador: Desafíos Presentes y Futuros [Internet]. 2012 [citado 15 de Mayo de 2018]. Recuperado a partir de: http://www.alapop.org/Congreso2012/DOCSFINAIS_PDF/ALAP_2012_FINAL212.pdf
5. Ecuador, entre los países con más casos de depresión en Latinoamérica [Internet]. Redacción médica. 2017 [citado 07 de Marzo de 2018]. Recuperado a partir de: <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-entre-los-paises-con-mas-casos-de-depresi-n-en-latinoam-rica-89705>
6. Sigüenza R. Prevalencia de depresión y factores asociados en los adultos mayores del instituto de promoción para el envejecimiento activo del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Cuenca 2014 [Internet]. Cuenca – Ecuador. 2014 [citado 15 de Junio de 2019]. Recuperado a partir de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21203/1/TESIS66.pdf>
7. Espinoza C, Vacacela M. Prevalencia de depresión en el adulto mayor que asiste al Centro Municipal Gerontológico [Internet]. Guayaquil – Ecuador. 2014 [citado 18 de Junio de 2019]. Recuperado a partir de: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/39-71-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/39-71-1-SM%20(1).pdf)
8. Segura A, Cardona D, Segura A, Garzón M. Riesgo de depresión y factores asociados en adultos mayores [Internet]. Antioquia, Colombia. Revista Colombiana de Salud Pública. 17 (2): 184-194. 2012 [citado 18 de Junio de 2019]. Recuperado a partir de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v17n2/v17n2a03.pdf>

Received: 10 mayo 2020

Accepted: 15 junio 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Análisis de la Supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca en la Sierra Norte de Ecuador entre los años 2015 y 2020

Survival analysis of patients with heart failure in the Ecuadorian Sierra Norte between 2015 and 2020

Alvaro Francisco Gudiño Gomezjurado^{1*} Marco Esteban Gudiño Gomezjurado²

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.12

Resumen: La insuficiencia cardíaca constituye una de las causas más importantes de morbilidad a nivel mundial. En países en vías de desarrollo existe escasa evidencia respecto al pronóstico de esta enfermedad. Por este motivo el presente estudio tiene como objetivo establecer las causas más importantes de insuficiencia cardíaca y determinar la supervivencia en función de su etiología en pacientes diagnosticados con insuficiencia cardíaca en un Hospital General de segundo nivel ecuatoriano. Se efectuó un estudio mono céntrico, retrospectivo, de prevalencia, en 284 pacientes ambulatorios, con diagnóstico de insuficiencia cardíaca, durante los años 2015-2020. Las diferencias entre los subgrupos se analizaron estadísticamente mediante pruebas de ANOVA y se realizó el análisis de supervivencia por el método actuarial y regresión de Cox. La principal causa de insuficiencia cardíaca fue la hipertensiva (55,5%), seguida de la etiología isquémica (20,8%). El análisis de supervivencia evidenció que la sobrevida global a 5 años fue del 17%, con tiempo promedio de vida de 3,46 años. La principal causa de insuficiencia cardíaca entre los pacientes fue la hipertensiva y la supervivencia global a 5 años es inferior a la reportada en otros estudios.

Palabras clave: hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, sobrevida.

Abstract: Heart failure is one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide. In developing countries there is little evidence regarding the prognosis of this disease. For this reason, the present study aims to establish the most important causes of heart failure and determine survival based on its etiology in patients diagnosed with heart failure in a second-level Ecuadorian General Hospital. A retrospective, single-center, prevalence study was conducted in 284 outpatients, diagnosed with heart failure, during the years 2015-2020. The differences between the subgroups were statistically analyzed using ANOVA tests. Survival analysis was performed using the actuarial method and Cox regression. The main cause of heart failure was hypertensive (55.5%), followed by ischemic etiology (20.8%). Survival analysis showed that overall 5-year survival was 17%, with an average life time of 3.46 years. The main cause of heart failure among patients was hypertensive and the 5-year overall survival is lower than that reported in other studies.

Key words: arterial hypertension, heart failure, survival.

Introducción

La insuficiencia cardíaca constituye una de las causas más importantes de morbilidad a nivel mundial (1,2). Se calcula que esta enfermedad afecta entre el 2% y el 5% de la población en general, lo que equivaldría a 37,7 millones de personas¹⁻³.

En los Estados Unidos de América una de cada ocho defunciones es atribuidas de manera directa o indirecta al diagnóstico de insuficiencia cardíaca. Mientras que en la Unión Europea se estima que hasta el 40% de los decesos reportados se deben a esta patología^{2,4}.

Actualmente, esta enfermedad es una de las más letales al compararse con algunos de los tipos de cáncer más comunes lo que hace prever que su prevalencia aumente en un 46% hasta el año 2030^{3,4}.

En lo que respecta a costos, se calcula que la insuficiencia cardíaca, a nivel mundial, representa un gasto anual de 108 billones de dólares, lo que constituye el 60% del presupuesto en salud destinado a los cuidados directos o indirectos de los pacientes con esta enfermedad^{3,5}.

En Ecuador existe poca evidencia sobre la epidemiología de la insuficiencia cardíaca. De ahí que este estudio pretende determinar: (i) las causas más importantes de insuficiencia cardíaca y (ii) la supervivencia global y en función de la etio-

logía de los pacientes en control ambulatorio con diagnóstico previo de esta enfermedad.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio mono céntrico, transversal, retrospectivo en el Hospital General San Vicente de Paúl de la ciudad de Ibarra, Ecuador. Para esto se analizaron las historias clínicas de los pacientes diagnosticados con insuficiencia cardíaca entre enero de 2015 y enero de 2020.

Población de estudio

La identificación de los casos se realizó a través de las historias clínicas definidas según la Clasificación Internacional de Enfermedad CIE-10 con los códigos I-50, I-51, I-52, I-23, I-42 que corresponden a: (i) insuficiencia cardíaca, (ii) complicaciones y descripciones mal definidas de enfermedad cardíaca, (iii) otros trastornos cardíacos en enfermedades clasificadas en otra parte, (iv) ciertas complicaciones actuales seguidas de un infarto agudo de miocardio y (v) cardiomiopatía, respecti-

¹ Departamento de Medicina Interna, Hospital San Vicente de Paúl, Ibarra, Ecuador.

² Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería, Hacienda San José s/n, Urcuquí, Ecuador.

vamente.

En total se identificaron 300 historias clínicas de las cuales se incluyeron 284. No formaron parte de este estudio los pacientes: (i) menores de 18 años de edad, (ii) con diagnóstico de insuficiencia cardíaca secundaria a cardiopatía congénita y (iii) con registros de información incompleta.

El estudio cumplió con la aprobación del Departamento de Docencia del Hospital San Vicente de Paúl en concordancia con los requerimientos bioéticos estipulados en la declaración de Helsinki.

Parámetros clínicos, laboratoriales y ecocardiográficos

A partir de los valores de: (i) presión arterial sistólica, (ii) presión arterial diastólica, (iii) presión arterial media, (iv) presión de pulso, (v) frecuencia cardíaca y de los datos de laboratorio se obtuvo el promedio de cada una de estas mediciones que se determinaron durante los controles ambulatorios.

La clase funcional se la sistematizó de acuerdo a la clasificación de la *New York Heart Association* (NYHA). El valor del filtrado glomerular se calculó mediante la fórmula propuesta por la *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* CKD-EPI, y el de la fracción de eyección se determinó a través del método de Simpson permitiendo clasificar los grupos en función de los criterios de la Sociedad Europea de Cardiología.

Análisis estadístico

El análisis de las variables cuantitativas se realizó mediante medidas de tendencia central y de dispersión. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes. La comparación de los diferentes subgrupos se realizó mediante ANOVA de un factor y el análisis *post hoc* se efectuó a través las pruebas de Scheffe o de Games-Howell según corresponda.

El análisis de supervivencia se elaboró por el método actuarial seguido de la regresión de Cox. Los valores $p < 0,05$ fueron considerados como significativos con intervalos de confianza a un nivel de certeza del 95%. El procesamiento de los datos se efectuó con el paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Corporation).

Resultados

Características basales de los pacientes

Se analizaron 284 historias clínicas de pacientes procedentes de consulta externa con diagnóstico de insuficiencia cardíaca. El promedio de edad de los sujetos fue de 75,2 $\pm$ 13 años. Del total de los pacientes, el 49,3% fueron del sexo femenino (Tabla 1). La autodefinición étnica mayoritaria fue mestiza (73,9%) y la mayoría de pacientes indicaron residir en la provincia de Imbabura (70,4%) (Tabla 1).

Al momento del diagnóstico, la mayor parte de los sujetos se encontró en las clases funcionales II (36%) y III (36,7%) según la clasificación de la NYHA, siendo la etiología más común la hipertensiva (55,5%). El tratamiento de estos pacientes mayoritariamente fue con base a: (i) los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina / antagonistas del receptor de la angiotensina tipo 2, (ii) diuréticos de asa, (iii) betabloqueantes y (iv) antagonistas de la aldosterona (Tabla 1).

El 49,5% de los pacientes fue catalogado con insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida con promedio de filtrado glomerular correspondiente al estadio IIIA de la clasificación *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO).

Otros hallazgos de importancia fueron la presencia de hiponatremia leve, valores elevados de péptido cerebral natriu-

rético (proBNP) y la presencia de hipocolesterolemia. (Tabla 1)

Relación entre la etiología y las características basales de los pacientes con insuficiencia cardíaca

El análisis de la etiología de la insuficiencia cardíaca en función de los subgrupos y en relación de las variables obtenidas de las historias clínicas de los pacientes observó que: (i) la edad, (ii) la presión arterial sistólica, (iii) la presión arterial diastólica, (iv) la presión arterial media, (v) la presión de pulso, (vi) los niveles de colesterol (LDL y HDL) y (vii) los triglicéridos mostraron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 2).

El análisis *post hoc* demostró que la presión arterial sistólica, la presión arterial media y la presión de pulso presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en función de las etiologías hipertensiva y desconocida de la insuficiencia cardíaca (Tabla S1). Además, los niveles de triglicéridos tuvieron diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los subgrupos en función de la causa isquémica respecto a la causa desconocida. Al igual que el colesterol LDL fue significativamente diferente ($p < 0,05$) en relación a la causa isquémica frente a la etiología alcohólica (Tabla S1).

El diagnóstico de insuficiencia cardíaca disminuye la supervivencia de los pacientes

El análisis de supervivencia global de los pacientes con insuficiencia cardíaca entre los años 2015 y 2020 mediante el método actuarial fue del 17% a los 5 años a partir del diagnóstico (Figura 1).

Según la etiología de la enfermedad y el tiempo de sobrevivencia encontramos que hubo diferencias entre ellas. Así, la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca debida a hipertensión arterial fue de 3,49 años (IC95%; 3,38-4,51) mientras que para la asociada con etiología isquémica fue, de 4,19 años (IC95%; 2,73-5,64). Los pacientes con insuficiencia cardíaca de etiología valvular tuvieron 4,35 años (IC95%; 2,69-6,01) de sobrevivencia y los de origen alcohólico 4,80 años (IC95%; 3,89-5,81). Los pacientes con insuficiencia cardíaca de causa desconocida y con enfermedad debida a otros motivos sobrevivieron 2,87 años (IC95%; 2,25-3,49) y 3,42 años (IC95%; 2,01-4,83), respectivamente (Figura 2).

El análisis de regresión de Cox evidenció que el menor número de hospitalizaciones (HR: 0,5; IC95%; 0,45-0,703; $p = 0,000$) y la etiología hipertensiva (HR: 0,56; IC95%; 0,34-0,910; $p = 0,019$) tuvieron efecto protector. Por otro lado, el valor del desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo (TAPSE) fue < 16 mm (HR: 1,01; IC95%; 1,005-1,026; $p = 0,004$) lo que se asoció con mayor mortalidad. ($X^2 = 59,2$; $p = 0,000$).

Discusión

La insuficiencia cardíaca es una dolencia que afecta de manera especial a personas mayores de 65 años. En nuestro estudio la media de edad de los pacientes fue de entre 70 y 80 años. Este resultado es semejante a los publicados en estudios anteriores^{1,5-7}. Sin embargo, en cuanto al sexo de los pacientes encontramos un predominio de hombres con insuficiencia cardíaca a diferencia de lo publicado anteriormente^{1,7,8} (Tabla 1).

La etnia es un factor determinante para la insuficiencia cardíaca. Se sabe que existe mayor predisposición y peor pronóstico de vida en personas de etnia negra que en blancos e hispanos³. En este estudio, el mayor porcentaje de personas fueron mestizos, seguidos de los indígenas y de los negros (Tabla 1).

Al analizar la clase funcional, el 72,7% de los pacientes co-

EDAD E ÍNDICE DE MASA CORPORAL	
Variable	Resultado
Edad (años)	75,2 +/-13
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	26,25 +/-7,1
SEXO	
Variable	Resultado (%)
Masculino	50,4 (n=143)
Femenino	49,3 (n=140)
PROCEDENCIA	
Variable	Resultado (%)
Imbabura	70,4 (n=200)
Carchi	18,4 (n=52)
Esmeraldas	1,8 (n=5)
Pichincha	2,5 (n=7)
Otros	6,7 (n=19)
ETNIA	
Variable	Resultado (%)
Blanca	1,8 (n=5)
Mestiza	73,9 (n=209)
Negra	9,9 (n=28)
Indígena	14,5 (n=41)
CLASE FUNCIONAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN NYHA	
Variable	Resultado (%)
Clase 1	2,8 (n=8)
Clase 2	36 (n=102)
Clase 3	36,7 (n=104)
Clase 4	24,4 (n=69)
CONSUMO DE ALCOHOL	
Variable	Resultado (%)
Sí	14,8 (n=42)
No	85,2 (n=241)
CONSUMO DE TABACO	
Variable	Resultado (%)
Sí	22,6 (n=64)
No	77,4 (n=219)
ANTECEDENTE DE ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA	
Variable	Resultado (%)
Sí	22,3 (n=63)
No	77,7 (n=220)
ANTECEDENTE DE ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR ISQUÉMICA	
Variable	Resultado (%)
Sí	10,6 (n=30)
No	89,4 (n=253)
ANTECEDENTE DE DIABETES	
Variable	Resultado (%)
Sí	16,3 (n=46)
No	83,7 (n=237)
ETIOLOGÍA	
Variable	Resultado (%)
Hipertensiva	55,5 (n=157)
Isquémica	20,8 (n=59)
Valvular	3,5 (n=10)
Alcohólica	5,7 (n=16)
Otras	2,5 (n=7)
Desconocida	12 (n=34)
TRATAMIENTO	
Variable	Resultado (%)
IECA	45,2 (n=128)
ARA2	23,2 (n=65)
Diurético de asa	67,1 (n=190)
Betabloqueante	51,2 (n=145)
Digoxina	15,2 (n=43)
Antagonista de aldosterona	39,2 (n=111)
VARIABLES HEMODINÁMICAS Y ECOCARDIOGRÁFICAS	
Variable	Resultado
Presión arterial sistólica (mmHg)	127,9 +/-24
Presión arterial diastólica (mmHg)	72,4 +/-12
Presión arterial media (mmHg)	90 +/-15
Presión de pulso (mmHg)	56 +/-19
Frecuencia cardíaca (latidos por minuto)	81 +/-15
Fracción de eyección reducida del ventrículo izquierdo (%)	49,5 (95)
Fracción de eyección intermedia del ventrículo izquierdo (%)	29,7(57)
Fracción de eyección conservada del ventrículo izquierdo (%)	20,8 (40)
TAPSE (mm)	17,27+/-10,6
PARÁMETROS LABORATORIALES	
Variable	Resultado
Hemoglobina (g/dL)	13,5 +/-3
Hematocrito (%)	42,03 +/-10
Creatinina (mg/dL)	1,51 +/-1,4
Filtrado glomerular (ml/min)	53,2 +/-27
Sodio (mEq/L)	132 +/-31
Potasio (mEq/L)	4,1 +/-1
Pro-BNP (pg/ml)	4983 +/-2672
Ácido úrico (mg/dL)	4,41 +/-3,8
TSH (U/L)	4,01 +/-10
T4 (ng/dL)	0,77 +/-0,7
Colesterol total (mg/dL)	126 +/-140
Colesterol LDL (mg/dL)	68 +/-57
Colesterol HDL (mg/dL)	28 +/-23
Triglicéridos (mg/dL)	94 +/-85

Tabla 1. Características basales de los pacientes con insuficiencia cardíaca atendidos en el Hospital San Vicente de Paúl de la Ciudad de Ibarra entre los años 2015 y 2020.

respondieron a los grupos II y III. Este dato es diferente a los reportados previamente en los que la mayoría de los pacientes presentaron estadios más avanzados^{8,9} (Tabla 1). Esto podría explicarse por el hecho de que nuestro trabajo fue realizado con pacientes de un hospital general en el que se brinda atención a casos de leve y mediana complejidad, a diferencia de lo que sucede en hospitales de especialidad (Tabla 1).

Por otro lado, al analizar la fracción de eyección, el 49,5% de los pacientes presentó valores de fracción de eyección redu-

cida (Tabla 1). Este hecho es semejante al encontrado en publicaciones anteriores¹⁰.

En lo referente al tratamiento, el 51,2% de los pacientes fueron dosificados con beta bloqueadores (Tabla 1). En países desarrollados la prescripción de esta familia de medicamentos supera el 70% lo que se asocia con la disminución de la mortalidad entre los pacientes con insuficiencia cardíaca^{8-9,11}.

Al realizar el análisis de supervivencia en la muestra estudiada se evidenció que la sobrevida global fue del 17% a los 5

Variable	Etiología						Valor p
	Hipertensiva (n=157)	Isquémica (n=59)	Valvular (n=10)	Alcohólica (n=16)	Desconocida (n=34)	Otra (n=8)	
Edad (años)	77,5+/-12	74,2+/-10	67,5+/-13	67,9+/-14	76,2+/-13	55,7+/-23	0
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	26,4+/-7	27,2+/-6	25,5+/-6	23,9+/-7	24,7+/-6	27,2+/-4	0,447
Presión arterial sistólica (mmHg)	133,4+/-23	128,1+/-26	112,9+/-25	119,6+/-18	111,8+/-13	121,2+/-22	0
Presión arterial diastólica (mmHg)	74,3+/-13	73,2+/-12	59,5+/-12	70+/-10	67,5+/-10	71,5+/-5	0,002
Presión arterial media (mmHg)	93,8+/-15	90,1+/-18	76,3+/-14	86,1+/-10	81,6+/-10	88,2+/-9	0
Presión de pulso (mmHg)	59,6+/-19	55,7+/-18	55,1+/-22	48,9+/-17	45,9+/-13	49,7+/-20	0,002
Frecuencia cardíaca (latidos por minuto)	83,6+/-15	77,2+/-14	82,1+/-20	79,7+/-13	82,3+/-15	83,4+/-11	0,174
Hemoglobina (g/dl)	13,6+/-3	13,4+/-3	12,2+/-4	13,6+/-2	13,7+/-3	14,4+/-3	0,784
Hematocrito (%)	42,4+/-10	41,1+/-10	37,4+/-14	42+/-7	42,5+/-10	44,6+/-8	0,664
Creatinina (mg/dl)	1,60+/-1,4	1,65+/-1,7	1,08+/-0,6	1,23+/-0,4	1,2+/-1,1	0,75+/-0,3	0,289
Filtrado glomerular (ml/min)	50,7+/-25	51,9+/-29	52+/-34	66,4+/-27	57,7+/-29	69,8+/-42	0,135
Sodio (mEq/l)	134,1+/-29	132,1+/-31	124,9+/-44	121,7+/-47	131,7+/-33	141,5+/-4	0,639
Potasio (mEq/l)	4,2+/-1,1	4,2+/-1,1	4,1+/-1,5	3,7+/-1,2	4+/-1,2	4,3+/-0,3	0,618
ProBNP* (pg/ml)	6186,6+/-34118	4688,9+/-17255	3836,2+/-10969	597,2+/-1222	3105,5+/-6067	1262,7+/-1992	0,957
Ácido úrico (mg/dl)	4,54+/-3	4,09+/-3	4,60+/-4	4,75+/-3	3,89+/-4	5,75+/-3	0,82
TSH [†] (UI/l)	3,18+/-4	5,9+/-19	3,28+/-5	0,9+/-1	5,1+/-10	8,8+/-12	0,27
fT4 [‡] (ng/dl)	0,83+/-0,7	0,77+/-0,7	0,75+/-0,6	0,39+/-0,6	0,73+/-0,6	0,62+/-0,5	0,319
Colesterol total (mg/dl)	130,9+/-173	139,9+/-82	98,5+/-91	86,5+/-77	96,3+/-80	172,7+/-38	0,456
Colesterol LDL (mg/dl)	68,9+/-59	81,1+/-56	65,9+/-60	38,8+/-43	52,7+/-54	105,5+/-11	0,026
Colesterol HDL (mg/dl)	28,8+/-23	31,1+/-22	22,1+/-20	16,8+/-16	24,6+/-26	52,2+/-24	0,019
Triglicéridos (mg/dl)	90,3+/-80	123,3+/-100	85,2+/-125	76,4+/-74	64,5+/-58	154,5+/-77	0,008
Promedio de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (%)	27+/-22	32+/-14	35+/-17	27+/-25	19+/-23	33+/-20	0,114
TAPSE [§] (mm)	17,91+/-14	17,72+/-3	15,54+/-3	13,8+/-4	15,9+/-4	14,6+/-2	0,923

Tabla 2. Diferencias entre las variables de los pacientes con insuficiencia cardíaca según la etiología de la enfermedad.

Variable	Comparación de subgrupos por etiología		Diferencia de medias	Error estándar	Valor p	Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Edad	Hipertensiva	Otra	21,86533	4,8711	0,00015	5,5396	38,1911
	Isquémica	Otra	18,50605	5,0408	0,0213	1,6115	35,4006
	Desconocida	Otra	20,55042	5,2337	0,01	3,0094	38,0914
Presión sistólica	Hipertensiva	Desconocida	21,53803	4,3706	0,0003	6,8896	36,18964
Presión diastólica	Hipertensiva	Valvular	14,81847	4,1212	0,0263	1,006	28,6309
Presión arterial media	Hipertensiva	Desconocida	12,2414	2,8806	0,0035	2,587	21,8958
Colesterol LDL	Otra	Hipertensiva	36,59691	6,4568	0,0001	16,7702	56,4236
	Isquémica	Alcohólica	42,35699	13,1869	0,0336	2,2573	82,4566
	Otra	Alcohólica	66,75893	11,7925	0,0002	29,5028	104,015
	Otra	Desconocida	52,77731	10,3427	0,0001	21,7812	83,7734
Triglicéridos	Isquémica	Desconocida	58,8516	16,4296	0,0071	11,0195	106,6837
Presión de pulso	Hipertensiva	Desconocida	13,75703	3,523	0,0107	1,9496	25,5645

Tabla S1. Análisis *pos hoc* de la diferencia entre variables de los pacientes con insuficiencia cardíaca según la etiología de la enfermedad.

años a partir del momento del diagnóstico (Figura 1). Este dato contrasta con estudios realizados en países desarrollados en los cuales este indicador oscila entre el 30% y el 60% durante el mismo período de seguimiento^{4,5,10,12-14}.

Al comparar nuestro resultado de supervivencia global con años pasados encontramos que este valor es incluso menor al reportado en la década de los años 50's donde la mortalidad a los 5 años a partir del momento del diagnóstico con insuficiencia cardíaca de manera independiente de la edad, del sexo y de la raza de los pacientes fue de aproximadamente igual al 70%,

para los años 90 se redujo al 59% y a inicios de este siglo se ubicó en el 41%^{9,10,13,15,16}.

Varios estudios han descrito que diferentes factores están asociados con mayores tasas de mortalidad. Entre estos destacan: (i) la edad, (ii) el antecedente de cardiopatía isquémica, (iii) el padecer diabetes mellitus tipo 2, (iv) la presencia de proteinuria y/o síndrome cardiorrenal, (v) los niveles de nitrógeno ureico en sangre, (vi) la prescripción de antagonistas de aldosterona y (vii) la frecuencia cardíaca^{1,17,18}. Frente a estos datos, el análisis de Cox en nuestra muestra demostró que la etiología hipertensi-

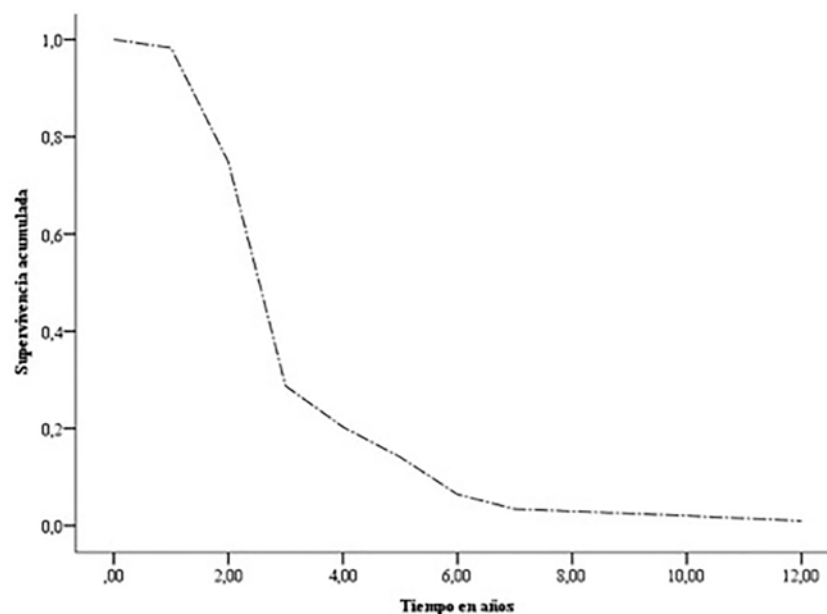
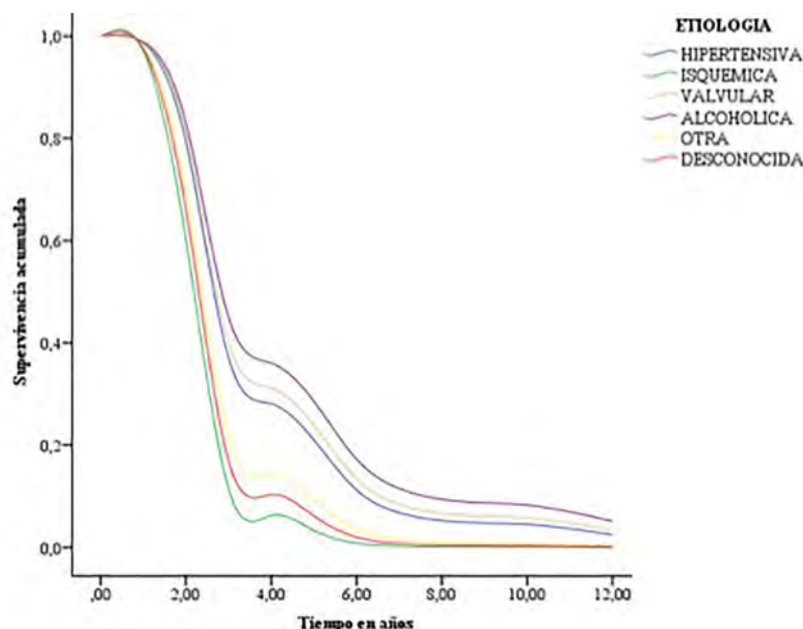


Figura 1. Curva de supervivencia acumulada de los pacientes diagnosticados con insuficiencia cardíaca entre los años 2015 y 2020.

Figura 2. Supervivencia ajustada de los pacientes con insuficiencia cardíaca en función de la etiología de la enfermedad.



va y el menor número de hospitalizaciones son factores de protección lo que se traduce en menor mortalidad. Al contrario de lo que sucede con la disminución de valores del TAPSE.

Al realizar el análisis por subgrupos se encontró que el 20,8% de los casos de insuficiencia cardíaca fueron por enfermedad coronaria isquémica. Este hallazgo contrasta con estudios realizados en países del primer mundo donde la principal etiología fue la enfermedad coronaria isquémica, la cual es responsable de hasta el 30% de los casos, sobre todo en hombres, con fracción de eyección preservada^{3,4}.

En estudios semejantes, en países latinoamericanos, se han encontrado resultados heterogéneos por ejemplo, en trabajos publicados con muestras de Argentina y Brasil, entre el 30% y el 40% de los diagnósticos de insuficiencia cardíaca fueron secundarios a enfermedad coronaria isquémica, mientras que en poblaciones de estrato económico más bajo como en el África Subsahariana la prevalencia de la enfermedad coronaria fue del 7,2%^{17,19}. Esta variación en los datos podría deberse a la diferencia de acceso a métodos diagnósticos más complejos como la coronariografía.

En relación a la causa hipertensiva, en nuestra muestra re-

presentó la principal etiología de insuficiencia cardíaca con el 55,5% de los casos estudiados (Tabla 1). Lo que difiere de poblaciones de países desarrollados donde esta causa oscila entre el 7% y el 13% de los casos de insuficiencia cardíaca^{3,19}. Fisiopatológicamente, esto se explica porque la exposición prolongada de las células miocárdicas a niveles tensionales crónicamente elevados, resulta en la hipertrofia de ventrículo izquierdo y posterior disfunción, incluso en ausencia de enfermedad coronaria significativa o de infarto previo³.

El riesgo de presentar insuficiencia cardíaca por esta causa es el doble en pacientes masculinos y con valores tensionales promedio superiores a 160/90 mm Hg, lo que en términos de mortalidad se traduce en hasta el 76% de decesos a 5 años de seguimiento en ausencia de un tratamiento adecuado para la hipertensión arterial^{3,4}. En cuanto a estudios realizados en poblaciones de países en vías de desarrollo, la proporción de casos de insuficiencia cardíaca asociados a enfermedad hipertensiva varió entre 20% y 84%^{17,19}, siendo similar a lo encontrado en este trabajo.

Por otro lado, es necesario considerar que la hipotensión persistente en pacientes con diagnóstico establecido de insufi-

ciencia cardíaca es responsable del incremento de la letalidad en hasta el 18% por la reducción de 10 mm Hg de la presión sistólica¹⁴.

La etiología valvular representa menos del 5% de la totalidad de las causas de insuficiencia cardíaca. No obstante, en personas mayores de 75 años la enfermedad valvular degenerativa puede justificar hasta el 11,7% de insuficiencia cardíaca³. Además, la etiología valvular reumática en países desarrollados tiene una incidencia menor a 1 caso por 100000 habitantes. Sin embargo, en países del África Subsahariana la prevalencia de esta enfermedad puede ser de hasta el 13,8% con una incidencia de hasta 100 casos por 100000 habitantes³.

En este estudio la etiología valvular representó el 3,5% de los casos de insuficiencia cardíaca, que es menor al reportado en países de renta media donde la prevalencia oscila entre el 6% y el 22%¹⁹.

En cuanto a otras causas de la insuficiencia cardíaca se encuentran la: (i) miocardiopatía alcohólica, (ii) miocardiopatía periparto, y (iii) miocardiopatía dilatada idiopática que en conjunto representan entre el 3% y el 30% de las causas de esta enfermedad¹⁹. En nuestro caso, estas etiologías constituyeron entre el 3% y el 5% de los casos estudiados. Sin embargo, no hay que descartar que estos valores podrían estar asociados a un alto porcentaje de subdiagnóstico.

Finalmente, y a diferencia de otros trabajos, nuestro estudio incluyó la categoría de insuficiencia cardíaca de causa desconocida, la cual representó el 12% del total de diagnósticos y que se asoció a peor pronóstico vital.

Conclusiones y recomendaciones

La principal causa de insuficiencia cardíaca en la población estudiada fue la secundaria a la hipertensión arterial. El porcentaje de supervivencia a 5 años a partir del diagnóstico de insuficiencia cardíaca en los pacientes incluidos en este trabajo está muy por debajo de lo reportado en estudios realizados en países de renta media y alta.

La ausencia del diagnóstico nosológico influye directamente sobre el pronóstico vital de los pacientes. La carencia de una guía de práctica clínica de esta enfermedad influiría directamente sobre la alta mortalidad evidenciada en este estudio.

Limitaciones

Al ser un estudio monocéntrico y realizado en un hospital general los resultados podrían no representar de manera adecuada los casos más complejos por lo que su diagnóstico puede estar infravalorado. Por otro lado, las carencias diagnósticas hacen que la definición etiológica de la insuficiencia cardíaca sea limitada, especialmente en lo concerniente a las causas isquémica e idiopática.

Referencias bibliográficas

1. Sarriá-Santamera A, Prado-Galbarro FJ, Martín-Martínez MA, Carmona R, Gamiño Arroyo AE, Sánchez-Piedra C, et al. Supervivencia de pacientes con insuficiencia cardíaca en atención primaria. *Aten Primaria*. 2015;47(7):438-45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aprim.2014.03.017>
2. Laribi S, Aouba A, Nikolaou M, Lassus J, Cohen-Solal A, Plaisance P, et al. Trends in death attributed to heart failure over the past two decades in Europe. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(3):234-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ehf.1569>
3. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(6):368-78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>

4. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(1):30-41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2010.165>
5. Taylor CJ, Ordóñez-Mena JM, Roalke AK, Lay-Flurrie S, Jones NR, Marshall T, et al. Trends in survival after a diagnosis of heart failure in the United Kingdom 2000-2017: population based cohort study. *BMJ*. 2019;364:1-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.l223>
6. Jiménez-Navarro MF, Ramírez-Marrero MA, Anguita-Sánchez M, Castillo JC. Influence of gender on long-term prognosis of patients with chronic heart failure seen in heart failure clinics. *Clin Cardiol*. 2010;33(3):13-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/clc.20476>
7. Franco J, Formiga F, Chivite D, Manzano L, Carrera M, Arévalo-Lorido JC, et al. New onset heart failure - Clinical characteristics and short-term mortality. A RICA (Spanish registry of acute heart failure) study. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2015;26(5):357-62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.04.008>
8. Ocampo Chaparro JM, Badiel M, Casanova ME, Reyes-Ortiz CA, León Giraldo H, Castaño Cifuentes O. Características clínicas y supervivencia a 30 días de pacientes ancianos colombianos hospitalizados por insuficiencia cardíaca descompensada. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2015;50(3):153-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2014.11.013>
9. Maggioni A Pietro. Epidemiology of Heart Failure in Europe. *Heart Fail Clin* [Internet]. 2015;11(4):625-35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2015.07.015>
10. Cho JH, Choe WS, Cho HJ, Lee HY, Jang J, Lee SE, et al. Comparison of characteristics and 3-year outcomes in patients with acute heart failure with preserved, mid-range, and reduced ejection fraction. *Circ J*. 2019;83(2):347-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-18-0543>
11. Loh JC, Creaser J, Rourke DA, Livingston N, Harrison TK VE, Moriguchi J, Hamilton MA, Tseng C, Fonarow GC HT. Temporal Trends in Treatment and Outcomes for Advanced Heart Failure with Reduced Ejection Fraction from 1993-2010. *Circ Heart Fail*. 2013;6(3):411-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000178>
12. Eriksson B, Wändell P, Dahlström U, Näsman P, Lund LH, Edner M. Comorbidities, risk factors and outcomes in patients with heart failure and an ejection fraction of more than or equal to 40% in primary care- and hospital care-based outpatient clinics. *Scand J Prim Health Care* [Internet]. 2018;36(2):207-15. Available from: <https://doi.org/10.1080/02813432.2018.1459654>
13. Levy D, Kenchaiah S, Glarson M, Benjamin EJ, J. Kupka M, Ho KKL, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347(18):1397-402. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020265>
14. Jumean MF, Kiernan MS. Determinants of survival following hospitalization for acute heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2014;11(2):201-11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11897-014-0190-z>
15. Bytyçi I, Bajraktari G. Mortality in heart failure patients. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2015;15(1):63-8. Available from: <https://doi.org/10.5152/akd.2014.5731>
16. Rodriguez F, Wang Y, Johnson CE, Foody JM. National patterns of heart failure hospitalizations and mortality by sex and age. *J Card Fail*. 2013;19(8):542-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2013.05.016>
17. Agbor VN, Essouma M, Ntusi NAB, Nyaga UF, Bigna JJ, Noubiap JJ. Heart failure in sub-Saharan Africa: A contemporaneous systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* [Internet]. 2018;257:207-15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.12.048>
18. Quiroz R, Doros G, Shaw P, Liang CS, Gauthier DF, Sam F. Comparison of characteristics and outcomes of patients with heart failure preserved ejection fraction versus reduced left ventricular ejection fraction in an urban cohort. *Am J Cardiol* [Internet]. 2014;113(4):691-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.11.014>
19. Bocchi EA. Heart Failure in South America. *Curr Cardiol Rev*. 2013;9(2):147-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/1573403x11309020007>

Received: 10 mayo 2020

Accepted: 1 julio 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Inflammatory response of stem cell secreting conditioned media in SH-SY5Y cell line

Faizan Ahmad

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.13

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs) are reported to secrete anti-inflammatory cytokines and growth factors, which makes MSCs a promising candidate in the treatment of various neurodegenerative diseases. SH-SY5Y show extreme inflammatory response under LPS and an inadequate inflammatory response when treated with Wharton's jelly, conditioned media. This study mainly focuses on the inflammatory (pro and anti-inflammatory) response of SH-SY5Y by gene expression study. SH-SY5Y cell line used for cell culture and RT-qPCR was done with 5 different primers. In this article, lipopolysaccharides (LPS) show a significant result in pro-inflammatory and pro-apoptotic. In this article, we focus on the therapeutic approach of stem cells, which reduce inflammation by secreting stem cell factors to cure various neurodegenerative diseases.

Key words: Inflammation, MSCs, SH-SY5Y, Gene expression, quantitative PCR.

Introduction

SH-SY5Y is neuroblastoma human cell lines. SH-SY5Y secrete growth factors, cytokines, micro-RNAs, proteasomes, and exosomes, which play a vital role in inflammation¹. Inflammation includes two forms of signals, the signal that intimate and retain inflammation and signal that bar down the process. Inequality between the two signals from inflammation unhampered, which leads to cellular and tissue damage². In macrophages, inflammation has three significant roles, i.e., antigen presentation, phagocytosis, and immunomodulation, through the production of various cytokines and growth factors³. Macrophages have a choleric role in the initiation, maintenance, and resolution of inflammation^{4,11}. Macrophages get activated and get deactivated during the inflammatory process^{4,11}. Activation signals include cytokines, lipopolysaccharides, and extracellular matrix proteins^{2,3}. LPS increases inflammation in which there is speedy cell proliferation with fast cell death⁵. Activated macrophages get deactivated by anti-inflammatory cytokines and cytokines rival, which mostly produced by macrophages^{5,11}. Macrophages have both beneficial and detrimental outcomes in inflammation and are promising therapeutic interference for inflammation^{5,11}. Conditioned media from MSCs contain various cytokines; growth factors and micro RNAs play an essential role in attuning inflammatory process⁸. Cytokines are called inflammatory mediators^{2,5}. IL- β is pro-inflammatory mediators, and IL-10 and TGF- β are anti-inflammatory mediators². When there are neuroinflammation chemokines, regulate cell migration. Chemokines act as a neuro-modulators that increase inflammation and development^{4,10}.

When the expression of Bcl-2 is high, it protects neurons from neuronal death (*in vivo* and *in vitro*)¹³. Bcl2 is a protein that maintains cellular homeostasis by regulating apoptosis and has both anti-apoptotic and anti-necrotic effect^{15,16}. BAX is linked with Bcl-2, which is protein-encoding gene^{15,16}. Our study focuses on the inflammatory response of five different genes. BAX, IL-10 and TGF- β 1 has anti-inflammatory response which protects from neural cell death by reducing inflammation. We are moving towards therapeutics, so instead of stem cells, we focus on stem cell factors^{6,7,14}. Stem cell factors are considered as a promising therapeutic approach that helps in Parkinson's disease or Alzheimer's disease^{6,7}. In the

future, it is predicted that stem cell factors can activate death neurons and can be a novel therapeutic approach^{6,7,14}.

Methods

CELL CULTURE – DMEM media is used with 10% FBS, and 1% penicillin as an antibiotic which used for SHSY5Y cell culture, and the cells were incubated in T25 flask at 37°C with 5% CO₂.

EXTRACTION and RT-qPCR – RNA was isolated by using Isoplus reagent. cDNA was synthesized using the Primer Script III First-Strand cDNA Synthesis kit (TAKARA BIO). Real-time RT-PCR analysis was performed using the Quanti Tect SYBR Green PCR kit (QIAGEN). All the above methods were executed according to the manufacturer's instructions. Real-time analysis of like BAX, Bcl-2, IL-1 β , TGF- β 1, and IL-10 was done in duplicates on a CFX384 Real-time PCR system (BIO-RAD). CFX Manager software was used to analyze the results.

Results

IL-1 β is pro-inflammatory, IL-10, and TGF- β 1 are anti-inflammatory genes. When we see our result under three different concentrations i.e. LPS, Wharton's jelly conditioned media, and cord line conditioned media, we find that LPS under IL-1 β has a fold change of 1.4. IL-10 and TGF- β have a fold change of 0.4 and 0.05, respectively. Cord line conditioned media in IL-10 and TGF- β 1 has a fold change of 3.0 and 0.44, respectively. LPS is least in both IL-10 and TGF- β 1 with 0.25 and 0.005 fold change, respectively. Wharton's jelly in all the three genes IL-1 β , IL-10, and TGF- β 1, show moderate fold change with 0.8, 1.7, and 0.34, respectively. Figure 1

BAX is pro-apoptotic, and Bcl2 is anti-apoptotic. In our result in BAX and Bcl2, there is a fold change of 7.2 and 1.15 under LPS. BAX and Bcl2, when treated with Wharton's jelly conditioned media and cord line conditioned media, there is a fold change of 0.5, 1.5, 0.9 and 1.2, respectively.

¹ BSc Biotechnology, Himalayan University, Itanagar Arunachal Pradesh, India.

GENE	Tm value in CELCIUS	SEQUENCE (5'-3')
hGADPH-F	52.6	CACCACCATGGAGAAGGC
hGADPH-R	51.1	CAGGAGGCATTGCTGATGA
IL-1 β -F	48	TGAAGCTGATGGCCCTAA
IL-1 β -R	50.3	CTTGTCCATGGCCACAAC
IL-10-F	54.4	CCTGCCTAACATGCTTCGAGA
IL-10-R	53.2	GCTTGGCAACCCAGGTAAC
TGF- β 1-F	50.3	GAGACTTTTCCGTTGCCG
TGF- β 1-R	54.4	AGGAACAGACGTGTTAGTGC
BAX-F	53.2	TCATCCAGGATCGAGCAGG
BAX-R	53.2	GGCAATCATCCTCTGCAGC
Bcl2-F	55.9	GGTCATGTGTGTGGAGAGCG
Bcl2-R	53.8	CCGTACAGTTCACAAAGGC

Table 1. A list of primer sequences used for real-time RT-PCR analysis.

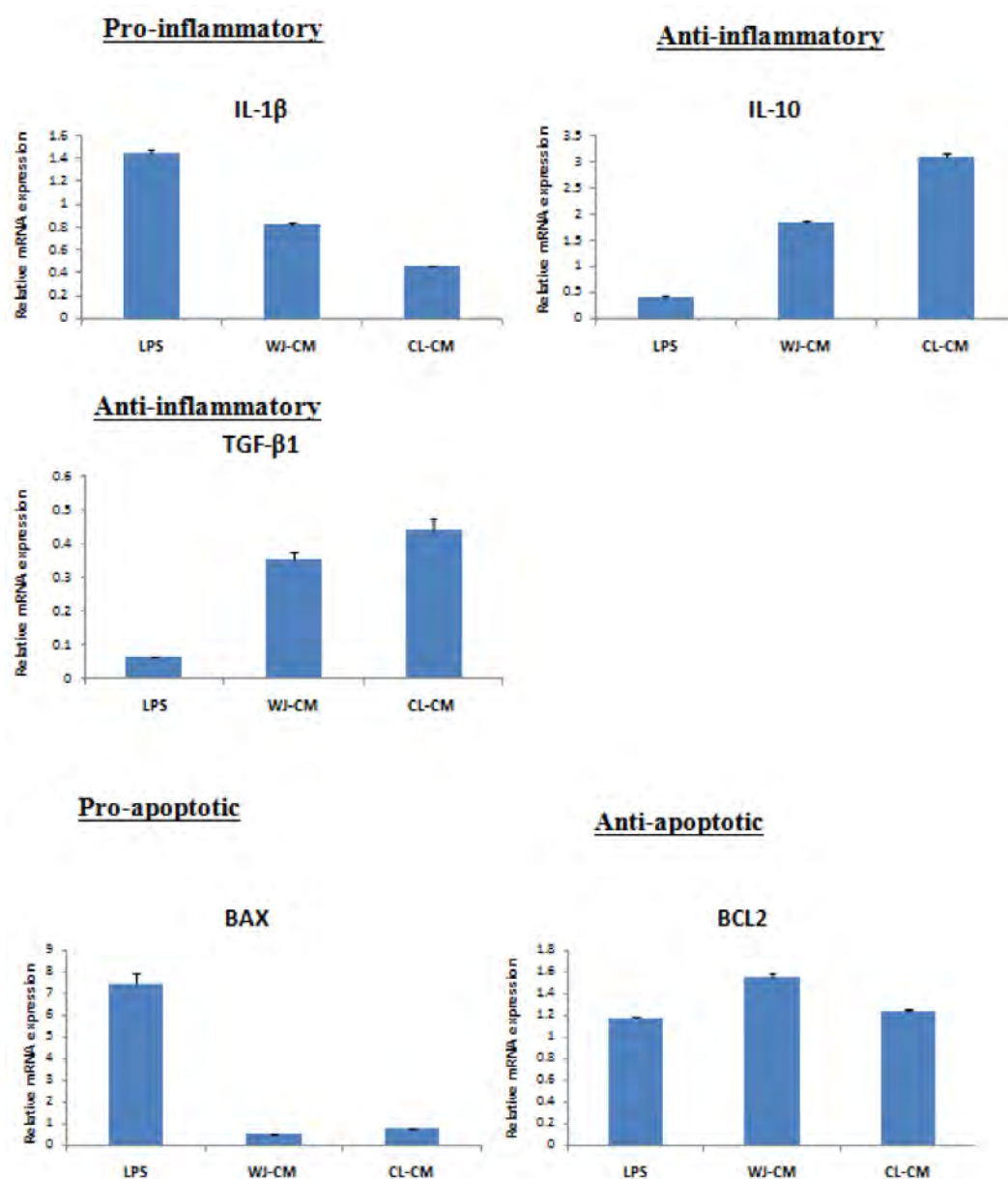


Figure 1. Pro and anti-inflammatory, pro and anti-apoptotic patterns, under three different concentrations i.e. LPS, Wharton's jelly conditioned media, and cord line conditioned media.

Discussion

Cheng Chen *et al.*, 2018 observed an anti-inflammatory effect under lipopolysaccharide¹². Cheng Chen *et al.*, 2018 explains that when SH-SY5Y is treated with SG-Tang, then SH-SY5Y inflammation is reduced under retinoic acid added conditioned media¹². When we compare our result, we observe that our results are entirely contradictory in which LPS show inflammation and CM reduces inflammation. Hong Na Yang *et al.*, 2018 result explains that NSC-CM improves the expression of Bcl-2 to inhibit cell apoptosis¹³. Our result also gives similar result in which Bcl2 under conditioned media inhibit apoptosis. Zhongyang Xu *et al.*. 2019 paper explains that miR-124 suppresses cell apoptosis by inhibiting Bax in H₂O₂-treated BV-2 cells⁹. When we observe our result in BAX treated with LPS and LPS is very high, so speedy cell proliferation and so fast neuronal cell death.

Conclusions

Our main aim of this research study is to check the inflammatory response. Due to inflammation, there is a death of neuronal cells, and cell proliferation occurs. In our research instead of stem cells, we are using stem cell factors which act as therapeutic agent produced by genes like IL-10, TGF- β 1, and Bcl2 which can protect the neurons from death like in case of Parkinson's disease, Alzheimer disease, etc. In the future, stem cell factors can become a promising therapeutic approach for various neurodegenerative diseases.

Abbreviation:

LPS- Lipopolysaccharide
WJ-CM- Wharton' Jelly Conditioned Media
CL-CM- Cord Line Conditioned Media

Acknowledgments

I would like to thanks Dr. Durai for technical support during this project.

Competing interests and Funding

The authors declare that there are no conflicts of interest, and the entire project was performed in CBCMT, VIT UNIVERSITY, VELLORE, INDIA.

Bibliographic references

1. AnaO.Pires, AndreiaNeves-Carvalho, NunoSousa and AntónioJ. Salgado. The Secretome of Bone Marrow and Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Differentiation and Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. *Stem Cells International* Volume 2014, Article ID 438352, 10 pages .DOI:10.1155/2014/438352
2. Liangyu Lin, Liming Du. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. *Cellular Immunology* 326(2018) 24-32.DOI:10.1016/j.cellimm.2017.07.010
3. Densi Drago , Chiara Cossetti , Nunzio Iraci , Edoardo Guade , Giovanna Musco ,Angela Bachi ,Stefano Pluchino .The stem cell secretome and its role in brain repair.*Biochimica* 95 (2013) 2271-2285. DOI:10.1016/j.biochi.2013.06.020
4. Sonali Rawat, Suchi Gupta, and Sujata Mohanty. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Immune System in Developing Therapeutic Interventions. DOI:http://dx.doi.org/10.5772/ intechopen.80772
5. Smita S lyer & Mauricio Rojas. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: a novel concept for future therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2008) 8(5):569-581. DOI:10.1517/14712590801997652
6. Adel Alhazzani, Prasanna Rajagopalan, Zaher Albarqi, Anantharam Devaraj, Mohamed Hessian Mohamed, Ahmed Al-Hakami, and Harish C. Chandramoorthy. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Co-culture Protects [Ca²⁺]_i Orchestrated Oxidant Mediated Damage In Differentiated Neurons In Vitro. *Cells* 2018,7, 250.DOI:10.3390/cells7120250
7. Jeanne Adiwinata Pawitan.Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 965849, 14 pages.DOI:10.1155/2014/965849
8. Catriona J Cunningham, Elena Redondo-Castro, and Stuart M Allan. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*2018, Vol. 38(8) 1276-1292. DOI: 10.1177/0271678X18776802
9. Zhongyang Xu, Kefeng Zhang, Qian Wang and Yanping Zheng. MicroRNA-124 improves functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 19: 2551-2560, 2019. DOI:10.3892/mmr.2019.9904
10. Qiang Li, Sei-Myoung Han, Woo-Jin Song, Sang-Chul Park, Min-Ok Ryu, and Hwa-Young Youn. Anti-inflammatory Effects of Oct4/Sox2-overexpressing Human Adipose tissue-derived Mesenchymal Stem Cells. *In vivo*31: 349-356 (2017). DOI:10.21873/in vivo.11066
11. Laura Saldaña, Fátima Bensiamar, Gema Vallés, Francisco J. Mancebo, Eduardo García-Reyand Nuria Vilaboa. The immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. *Stem Cell Research & Therapy* (2019) 10:58. DOI: org/10.1186/s13287-019-1156-6
12. Cheng Chen, Te-Hsien Lin , Yu-Hsuan Hsieh, Chih-Ying Chao, Yih-Ru Wu , Kuo-Hsuan Chang , Ming-Chung Lee, Guey-Jen Lee-Chen , and Chiung-Mei Chen. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Article ID 9595741, 16 pages .DOI:10.1155/2018/9595741
13. HongNa Yang , Cuilan Wang, Hui Chen, Lan Li, Shuang Ma, Hao Wang, YaRu Fu, and Tingyu Qu. Neural Stem Cell-Conditioned Medium Ameliorated Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Hindawi Stem Cells International* Volume 2018, Article ID 4659159, 7 pages .DOI:10.1155/2018/4659159
14. Bingke Lv , Feng Li , Jie Fang, Limin Xu, Chengmei Sun, Jianbang Han, Tian Hua, Zhongfei Zhang, Zhiming Feng, Qinghua Wang and Xiaodan Jiang. Activated Microglia Bone Marrow Stem cells to Produce Glia Cells Derived Neurotrophic Factor and Protect Neurons Against Oxygen -Glucose Deprivation -Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience* .December 2016 Volume 10 Article 283.DOI:10.3389/fncel.2016.00283
15. YaoqinHu, ChaojinQin, GuopingZheng, DengmingLai, HuikangTao, YanZhang, GuanguanQiu, MenghuaGe, LanfangHuang, LinaChen, BaoliCheng, QiangShu, andJianguoXu. Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages Ameliorate LPS-Induced Systemic Response. *Mediators of Inflammation*. Volume 2016, Article ID 3735452, 12 pages.DOI:org/10.1155/2016/3735452
16. S. Jyothi Prasanna, Divya Gopalakrishnan., Shilpa Rani Shankar, Anoop Babu Vasandan. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *Stem Cells and Inflammation*. February 2010, Volume 5, Issue 2 e9016.DOI: doi:10.1371/journal.pone.0009016.s009

Received: 28 June 2020

Accepted: 15 July 2020

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Leptospirosis con Síndrome de Weil que debutan con apendicitis aguda. Reporte de un caso

Leptospirosis with Weil Syndrome debuting with acute appendicitis. Report of a case

Jorge Luis Vélez Páez^{1,2}, Wendy Milagros Tercero Martínez¹, Edgar Fernando López Rondón³, Fernando Enrique Rueda Barragán⁴, Verónica Soledad Guerrero Agila⁵

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.14

Resumen: La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial. Su forma clínicamente más grave se denomina Síndrome de Weil, el cual se caracteriza por generar un impacto sistémico multiorgánico severo y frecuentemente fatal. Numerosos animales salvajes y domésticos constituyen el reservorio y se transforman en portadores asintomáticos, siendo fuente de infección hacia los humanos. El diagnóstico se basa en la sospecha clínica y epidemiológica, confirmándose con estudios serológicos. El tratamiento es sintomático, y con antibióticos dirigidos. A continuación, se presenta un caso de una leptospirosis que se presenta con apendicitis aguda con compromiso orgánico severo no consecuente con la patología abdominal inicial.

Palabras clave: Leptospirosis, zoonosis, síndrome Weil, epidemiología, Ecuador.

Abstract: Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution. Its clinically more severe form is called Weil Syndrome, which is characterized by generating a severe and frequently fatal multiorgan systemic impact. Numerous wild and domestic animals constitute the reservoir and become asymptomatic carriers, being a source of infection towards humans. The diagnosis is based on clinical and epidemiological suspicion, confirming with serological studies. The treatment is symptomatic and with targeted antibiotics. Below is a case of leptospirosis that presents with acute appendicitis with severe organic involvement not consistent with the initial abdominal pathology.

Key words: leptospirosis, zoonosis, Weil syndrome, epidemiology, Ecuador.

Introducción

La Leptospirosis es una zoonosis bacteriana, causada por una espiroqueta del género *Leptospira*, de distribución mundial y es considerada en Latinoamérica como una enfermedad endémica, reemergente^{1,2}. Afecta a más de 160 especies de animales salvajes y domésticos, que constituyen el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Las especies más afectadas son los roedores, perros, ganado bovino y porcino, que eliminan las leptospirosis en la orina. El hombre se infecta en forma accidental, por contacto con animales infectados o por contacto agua, terrenos o cualquier lugar contaminado por la orina de estos^{1,3,4}. La enfermedad se puede presentar en forma esporádica o en brotes epidémicos, asociada con migración irregular y actividades u ocupaciones de riesgo, que favorecen el contacto con los animales o sus productos: tamberos, criadores de cerdos, empleados de mataderos, trabajadores rurales de zonas húmedas (arroceras, caña de azúcar) granjeros, hurgadores, trabajadores de alcantarillados, veterinarios entre otros^{1,2,5,6}.

La clínica es inespecífica, siendo la fiebre, mialgias y artralgias síntomas comunes en la mayoría de los casos, ictericia, compromiso neurológico, insuficiencia renal o insuficiencia respiratoria son síntomas elocuentes de gravedad. La sospecha diagnóstica es clínica - epidemiológica y se confirma con pruebas serológicas^{1,4,7}. El tratamiento es sintomático, de sostén de funciones vitales y antibióticos, indicación discutida por algunos más allá de los 7 días del comienzo de los síntomas².

Entre las formas graves de la leptospirosis está el síndrome

de Weil, producido por la *Leptospira interrogans* una bacteria del orden Spirochaetales de la familia leptospiraceae, que clínicamente presenta ictericia que aparece del cuarto a noveno día posterior al contagio, fallo hepático, falla renal aguda por necrosis tubular, oliguria o anuria, rhabdomiólisis, hemólisis, miocarditis, pericarditis, insuficiencia cardíaca congestiva, choque cardiogénico, y falla multiorgánica².

A continuación, presentamos el caso de una Leptospirosis con síndrome de Weil, con presentación clínica inicial de apendicitis aguda.

Caso clínico

Varón de 37 años, de nacionalidad venezolana en migración irregular por Ecuador, comerciante informal, consumidor de alcohol y drogas ilícitas. Consulta por presentar dolor abdominal de 4 días de evolución, acompañado de náusea que llega al vómito por varias ocasiones, de contenido alimentario y alza térmica no cuantificada.

Recibido en Urgencias, se presentó consciente, hipotenso, tensión arterial (TA) de 80/56 mmHg y tensión arterial media (TAM) de 54 mmHg, frecuencia cardíaca de 60 latidos por minuto (lpm) y respiratoria de 16 rpm, con dolor abdominal difuso, con signos de irritación peritoneal en fosa ilíaca derecha (FID), tuvo leucocitosis con neutrofilia como dato positivo en paraclínicos. Su primer día permaneció hipotenso con cifras

¹ Especialista en Medicina Crítica. Cuidados Intensivos Adultos, Hospital Pablo Arturo Suárez. Quito, Ecuador.

² Master en Investigación Clínica y Epidemiológica, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

³ Especialista en Cardiología y Ecocardiografía. Área Clínica de Cardiología, Hospital Pablo Arturo Suárez. Quito, Ecuador.

⁴ Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

⁵ Hospital Pablo Arturo Suárez. Quito, Ecuador

Corresponding author: jlvelez@uce.edu.ec

de TAM < 65 mmHg, que no revirtió con líquidos intravenosos, Cirugía General catalogó como abdomen agudo inflamatorio por apendicitis aguda y decidió manejo quirúrgico, se encontró durante la cirugía un apéndice inflamado (grado II), con líquido inflamatorio en FID, sin otros hallazgos, realizaron apendicectomía sin complicaciones.

Durante y posterior a la cirugía, el paciente persistió inestable, hipotenso, taquicárdico (132 lpm), con acidemia por acidosis metabólica con lactato elevado (7,7 mmol/L), sin hemorragia activa identificable se mantuvo oro intubado y en ventilación mecánica invasiva.

Ingresó a la Unidad de Terapia Intensiva (UTI), icterico, hipotenso, anúrico, mal perfundido, con llenado capilar de 7 segundos y lactato persistentemente alto, pese a administración de fluidos (30 ml/kg) no mejoró su presión arterial, bajo el criterio de choque séptico de foco abdominal requirió inicio de drogas vasopresores a dosis altas (norepinefrina y epinefrina), tuvo fallo orgánico con mayor impacto a nivel renal y hepático. Paraclínicos revelan hiperazotemia, hiperbilirrubinemia a expensas de la fracción directa (Figura 1) y moderada elevación de transaminasas (Figura 2) con un valor de procalcitonina de 26,91. Se indicó manejo antibiótico con Ampicilina + Sulbactam endovenoso a dosis altas.

Entre el día 2 y 3 en UTI se solicitó ecografía de hígado y vías biliares, para estudio de la ictericia el mismo que no reportó hallazgos patológicos; una ecocardiografía (Imagen 1) reveló hallazgos compatibles con miocarditis, disfunción sistodiastólica biventricular con fracción de eyección baja inicialmente <20% y a las 24 horas de 40% evaluada por Simpson y de 28% en ventrículo derecho evaluada por FAC (imagen 1B y C), se añadió dopamina al manejo del choque que permitió el retiro de la norepinefrina y epinefrina. Incrementó su ictericia e hiperbilirrubinemia (Figura 1 y 2), considerada no obstructiva debida a colestásis secundaria a la sepsis. (Figura 3)

A partir del día 4 de ingreso, mejoró su estado global, abandonó la ventilación mecánica, se retiró dopamina y se mantuvo con TA estables. Su fallo renal remitió y sólo persistió la hiperbilirrubinemia. Con base al cuadro clínico (fiebre, ictericia, compromiso hepatorenal, miocarditis) y sospecha epidemiológica (migrante irregular) se solicitó investigación de leptospira, cuyo resultado es positivo (IgM +). Es egresado a Medicina Interna, los valores de bilirrubina empezaron a normalizarse; cumplió su tratamiento antibiótico y egresó del hospital en condiciones adecuadas.

Evolución de valores de Bilirrubinas

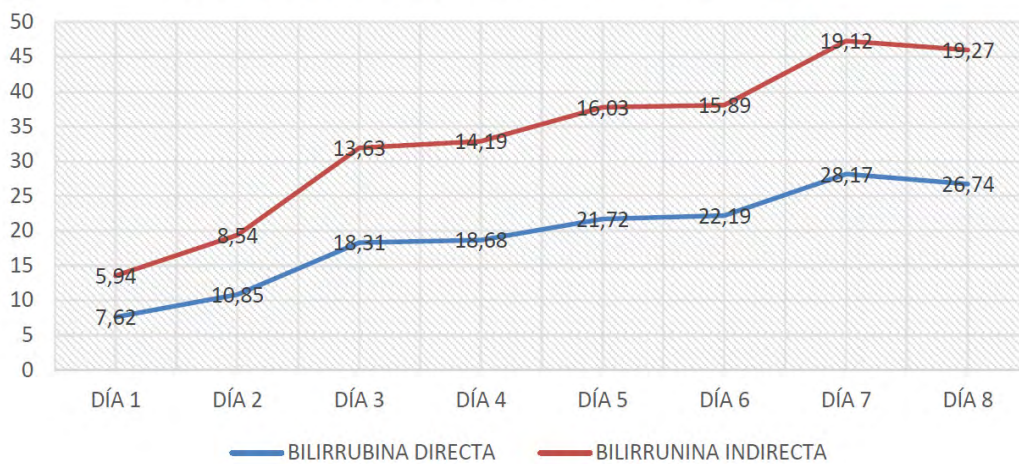


Figura 1. Valores de bilirrubina desde ingreso de paciente.

Evolución de valores de Transaminasas

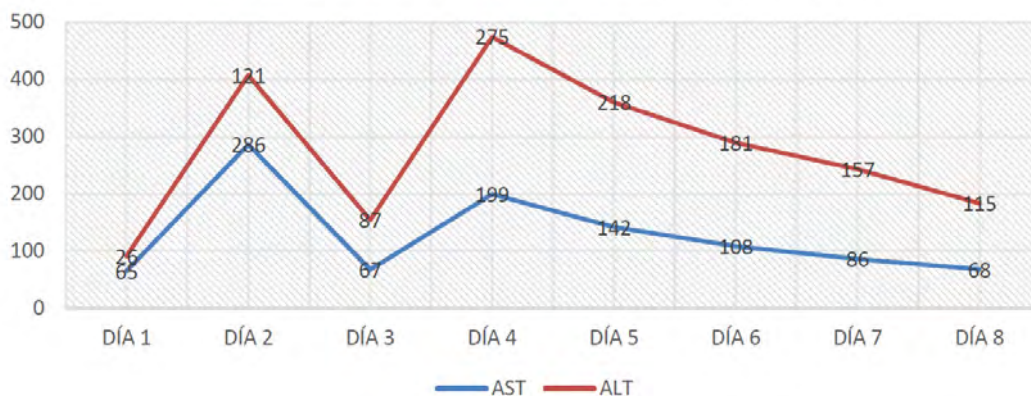


Figura 2. Valores de transaminasas desde ingreso de paciente

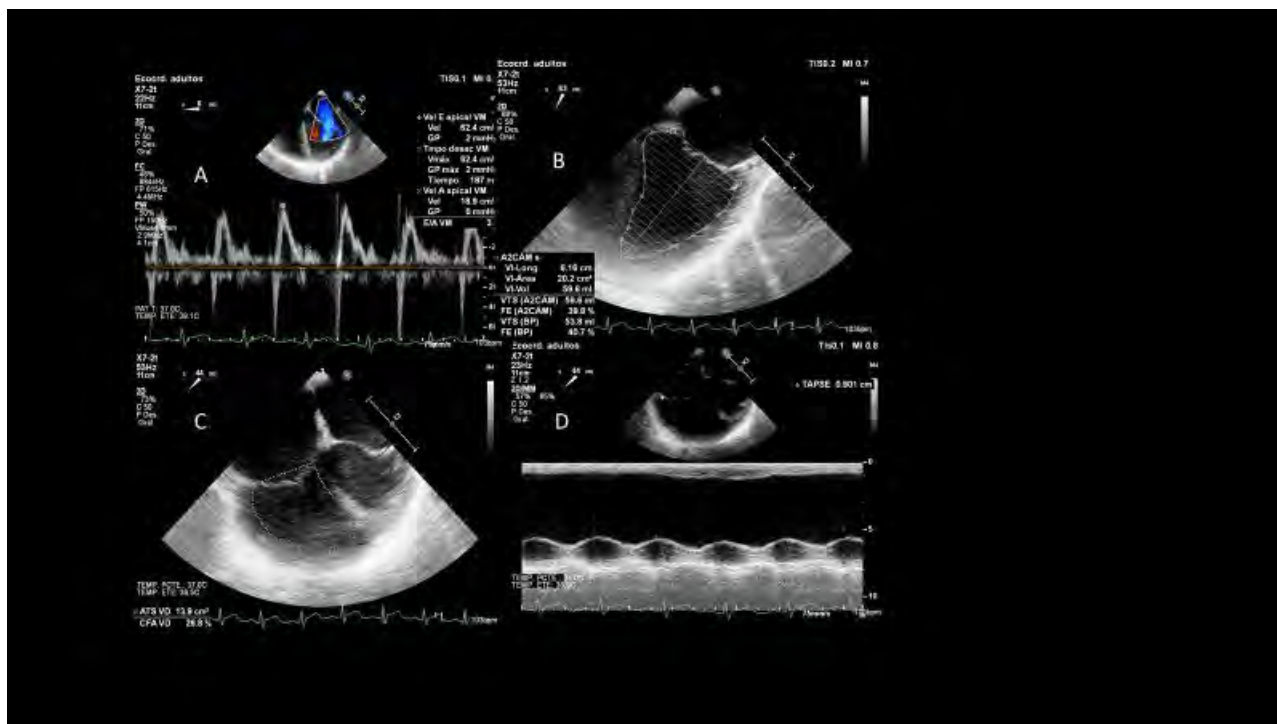


Figura 3. Ecocardiograma Transesofágico. A Vista medio esofágica Registro de TEVI patrón Pseudo normal que sugiere aumento de la presión de llenado del VI. B: Método de Simpson Biplano, para evaluación de fracción de eyección, disfunción sistólica moderada FE: 40%. C: Evaluación de Ventriculo derecho con método FAC que sugiere disfunción ventricular moderada, FAC: 26%. D: Complemento de evaluación de función sistólica de ventriculo derecho con TAPSE, que corrobora la disfunción TAPSE 0.9 cm.

Discusión

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica, infecciosa, endémica, epidémica y reemergente de zonas con climas subtropicales y tropicales⁸, *Leptospira* es patogénica para los hombres y los animales con más de 200 variedades serológicas; según datos de la Organización Mundial de la Salud hay más de 500,000 casos anualmente, la mayoría de ellos presentaron complicaciones severas con más del 10% de mortalidad, a pesar de ser una enfermedad de notificación obligatoria no se conoce con certeza el número de infecciones en humanos por ser subdiagnosticada o diagnosticada erróneamente^{9,10}.

Ecuador es una zona endémica de leptospirosis se ha estimado una media anual de 1 caso por cada 100000 habitantes, predominante en las provincias de Manabí, Zamora Chinchipe y Esmeraldas, tanto en zonas rurales como urbanas. Tiene menor incidencia en Pichincha, Azuay y El Oro, con baja positividad en ratas, pero alta positividad en bovinos; se ha registrado un incremento de casos en los últimos años (2016: 83 casos, 2017: 141 casos, 2018: 139 casos y hasta julio de 2019: 91 casos); la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiología en el reporte oficial julio de 2019 indica ausencia de brotes¹¹.

En este reporte de caso, la migración irregular fue el nexo epidemiológico que junto al cuadro clínico generaron la sospecha diagnóstica, la importancia del caso radica en que los fenómenos migratorios regionales actuales pueden establecer zonas endémicas en sitios geográficos previamente libres de la zoonosis.

Clínicamente, nuestro paciente debutó con dolor abdominal como signo cardinal, el cual, se manejó como abdomen agudo inflamatorio por apendicitis aguda y fue intervenido quirúrgicamente. Un reporte de caso antiguo¹², pero enriquecedor para entender la clínica de la enfermedad, menciona que el

dolor abdominal está presente en el 50% de todos los casos y que uno de los diagnósticos diferenciales obligatorios es la apendicitis aguda, es así, que en la literatura mundial, Abyseskera y cols¹³ reportan haber tratado a un paciente con leptospirosis que debutó con un cuadro abdominal y evolucionó hacia la ictericia y elevación posterior de enzimas hepáticas, de manera similar a nuestro paciente.

La insuficiencia renal aguda (IRA), se presenta en un 40 a 60% de los casos¹⁴, requiriendo terapia sustitutiva renal en la mitad de ellos¹⁵, y se asoció con incremento del riesgo de muerte. En nuestro caso el paciente cursó con una IRA, la cual no cumplió con criterios dialíticos de emergencia, la razón de no llegar a sustitución seguramente se explica por la compensación satisfactoria del choque y la sospecha diagnóstica acertada que permitió dirigir la terapia antibiótica.

El choque de este paciente constituyó un reto, considerado inicialmente como choque séptico refractario, se manejó con fármacos vasoactivos a dosis altas (norepinefrina y epinefrina); sin embargo, la ecocardiografía transesofágica a pie de cama del paciente, identificó una disfunción sistólica y diastólica biventricular, lo que nos orientó a pensar en una miocarditis por leptospira vs una miocardiopatía séptica, este hallazgo y el evidente factor cardiogénico del choque hizo que se añadiera un inotrópico como la dopamina, con resultados óptimos; en este sentido la Sociedad Europea de Cardiología¹⁶ en el año 2018 mencionó que el 55% de pacientes diagnosticados de leptospirosis que debutan con colapso circulatorio, muestran signos de disfunción sistólica miocárdica, caracterizada por una tensión longitudinal global y una fracción de eyección ventricular izquierda anormales, además de disfunción sistólica ventricular derecha, elevación de troponinas (61%) y cambios electrocardiográficos, lo cual la asemeja mucho a la miocardiopatía séptica y hace difícil su diferenciación; la miocarditis intersticial con infiltrado celular se demostró en un alto porcentaje de

pacientes con leptospirosis (hasta 96% en algunas series), en los que se evidencia afectación perivascular de los vasos coronarios intramiocárdicos y de los troncos coronarios¹⁷. Jayathilaka *et al*¹⁸ reportaron una serie de 5 casos donde los pacientes con leptospirosis severa debutaron con choque y compromiso de la función cardíaca, los 5 pacientes se recuperaron y no mostraron secuelas; al igual que nuestro paciente en donde el ecocardiograma de control mostró normalización de la función miocárdica.

Conclusiones

Se ha presentado el caso de un paciente con diagnóstico confirmado de Leptospirosis en su forma más severa, el síndrome de Weil; las peculiaridades del caso se basan en la presentación clínica no usual, pero descrita, de apendicitis aguda; y la segunda la miocarditis por leptospira, que bien podría corresponder a una miocardiopatía séptica inducida por la espiroqueta y que podría beneficiarse para su diagnóstico de Resonancia Magnética Nuclear Cardíaca, para determinar si son entidades realmente distintas. Además, el conocimiento del comportamiento clínico y epidemiológico de la enfermedad se tradujo en un diagnóstico y tratamiento acertado que generó un desenlace clínico favorable y la supervivencia del paciente pese a la alta mortalidad reportada.

Referencias bibliográficas

1. Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. Comisión del Convenio MSP/MGAP para el Control, Vigilancia e Investigación en Zoonosis. OPS/OMS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02. [Internet]. 2011 [citado 2019 octubre 31]; Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/leptos.pdf>.
2. Breijo M, Servioli L, Mencía X, Piñeyrúa M, Zim N. Leptospirosis con compromiso respiratorio predominante. Presentación de cinco casos clínicos. Rev. Med Urug. [Internet]. 2006 [citado 2019 octubre 28]; 22 (3): 220-225. Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/2006v3/art9.pdf>.
3. Berdasquera Corcho D, Rodríguez González I, Obregón A, Fernández Molina C, Segura Prevost R, Bustabad Arigas E, Sánchez Falcón CM. Brote de Leptospirosis humana en la provincia de Guantánamo. Rev. Cubana Med Trop [Internet]. 2007 [citado 2019 octubre 28]; 59. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol59_1_07/mtr04107.htm.
4. Céspedes M, Tapia R, Balda L, González D, Glenney M, Vinetz J. Brote de Leptospirosis asociado a la natación en una fuente de agua subterránea en una zona costera, Lima, Perú. Rev. Perú Med Exp Salud Pública [Internet]. 2009 [citado 2019 octubre 28]; 26 (4): 441-48. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v26n4/a05v26n4>.
5. Abuauda MC, Osorios G, Rojas J, Pino L. Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. Rev. Chil Infect [Internet]. 2005 [citado 2019 octubre 25]; 22 (1): 93-97. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v22n1/art12.pdf>.
6. Macías Herrera JC, Vergara C, Romero Vivas C, Falconar. A. Comportamiento de la Leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia). Salud Uninorte. Barranquilla (Col) [Internet]. 2005 [citado 2019 octubre 25]; 20: 18-29. Disponible en: <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/4118/5669>.
7. Mapeo de la distribución de la tasa de incidencia de leptospirosis por Departamento. UVISAP2008DL. DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA DE SALUD. DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA [Internet]. 2008 [citado 2019 octubre 29]; Disponible en <http://www.um.edu.uy/docs/leptospirosis.pdf>.
8. Rodríguez Pérez R, González Gómez AI, Palacios Arias A. Leptospirosis en el entorno actual. Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta [revista en Internet]. 2014 [citado 2019 Nov 11]; 39(12). Disponible en: <http://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/127>.
9. Wang S, Stobart Gallagher MA, Dunn N. Leptospirosis (enfermedad de Weil) [Actualizado 2019 20 de agosto]. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [revista en Internet]. 2019. [citado 2019 Nov 7] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441858>.
10. World Health Organization. Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group; [internet]. 2011 [citado 2019 Nov 11]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=4784&lang=es&Itemid=101.
11. Ministerio de Salud Pública. Subsecretaría de Vigilancia de la Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsistema de Vigilancia SIVE-Alerta. Enfermedades Zoonóticas SE 1-27. [Internet]. Quito; Ecuador 2019 [citado 12 noviembre 2019]. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/05/gaceta_zoonoticasSE27.pdf.
12. Areal V. M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). The American journal of pathology, 1962; 40(4), 393-423. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1949541/pdf/amjpathol00329-0024.pdf>.
13. Abeysekera, W., De Silva, W., Chandrapalan, S., Pragatheswaran, P. and Banagala, A., 2012. Abdominal pain and jaundice: Beware of the perforated appendix. Galle Medical Journal, 17(2), pp.35-36. DOI: <http://doi.org/10.4038/gmj.v17i2.4922>.
14. Ministry of Health, Nutrition and Indigenous Medicine Sri Lanka, National Guidelines on Management of Leptospirosis, 2016 Disponible en: http://www.epid.gov.lk/web/images/pdf/Publication/leptospirosis/lepto_national_guidelines.pdf.
15. Daher Elizabeth De Francesco, Abreu Krasnalhia Livia Soares de, Silva Junior Geraldo Bezerra da. Leptospirosis-associated acute kidney injury. J. Bras. Nefrol. [Internet]. 2010 Dec [cited 2019 Nov 12]; 32(4): 408-415. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002010000400010&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002010000400010>.
16. Mathew, A., Shanks, M., Punnoose, E., Fischer, L., Koshy, G., Potluri, R., & Baine, K. R. (2018). Cardiac involvement in critically ill patients with leptospirosis: A prospective study using myocardial deformation imaging. European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care, 204887261880931. doi:10.1177/2048872618809319.
17. Shah K, Amonkar GP, Kamat RN, Deshpande JR. Cardiac findings in leptospirosis. J Clin Pathol 2010; 63:119-23 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154032>.
18. Jayathilaka, P.G.N.S., Mendis, A.S.V., Perera, M.H.M.T.S. et al. An outbreak of leptospirosis with predominant cardiac involvement: a case series. BMC Infect Dis 19, 265 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3905-7>.

Received: 2 febrero 2020

Accepted: 10 junio 2020

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Infiltración Linfocitaria de Jessner-Kanof. Reporte de un caso Lymphocytic infiltration of Jessner-Kanof. Report of a case

Adrian Isacc Nieto Jiménez

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.15

Resumen: Se presenta una paciente de raza blanca, de 48 años de edad, valorada en el servicio de Dermatología, refiriendo una mancha roja y escamosa en forma de línea en la frente de 1 año de evolución, que en ocasiones se acompañaba de ardor. Había utilizado varios tratamientos médicos sin mejoría, por lo que acude a nuestro servicio. Fue valorada y examinada detenidamente y se plantearon como diagnósticos probables: una Esclerodermia lineal, un Lupus Eritematoso Fijo Discoide Crónico y una Infiltración Linfocitaria de Jessner. Se realizó biopsia cutánea que confirmó que se trataba de una Infiltración Linfocitaria de Jessner-Kanof. Esta entidad es muy rara y controvertida. Se instauró tratamiento con antipalúdicos con mejoría total del cuadro cutáneo.

Palabras clave: Jessner-Kanof, Linfocitos, Eritema.

Abstract: A patient of the white race, 48 years old, is presented valued in the service of Dermatology, referring a red and scaly stain inline form in the 1-year-old forehead that accompanied of ardor on occasions. It had used several medical treatments without improvement, for what goes to our service. It was valued and examined attentively, and they thought about as diagnostic probable: a linear Scleroderma, a Chronic Discoid Fixes Lupus Erythematosus and a Lymphocytic Infiltration of Jessner. He/she has carried out a cutaneous biopsy that confirmed that it was a Lymphocytic Infiltration of Jessner. This entity is bizarre and controversial. Treatment was established with antimalarial with the total improvement of the cutaneous square.

Key words: Jessner, Lymphocytes, Erythema.

Introducción

Los trastornos Linfoides con síntomas en la piel se caracterizan por su rara presentación y la dificultad diagnóstica en muchos casos, que lleva a un diagnóstico erróneo y graves consecuencias. Las especialidades responsables de realizar el diagnóstico y tratamiento estas dermatosis son Hematología (cuando se acompaña de síntomas hematológicos) y la Dermatología¹. Dentro de este grupo de alteraciones se encuentra La Infiltración Linfocitaria de Jessner-Kanof. Este trastorno linfocitario se trata de un proceso linfoproliferativo benigno de la piel de etiología desconocida descrito por primera vez por Max Jessner y Norman Kanof en 1953 en Archivos de Dermatología¹. Hoy casi 70 años después continúa siendo pobremente entendida discutiéndose si corresponde a una dermatosis independiente o si representa un estadio de otras enfermedades que dan infiltrados linfocíticos en la dermis, conocidas clásicamente como las 5 Ls; Lupus Eritematoso Discoide (LED), Erupción solar polimorfa (ESP), Linfocitoma cutis (LC) y Linfoma linfocítico bien caracterizado (LLBD)².

Clínicamente se caracteriza por placas y pápulas eritematosas, con diferentes patrones de comportamiento que predominan en zonas foto expuestas, sobre todo en la mitad superior del tronco. Estas lesiones suelen desaparecer sin dejar cicatrices³. En la histopatología muestra un patrón de infiltrado de linfocitos perivascular y perianexial en la dermis, con depósito escaso de mucina en los haces de colágeno⁴. El diagnóstico positivo se realiza mediante la clínica y estudios histológicos e inmunohistoquímicos³. Su diagnóstico diferencial suele ser complejo, por lo que retarda la terapéutica y favorece las complicaciones sistémicas².

Es más frecuente en hombres que en mujeres, y su respuesta es favorable al tratamiento con antimaláricos. Su prevalencia es mayor en países de Europa, aunque su exactitud

se desconoce^{1,2}. En Cuba no se reportan casos con diagnóstico de esta entidad⁵. Tomando en consideración la rareza de esta enfermedad y su complejidad diagnóstica se decide presentar el siguiente caso.

Caso clínico

Se trata de una mujer blanca de 48 años de edad que acude a consulta de Dermatología referida del área de salud por lesiones lineales eritematosas, prácticamente asintomáticas a nivel de la frente, estas aparecieron en cuero cabelludo y luego se extendieron a la región frontal, manteniéndose estacionaria durante cerca de 1 año. Ha realizado varios tratamientos médicos, incluyendo cremas esteroideas sin mejoría clínica. Niega lesiones cutáneas en otro sitio del cuerpo, ni ingesta de medicamentos previo al cuadro cutáneo.

APP: Fotosensibilidad, HTA en tratamiento médico con Enalapril 10 mg diarios

APF: Madre con Diabetes Mellitus

Alergia a fármacos: negativo

Al interrogatorio no se recoge otro dato de interés.

Al examen físico

Se observa lesión en placa lineal eritematopapulosa, con bordes indefinidos, (Figura 1) que se extiende desde el cuero cabelludo hasta la región interiliar, el eritema es más acentuado hacia la región de implantación del cuero cabelludo, (Figura 2) respetando el resto del tegumento cutáneo. Al inicio se acompañaba de prurito ligero y discreto ardor, pero en el momento del examen físico se encontraba asintomática. No presencia de atrofia. Esta dermatosis no estuvo precedida por lesiones inflamatorias previas.

¹ Especialista en primer grado en Medicina General Integral y Dermatología. Profesor Asistente, Diplomado en Hematodermias. Investigador Agregado, Hospital Pediátrico Provincial: José Luis Miranda. Santa Clara, Cuba.

Se realizó toma biopsia de piel con Inmunofluorescencia que mostró un infiltrado perivascular superficial y profundo que compromete los anexos cutáneos y presencia de exocitosis. La inmunofluorescencia fue negativa. Se realiza estudio inmunohistoquímico que arrojó la presencia del anti-CD3 positivo localizado en el área periférica lo que indica predominancia de linfocitos T y el CD 20 positivo en el área central, presencia de linfocitos B, compatible con un inmunofenotipo de Infiltración Linfocitaria Jessner-Kanof de células B perivasculares.

Se indicaron complementarios de rutina incluyendo:

Biometría más VSG, perfil hepático y renal, perfil glucémico y lipídico, LDH, ANA y ANCA, PCR, factor reumatoideo: todos dentro de los límites normales. Además, se realizó Rx de tórax y TAC de cráneo que no mostraron alteraciones.

Se inició tratamiento con antimaláricos (Hidroxicloroquina) 200 mg diarios y foto protección, con mejoría del cuadro clínico a los 35 días.

Comentarios

La Infiltración Linfocitaria de Jessner Kanof es una enfermedad inflamatoria benigna, crónica, rara y desconocida. Se debe a una acumulación de células T en la dermis. Pueden existir antecedentes de fotosensibilidad asociados a la enfermedad. Se presenta en adultos de edad media con una distribución por género de 3:1 a favor del hombre, no es común observarla en niños o ancianos⁶. Puede considerarse un proceso hiperplásico linfoide cutáneo secundario a uno o más estímulos antigénicos actualmente desconocidos de probable origen en la circulación sanguínea. Se presenta como pápulas eritematosas que pueden o no unirse en placas, levemente induradas, sin descamación ni telangiectasias. Se ubican en cara (región malar, dorso de la nariz y región peri auricular) y parte superior de tronco y hombros. En general son únicas o escasas, pero raramente se da una afectación difusa. Cursa



Figura 1. Se observa placa eritematopapulosa lineal que se extiende desde el límite de implantación del pelo hasta el dorso nasal.



Figura 2. En esta imagen se aprecia el eritema más marcado hacia la región cercana a la implantación del cuero cabelludo.

con períodos de exacerbaciones y remisiones y cura sin dejar secuelas².

La fotosensibilidad es frecuente pero no la regla, un estudio sobre 100 personas con esta patología realizado por Toonstra *et al* lo evidencia¹.

En la histología se observa un infiltrado denso perivas- cular y en ocasiones perianexial a predominio linfocitario en dermis superficial y profunda, la epidermis puede ser normal o presentar leve acantosis e hiperqueratosis. Todos los trabajos de inmunomarcación coinciden en la presencia de un infiltrado de linfocitos T monomorfos a predominio del tipo T auxiliado- ras (*T helper*) y algunas células plasmáticas. Además, se en- contraron inmunocomplejos circulantes en los pacientes con esta entidad. Se ha demostrado que durante las recurrencias hay un aumento en los títulos de estos inmunocomplejos⁷.

Entre los diagnósticos diferenciales se encuentran: el LED, lupus tímido (LT), la ESP, el LC, el LLBD, el granuloma facial, granuloma anular y las fotodermatitis idiopáticas tal como la lucitis polimorfa. Con respecto al lupus se presentan las mayores dificultades en su diagnóstico diferencial clínico. En el LED las lesiones se asemejan en un principio, luego evo- lucionan con importantes escamas adherentes, taponamiento folicular y posterior atrofia central. El LT es similar en su va- riante policíclica en el aspecto de las lesiones, pero tiene mar- cada fotosensibilidad e importante presencia de mucina entre los haces de colágeno dérmicos. El componente inflamatorio dérmico y la respuesta positiva al tratamiento con antimalá- ricos son aspectos en común⁸. Las opciones de tratamiento son varias pero algunas con resultados insuficientes y tempora- rios, como es el empleo de esteroides tópicos u orales. Los an- timaláricos (cloroquina e hidroxicloroquina) son efectivos, así como también lo es el metotrexato. También han sido usados talidomida (contraindicada en embarazadas y en mujeres en edad fértil y que no toman anticonceptivos) y el proquazona⁹.

El fármaco Proquazona es un antiinflamatorio no esteroi- deo usado en trastornos reumatológicos y cuadros de inflama- ción y dolor agudos, no disponible en Cuba. En la Infiltración Linfocitaria de Jessner actuaría modulando el patrón de acti- vación de las subclases de linfocitos. La terapia adicional con foto protección siempre es aconsejada¹⁰. El pronóstico general es favorable³. En la presente publicación del caso queremos destacar la resistencia del cuadro a los corticoides locales y una excelente respuesta a la hidroxicloroquina y foto protec- ción durante todo el año con remisión total de las lesiones en el término de 35 días.

Conclusiones

La Infiltración Linfocitaria de Jessner Kanof representa una dermatosis muy poco frecuente y subdiagnosticada. El diagnóstico positivo se realiza por estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Referencias bibliográficas

1. Toonstra J, Wildschut A, Boer J. Jessner lymphocytic infiltration of the skin. A Clinical study of 100 patients. Arch Dermatol 2013; 125:1530.
2. Kuhn A, Richter -Hintz D, Oslislo C, et al. Lupus Erythematosus Tumidus. A neglected subset of cutaneous lupus erythematosus: Report of 40 cases. Arch Dermatol 2014; 136: 1033-1041.
3. Kuhn A, Sonntag M, Ruzicka T, et al. Clinical and histopathologic findings in Jessner lymphocytic infiltration of the skin: Review of 80 patients. JAAD 2015; 48:901-908.

4. Sonntag M, Ruzicka T, et al. Histopathologic findings in Jessner lymphocytic infiltration of the skin: Review of 23 patients. JAAD 2016; 28:122-126.
5. Centro de Hematología Clínica Nacional. Cuba. La Habana: Reporte de enfermedades linfoides. 2016.
6. Herrera-Goepfert R. Infiltración linfocítica cutánea benigna (Jess- ner y Kanof). Dermatología Revista Mexicana. 2017; 5: 341-343.
7. Papa M, Maldonado S, Chappuris JM, Consigli J. Infiltración linfo- cítica de Jessner y Kanof. Arch. Argent. Dermatol. 2017; 51: 205- 209.
8. Viglioglia P. Lupus eritematoso tímido (una forma algo olvidada del LE crónico) Act Terap Dermatol. 2017; 28:250-253.
9. Laurinaviciene R, Clemmensen O, Bygum A. Successful treatment of Jessner lymphocytic infiltration of the skin with methotrexate. Acta Derm Venereol. 2018; 89: 542-543.
10. Johansson EA, Niemi KM, Ranki A. Modification of lymphocyte subsets in Jessner lymphocytic infiltration of the skin during pro- quazone treatment. Dermatologica. 2018; 176: 70-75.

Received: 14 abril 2020

Accepted: 10 junio 2020

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Myopericarditis and skin rash in a patient with COVID-19 infection

Araque R Jorge¹, Paez C Jhenina²

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.16

Abstract: In the current COVID-19 pandemic, it should be the first diagnosis to be excluded, even in endemic areas of other diseases. The COVID-19 disease can be presented with cutaneous manifestations, especially in children. Cardiovascular complications must be taken into account since they can be undiagnosed in patients who do not develop symptoms.

Key words: COVID 19, myopericarditis, skin rash.

Introduction

Girl from an area endemic to tropical diseases, with fever and a diffuse polymorphic rash, is diagnosed with COVID 19. She develops myopericarditis with good clinical evolution.

A 1-year-10-month-old girl, from Manta-Ecuador (tropical climate region), with no history of cardiovascular disease, arrived, accompanied by her parents, to the emergency department of a private medical center in the city of Quito, for presenting persistent fever of 38 ° C for 15 days. The clinical picture evolved on the second day with bilateral conjunctivitis (Figure 2) without discharge, a generalized polymorphic rash that resolved spontaneously in 8 days (Figure 1 A, B, C) with subsequent light peeling of the skin; edema in eyelids, hands, and feet, general discomfort, occasional cough, and light arthralgias. On physical examination: T °: 38.6 ° C, HR: 120 bpm, RR: 26 x', SatO2: 92% ambient air. Heart: heart sounds, rhythms, no murmurs. Pulmonary: preserved vesicular murmur.

Clinical case

Differential diagnosis

The differential diagnosis includes childhood virosis, Kawasaki disease, Dengue, chikungunya, COVID-19 infection, a bacterial infection.

Investigation

In laboratory data (Table 1), the blood cell count revealed leukocytosis, neutrophilia, lymphopenia, normochromic normocytic anemia, thrombocytosis, healthy kidney and liver function, elevated C-reactive protein, normal procalcitonin. A study was carried out for different viral agents according to the clinical and epidemiological conditions, which were negative (Table 1). Three blood cultures performed did not report bacterial growth. Chest X-ray reported accentuation of the bilateral perihilar axial peribronchovascular interstitium, dis-

1253

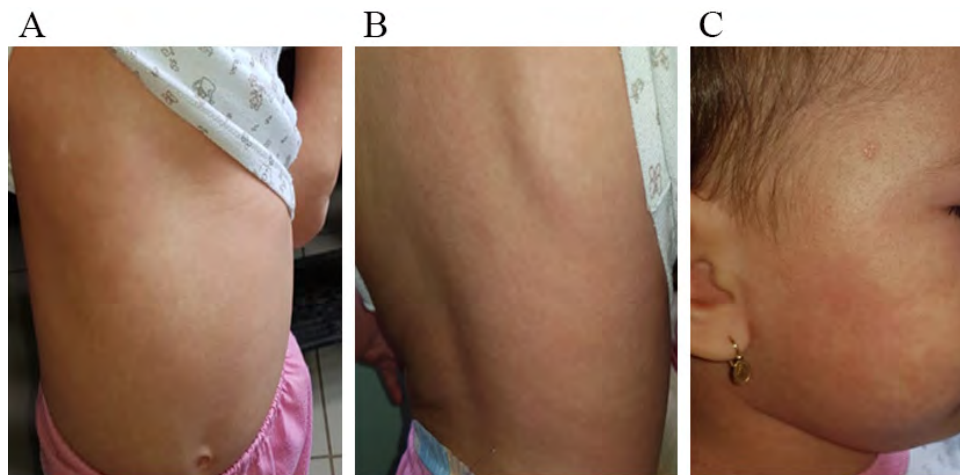


Figure 1. Generalized polymorph exanthem. A: Anterior thorax and upper limb; B: Posterior thorax; C: face.



Figure 2. Eyelid edema and bilateral conjunctivitis

¹ Cardiologist, International Clinic, Quito, Ecuador.

² Radiologist, International Clinic, Quito, Ecuador.

crete right paracardiac acinar infiltrante, and discrete increase in the size of the cardiac silhouette (Figure 3). In the echocardiogram (figure 4A), we observed cardiac chambers of size within normal limits for age, a standard diameter of coronary arteries. Light circumferential pericardial effusion, with 2 mm of separation between pericardial blades, more evident in right chambers without signs of cardiac tamponade. The pulmonary echo reported slight irregularities of the pleural line in zone 10 (Figure 6A). Analyses were complemented by a laboratory study, observing a nasopharyngeal swab a positive for SARS-CoV-2 in the real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and elevation of ferritin (329), lactic dehydrogenase (546 U / L) and troponin T (29.10 pg / mL).



Figure 3. Chest A-P x-ray: accentuation of the bilateral para-hilar axial peribronchovascular interstitium, discrete right paracardiac acinar infiltrate, and discrete increase in the size of the right cardiac silhouette.

Treatment

During her hospitalization, the patient maintained hemodynamic stability. Treatment with antibiotics (azithromycin, ampicillin/sulbactam), paracetamol, and intravenous hydration was started, observing clinical and laboratory improvement. In the ultrasound control carried out 72 hours later, she reported areas of pericardial thickening (4mm), hyper-echogenic along the left ventricular wall, and minor effusion without signs of tamponade (Figure 4B), for this reason, it was decided to continue observing. The pulmonary echo showed normalization of the pleural line in segment 10 (Figure 5B). The patient was discharged on day 11. Telephone follow-up was performed 15 days later; the parents stated that the girl was still asymptomatic.

Discussion

Coronaviruses (CoV) are a family of viruses that can cause various diseases, from a common cold to more severe diseases, such as the Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV) and severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV). The current disease outbreak is caused by a new strain of coronavirus called CoV-19 first reported in Wuhan (China) on 31 December 2019. Ecuador reported its first case on 29 February 2020.

The first epidemiological data on children reported in Wuhan, China, indicate that of 366 children hospitalized for respiratory conditions between January 7 and 15, 2020, 1.6% were positive for COVID 19².

The incubation period of the virus is from 2 to 12 days, with an average of 5.1 days. The clinical picture of SARS-CoV-2 infection is characterized primarily by symptoms of the respiratory tract, including fever (in up to 88.7% of hospitalized patients), cough (67.8% of patients), pharyngodynia, fatigue, conjunctivitis and complications related to pneumonia and acute respiratory distress syndrome¹. As the disease has spread throughout the world, several cases of extrapulmonary invol-

Parameter	Result			
	Reference	Day 1	Day 4	Day 11
White blood cell count, per K/uL	4.80-10.80	25.59	20.64	14.81
Lymphocyte count				
Relative, %	30.0-42.0	16.9	19.6	36.9
Absolute, K/ uL	1.00-7.00	4.33	4.04	5.47
Platelet count, K/uL	130.000-400.00	639.000	608.000	908.00
Red blood cell, M/uL	3.80 – 5.30	3.91	3.53	3.71
Hemoglobin g/dl	10.5-14.4	10.1	9.2	9.2
Hematocrit, %	32.0-43.0	30.1	27.1	28.2
Creatinine , mg/dL	0.50-0.90	0.5	0.5	0.5
C-reactive protein, mg/L	0.10-2.80	313.08	224.75	154
Procalcitonine, mg/mL	<0.46	0.21	0.18	0.13
Ferritin	10.9-92.2	N/A	329	N/A
Lactate dehydrogenase, U/L	225.00-450-00	546.00	N/A	N/A
Sodium, mEq/L	135-155	135	N/A	N/A
Potassium, mEq/L	3.50-5.50	5.30	N/A	N/A
Chloride, mEq/L	95-116	100	N/A	N/A
Creatine Kinase-MB, ng/mL	0.00-25.00	N/A	18.10	N/A
troponinT, pg/mL	< 14	N/A	29.10	N/A
Influenza A/B		negative	N/A	N/A
Adeno virus respiratorio		Negative	N/A	N/A
Virus sincitial respiratorio		negative	N/A	N/A
Citomegalovirus IgG , U/ml	<0.5	<0.150	N/A	N/A

Table 1. Laboratory clinical result.

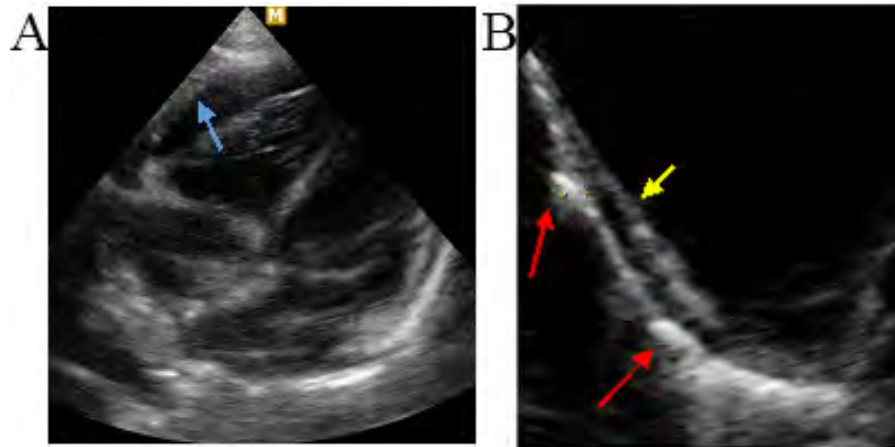


Figure 4. Apical 4-chamber echocardiogram, showing the most significant pericardial effusion at the level of the right cavities (light blue arrow). B: zoom axis for longitudinal sternal, more refractive parietal pericardial thickening areas (red arrows). Visceral pericardium (yellow arrow).

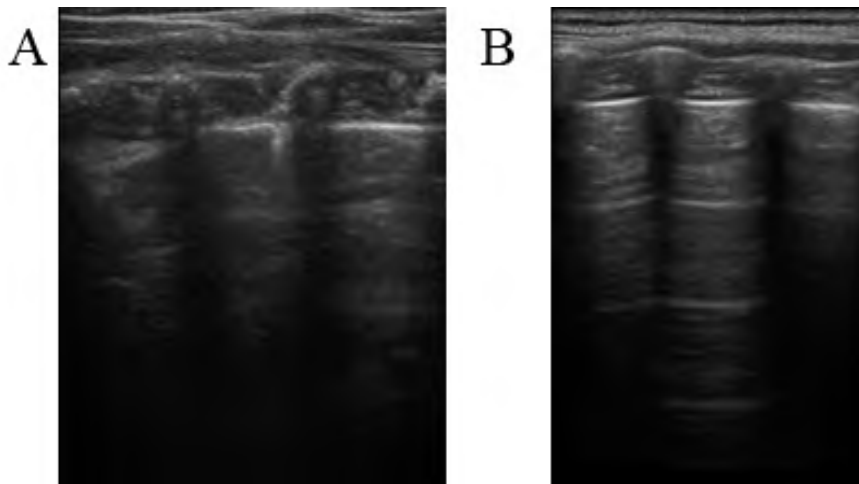


Figure 5. pulmonary echo may show slight irregularity of the pleural line with inconspicuous A-lines; B: study performed 5 days later in which normalization of the pleural line was observed with visualization of lines A.

vement have been reported (e.g., gastrointestinal, skin, cardiovascular, nervous system). From what has been reported so far, the skin manifestations related to COVID-19 may appear at the beginning, during or at the end of the disease, they are very varied and nonspecific and would resolve spontaneously. The most frequent lesions are erythematous rash, generalized urticaria, varicelliform rash, and acro-ischemic lesions—all of them with little itching and unrelated to the severity of the infection. Treatment of urticarial rash, rash, or vesicular eruption is symptomatic (topical antihistamines, emollients, antiseptics, and corticosteroids), and in more complex cases such as acro-ischemic lesions, low molecular weight heparins are indicated^{3,4,5}. In our case, the rash appeared at the beginning of the clinical picture, with spontaneous resolution after 8 days and subsequent light peeling of the skin.

Differential diagnosis is complicated if we take into account that several childhood viral infections are presented with skin lesions, conjunctivitis, and fever. If we also add the fact that endemic diseases that trigger similar symptoms coexist in the patient's geographic area of residence (Dengue, chikungunya, and Zika), we can understand that differential diagnosis is a real challenge for the medical community to face in the current COVID-19 pandemic.

The relationship between COVID 19 infection and pericardial manifestations are rare. The COVID 19 virus is likely to

trigger an inflammatory response leading to pericarditis and, subsequently, pericardial effusion. Elevation of cardiac troponin levels is a sensitive marker of myocardial injury associated with pericarditis, as in the present case, and is called myopericarditis. Driggin *et al.*⁶ reported that increased troponin levels occur in 7% of patients who developed fulminant myopericarditis.

The exact mechanism of affection is unclear, but it is presumed that the virus could cause inflammation of the pericardium and myocardium by a direct cytotoxic effect and by immune-mediated mechanisms⁷. Myopericarditis associated with other cardiotropic viruses, such as influenza and parvovirus B-19, have been extensively described⁷. However, little is known about cardiac involvement as a complication of COVID-19 infection. Our patient developed a subclinical picture of myopericarditis, maintaining the optimal bi-ventricular function, without showing signs of cardiac tamponade and with excellent clinical and ultrasound evolution. Cardiovascular complications are probably mild and well-tolerated in children.

The sensitivity and specificity of the imaging methods in the diagnosis of COVID-19 infection are variable; the computed tomography scan has a low sensitivity (around 50%) in those patients who have constitutional symptoms and do not have respiratory symptoms, and high in patients with a positive study for COVID 19 (86 to 97% in different studies). The chest X-ray has a sensitivity of 59%. Ultrasound studies have

a very low specificity with an excellent sensitivity of 75% and are currently very useful in monitoring lung lesions¹. The first lung echo study performed in our patient showed thickening and irregularities of the pleural line with normalization in subsequent studies, signs that can be identified in patients with a positive COVID 19.

Conclusions

The current pandemic caused by COVID 19 has changed lifestyle and has marked a substantial public health problem. It has exposed the fragile health systems in underdeveloped countries that have tried to make up numbers of contagion and deaths.

Faced with this grim picture, the fact that the clinical patterns of COVID 19 remain unclear, especially in children, is added. In tropical and subtropical regions, the presence of diseases that cause fever and skin lesions such as Dengue, chikungunya, and Zika is frequent, in addition to the typical virosis of childhood. However, given the wave of COVID 19 infections, this should be the first option to rule out since there may be many patients with skin manifestations that are passing or have passed an infection with minimal symptoms and, therefore, they are not have done a coronavirus PCR. The involvement of the pericardium and the myocardium must also be taken into account in patients with COVID-19 disease, to search for it, diagnose it, and monitor its evolution to avoid complications.

Bibliographic references

1. Giuseppe Pascarella, Alessandro Strumia, Chiara Piliego, Federica Bruno, Romualdo Del Buono, Fabio Costa, Simone Scarlata & Felice Eugenio Agrò. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. doi: 10.1111/JOIM.13091.
2. Detection of COVID-19 in Children in Early January 2020 in Wuhan, China. *N Engl J Med* 382;14 nejm.org 2 April, 2020.
3. Chen Y, Peng H, Wang L, Zhao Y, Zeng L, Gao H, et al. Infants Born to Mothers with a New Coronavirus (COVID-19). [Internet]. *Front Pediatr*. 2020;8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.00104/full>
4. Joob B, Wiwanitkit V. COVID-19 can present with a rash and be mistaken for Dengue. *J Am Acad Dermatol*. marzo de 2020;82(5):e177. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.03.036
5. Zhang J, Dong X, Cao Y, Yuan Y, Yang Y, Yan Y, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. [Internet.] *Allergy*. 2020. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.14238>.
6. Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, et al. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *J Am Coll Cardiol* 2020.
7. Riccardo M.Inciardi, MD; Laura Lupi, MD; Gregorio Zacccone, MD; LeonardItalia, MD; Michela Raffo, MD; Daniela Tomasoni ,MD; Dario S. Cani, MD; Manuel Cerini, MD; Davide Farina, MD; Emanuele Gavazzi, MD; Roberto Maroldi, MD; Marianna Adamo, MD; Enrico Ammirati, MD, PhD; Gianfranco Sinagra, MD; Carlo M. Lombardi, MD; Marco Metra, MD. Cardiac Involvement in Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. doi: 10.1001/jamacardio.2020.1096

Received: 1 July 2020

Accepted: 10 August 2020

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Control of pesticides in Ecuador: An underrated problem?

Evelyn Carolina Mollocana Lara and Fernando Alexis Gonzales Zubiarte

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.17

Abstract: Pesticides have become necessary control agents to guarantee food sovereignty and strengthen development in Ecuador. Nevertheless, the current management practices of pesticides in Ecuador restrain the progress of agriculture in this region. There is evidence of a knowledge gap regarding the correct handling of pesticides and the possible health impacts they generate, especially in small producers and surrounding communities. Furthermore, a lack of updated information on pesticide registration difficult their control and distribution. Given this, there is a need to implement new public policies that promote relations between science and technology, not only with the industry but also with local producers, to promote the growth of agriculture, minimizing risks to health and the environment in the sectors involved. The purpose of this review is to exhibit the most updated panorama regarding the management of pesticides in Ecuador.

KeyWords: Pesticides, human health, pesticide management, agriculture, agrocalidad, Ecuador.

1257

Introduction

Agriculture in Developing Countries

Agriculture has a significant influence on various socioeconomic aspects of a country. Beyond ensuring the population's food supply and generating sources of employment, agriculture can accelerate the economy of a country by producing export goods that increase the national income. The increase in foreign exchange allows the acquisition of new goods and supplies that promote the development of the country. Furthermore, agriculture is a source of raw material for other industries, both national and international. However, the main challenge that developing countries face is to move away from a primary economy, which is dedicated to producing raw materials, and to enter into an economy that allows them to generate manufactured products with higher commercial value. Currently, the agricultural sector is subject to the availability of natural resources and changing climatic conditions, and the variability of prices imposed by large producers, which generates disparity in the distribution of profits between small and large farmers, accentuating levels of poverty in small producers.

Origin of pesticides

Agricultural practices have allowed food supply for the world's population since humans became sedentary. Although this practice has been industrialized over time, continuous worldwide demographic growth creates the need to increase crop yields to meet nutritional demands. The main internal factors that affect crop yields are plant genetics, and the external factors are primarily climatic conditions, water and nutrient supply, edaphic conditions, and the presence of diseases and pests¹. According to the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), each year, approximately 40 % of food crops are lost due to plant pests and diseases, representing a loss of 220 billion dollars for the agricultural sector². Moreover, the presence and dispersion of pests can be associated with climate change and human activities, since they give rise to alterations in ecosystems either due to the creation of new niches favorable to pests, or their spread through commercial activities³.

Pest control has been varying across time, starting with an

empirical selection of pest-resistant seeds since the Neolithic era, manual removal of pests to the use of chemical pesticides or biological control methods³. Pesticides are agents that allow pest control and their use has led the agricultural sector because they act as preventive agents that allow farmers to produce more in a smaller land, reduce production and market costs compared to organic products, diminish labor costs for tillage, improve human health by reducing the spread of diseases, among other benefits⁴⁻⁶. Therefore, the use of pesticides has allowed the improvement of not only crop yield but also its quality, generating higher profits for farmers and industry^{4,7}. Thus, it is expected that global growth in the use of pesticides, around 11% in the coming years⁷. However, exposure to certain pesticides has become a severe risk to human and environmental health.

Evaluate the impact of a pesticide is complex because it implies analyze interactions between biotic and abiotic factors of an ecosystem, as well as consider the active and co-formulating components of the pesticide, where chemical alterations such as changes in polarity, molecular symmetry or spatial arrangement of molecules may be present, hence effects on the environment may be unpredictable⁷. The main problems associated with the use of pesticides involve the misuse at the time of handling, dispersion, and contamination through water and soils outside the cultivation area, lack of specificity, tissue bioaccumulation, and biological magnification through the food chain⁸. Thus, before their application, it is necessary to evaluate not only the effectiveness of each pesticide but also the potential risks to the safety and health of living beings and the ecosystem that surrounds them.

Type of pesticides

Carbamates

Carbamates are a type of pesticides derived from carbamic acids, which include herbicides, fungicides, and insecticides mostly. The chemical structure of carbamates is shown in

Figure 1A. The mechanism of action of carbamate pesticides is to work as an inhibitor of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) in a similar way to organophosphate pesticides⁹. The inhibition of AChE causes an increase of acetylcholine at synapses in the central nervous system, at parasympathetic effector junctions, and at neuromuscular junctions, which in turn causes an overstimulation of the nervous system¹⁰⁻¹². This inhibition is reversible because of the spontaneous hydrolysis of the carbamylated enzyme¹¹. Thus, as the carbamyl-acetylcholinesterase complex dissociates promptly than the phosphoryl-acetylcholinesterase complex, the possible toxic effects in mammalian are less aggressive and reversible than those produced by organophosphate pesticides^{11,12}. That is why carbamates pesticides are widely used not only in agroindustry but also for domestic use and gardens.

Organophosphates

Organophosphates involve a family of pesticides that handle pests, causing interferences in the nervous system. This class of pesticides promotes the accumulation of acetylcholine, producing difficulties in the transmission of nerve impulses, similarly to carbamates, that is, inhibiting AChE enzyme activity¹³. However, the inhibition caused by organophosphates tends to be irreversible spontaneously, so that the neurotoxic effects have a longer duration, generating more significant threats, and long-term consequences if they are not treated early¹⁴. Moreover, due to its potential toxicity, some variations of this pesticide such as parathion have been withdrawn from the market or limited to agro-industrial use such as chlorpyrifos¹³. The toxic effects and effectiveness of the pesticide may vary depending on the functional group that carries the compound and other agents included in the formulation. The general chemical structure of organophosphates is shown in Figure 1B. The route of absorption can also influence the degree of toxicity of the compound; thus, inhalation or ingestion of organophosphates pesticides can generate more significant threats than dermal absorption¹³.

Organochlorine

Pesticides containing at least one ring structure and several chlorine atoms are considered organochlorine¹⁵. This type of pesticides has been one of the most used during the years 1940-1960 due to their low cost. Among the best-known pesticides that belong to this group are dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), gamma-hexachlorocyclohexane (γ -HCH, or lindane), methoxychlor, endrin, endosulfan, among others¹⁶. DDT chemical structure is shown in Figure 1C. The mechanism of action of these pesticides affects the nervous system of the plague by causing disruptions in ion flow, which in turn affects the transmission of the nerve impulse¹⁵. DDT and derivatives, for example, alter the action potential generated by neurons through their interaction with sodium channels in axons, generating hyperexcitability of neurons^{15,16}.

On the other hand, another group of organochlorines known as cyclodienes interacts with the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors preventing the transmission of the action potential between neurons^{15,16}. Organochlorine compounds are considered as persistent organic pollutants (POPs) due to their lipophilic properties, which means that they can be bioaccumulated and biomagnified in soils, waters, and living organisms, increasing their risk of toxicity and adverse effects¹⁵. Therefore, as of the 1970s, they begin to be banned due to the serious adverse health effects, and only remained to be used in some developing countries to control vector disease

organisms such as the mosquito that spreads malaria or for specific purposes¹⁷.

Pyrethrins and pyrethroids

Pyrethrins are organic compounds extracted from the *Chrysanthemum cinerariifolium* plant. This substance possesses natural insecticidal properties, which is why it is considered as an organic insecticide of low toxicity for humans and of low permanence in the environment because it degrades rapidly¹⁸. This is why pyrethrin-based insecticides are widely used in the home and on a small scale as a substitute for other pesticides such as organophosphates and organochlorines¹⁹. However, pyrethrins are not entirely stable under several environmental conditions, and many pests can develop resistance over time¹⁸. Pyrethroids, on the other hand, are substances of a synthetic nature similar to pyrethrin but with more significant insecticidal potential that require less application dose²⁰.

Nevertheless, new versions of pyrethroids seem to be more persistent in the environment and can affect non-targeted species such as beneficial insects, small invertebrates, and fish^{20,21}. The mechanism of action for both pyrethrins and pyrethroids involves a delay in the closure of sodium channels, causing neuronal dysfunction in the affected organisms¹⁹. Figure 1D displays the chemical structure of a pyrethroid molecule.

Triazines

Triazines are chemical compounds used in the petroleum industry, in the manufacture of resins such as melamine, and as a basis for formulating herbicides. The best-known herbicide within the triazine group is atrazine, whose chemical structure is shown in Figure 1E. Triazines are responsible for controlling broadleaf weeds in crops such as corn, sugar cane, sorghum, cotton, among other fruits²². The triazines, like the organochlorines, are considered POP. Therefore, they generate a risk of accumulation in the environment. The mechanism of action of triazines is based on preventing the photosynthesis process through competitive inhibition, displacing plastoquinone from its binding site in photosystem II, limiting the nutrient resources of the pest and causing oxidative stress^{23,24}.

Ecuadorian situation

In 2008, to guarantee the quality of life through food security, ensure quality products for use and consumption, and to protect the health of consumers, the Ecuadorian State decrees the creation of the Ecuadorian Agency for Regulation and Phyto and Zoosanitary Control (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, AGROCALIDAD)²⁵. This agency is assigned, among other functions, the design, implementation, and promotion of Good Agricultural Practices (GAP), which consist of a set of standards, principles, and technical recommendations applied to the entire food production chain considering social, economic, and environmental sustainability^{25,26}. The implementation of GAP in Ecuador is based on three main aspects: [1] Food safety, guaranteeing a product free of physical, chemical or biological hazards to the consumer; [2] Environmental care and management, especially from sources of water, soil, and beneficial species to the ecosystem; and [3] Job security, through training of farmers and operators on the use of personal protective equipment (PPE) to take care of their health, and the importance of their work to assure the health of their

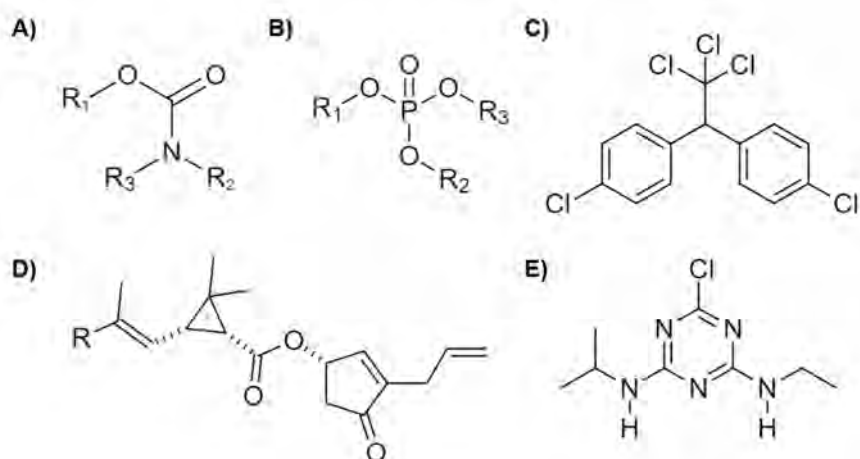


Figure 1. Chemical structure of the primary type of pesticides. A) carbamate, B) organophosphate functional group, C) DDT, an organochlorine pesticide, D) allethrin the first pyrethroid molecule to be synthesized, E) atrazine, a triazine pesticide. Figure created with ChemDraw.

family members and consumers²⁷. Until January 2020, there were 242 Agricultural Production Units (APU) certified with GAP in Ecuador²⁸.

One of the stages required to become certified with the GAP is to plan processes to protect crops through the implementation of an Integrated Pest Management (IPM) plan. An IPM plan must contemplate strategies for prevention, monitoring, evaluation, and intervention against pests²⁷. In the case that intervention is required to reduce pests' presence, the Ecuadorian normative recommends prioritizing physical, mechanical, biological, ethological, or genetic management. The use of agrochemicals should be used as a last resort, in cases of severe invasion, and according to the recommendations of a specialist²⁹. Nevertheless, the results of the Continuous Agricultural Surface and Production Survey (ESPAC) 2016, show that the Ecuadorian reality moves away from the standards set by the regulations. Under the multi-frame sampling methodology, this survey has allowed obtaining information related to the production area and land use at a national level.

A case study was carried out in which 24946 agricultural producers participated, to gather information about the use, management, and final disposal of pesticides and fertilizers. According to the National Institute of Statistics and Census (INEC) in 2016, 19% of the Ecuadorian surface area is for agricultural use, mainly for cultivated pastures (48%), permanent crops (31%), and temporary crops (21%)³⁰. Figure 2 shows a standard distribution of agricultural crops in the Andean region of Ecuador. Beyond the productive losses in crops associated with the 2016 earthquake in Ecuador, the invasion of pests represents one of the main enemies of the farmers and the quality of both permanent and transient crops, creating the need to use pest control methods. Thus, between 2014-2016 approximately 50% of permanent crops and 75% of transient crops used agricultural products of chemical origin (fertilizers and pesticides), from which at least 25% of the pesticides used are cataloged in a moderately to a hazardous range³⁰.

On the other hand, although the amount of pesticide products used in crops is alarming, the main problem is related



Figure 2. Agricultural area in Otavalo, Imbabura province, Ecuador.

to the agricultural practices carried out by the farmer producers. Proper management of pesticides at the time of storage, application, and final disposal could significantly reduce the risks and health effects on producers, consumers, and the ecosystem surrounding the crop, as well as an improvement in production costs and product yield. Nevertheless, it is estimated that only two out of ten farmer producers have been trained for the use and management of agrochemicals³⁰. Thus, in less than 4% of the cases studied, a specialized technician is in charge to apply the chemical products in the crops, in most of the cases the person in charge of the application is the same farmer (49%) or a laborer (34%)³⁰. Education level also seems to play a decisive role in the treatment that the producers provide to their crops since the higher the education level, the greater the number of people who have performed a soil analysis before cultivating, which is necessary to determine the nutritional and pest control needs. However, in general, more than 80% of farmer producers have never performed a soil analysis of their lands, which could affect the long-term fertility of the land, and consequently, the production yields³⁰.

The proper handling of the pesticide containers before final disposal can minimize risks of poisoning due to the use of pesticide residues or contamination in soils and water sources. According to FAO, a pesticide container management plan must include immediate decontamination after use, disabling of the containers so that they cannot be reused with perforations, and availability of certified collection centers that can safely manage the waste³¹. Ecuadorian regulations require that water-soluble pesticide containers through a triple wash process before final disposal for which they must be identified appropriately avoiding contamination of water sources, soil, or air. Therefore, as a general provision in Ecuador, empty containers of agrochemicals should not be incinerated, buried, or reused to store water or food³². Nevertheless, although eight out of ten people carry out the practice of triple washing to empty pesticide containers, approximately 17% of people pour the washing liquid into water sources or soil instead of the fumigation pump as established by national and international normative³⁰⁻³². The ESPAC survey has revealed that, once the pesticide containers have been used, the final disposal varies between burning (47%), rubbish (29%), management (16%), and buried (8%)³⁰. However, burning occurs almost entirely in an open environment; in the case of disposal, more than three quarters go to common garbage or directly to land fields, one-fifth of the managed containers are reused, and more than half of the buried containers are deposited in different unidentified places³⁰.

Another emerging problem related to the management of agrochemicals is the remaining presence of obsolete pesticides in the national market. An obsolete pesticide is considered to be any expired, adulterated, unregistered or banned substance that can no longer be used for the purpose for which they were made or that have more dangerous ecotoxicological characteristics than other existing pesticides³³. According to FAO, developing countries contain the most substantial amount of obsolete pesticides, which are not handled with the appropriate safety measures, creating a risk of environmental contamination and poisoning in surrounding populations. In Ecuador, in 2014, a comprehensive management plan for obsolete pesticides began, safely eliminating 16 tons of obsolete pesticides accumulated throughout the country³⁴. However, in 2017 a new inventory was made where 112.20 tons of toxic substances were found, indicating failures in the management of the institutions responsible for controlling these substances³³. A control measure established by national regulations

is to keep a record of the application of pesticides indicating information such as dates, names of the product, the active ingredient, dose applied, among other characteristics²⁹. Nevertheless, until 2008 a fifth of the agricultural producers were illiterate³⁵. Therefore, it must be taken into consideration that many farmers are not able to keep track of the application of agrochemicals in their crops and require the implementation of other strategies for capacitation.

Thus, the results of the ESPAC survey demonstrate the need to increase control in the management of pesticides nationwide. Furthermore, the regulations in force have a more direct application to agroindustry. However, they do not demonstrate alternatives for waste management that can be used by small farmers who work independently and whose socioeconomic level does not allow them to access the necessary information and supplies through the channels currently offered. Small farmers distribute their food locally, generally in neighboring sectors precisely where the population is most vulnerable to the risks caused by the mismanagement of agrochemicals.

Most used pesticides in Ecuador

In Ecuador, pesticides are generally classified by risk of hazard based on the classification criteria of the World Health Organization (WHO). This categorization includes four different classes I, II, III, and U. Each class represents a hazard level: extremely hazardous (Ia), highly hazardous (Ib), moderately hazardous (II), slightly hazardous (III), unlikely to present an acute hazard (U, sometimes referred to as IV)³⁶. According to INEC, until 2016, more than 50% of pesticides used in Ecuador belong to classes III and IV, while 30-40% vary between classes Ia, Ib, and II, a certain percentage of farmers are unaware of the type of pesticide they administer to their crops³⁰.

In 2015, Rivera carried out an analytical study about the registry of pesticides in Ecuador based on the information provided by AGROCALIDAD in 2014³⁷. A record of 411 active ingredients of fungicides, insecticides, and herbicides was found, for which there were 2,076 trade names³⁷. Table 1 shows information regarding the use, hazard classification, and type of pesticide of these registered products. The author states that there is a lack of standardization in the requirements to register a pesticide, which along with a large number of trade names, makes the identification more difficult for unskilled farmers to become familiar with the trade names rather than both the active ingredients and the relevant concentrations³⁷.

Furthermore, Table 1 shows that the most common crops that use a large number of pesticides are both those that represent export goods such as bananas and roses and those that are essential in the Ecuadorian basic food basket such as rice, potato, corn, sugar cane, and tomato. Carbofuran, alachlor, and methamidophos, pesticides used mainly in potato crops, have been banned more than five years ago in Ecuador, because of their demonstrated health risk. However, until 2016 some commercial products were still registered with the active ingredient of these pesticides³⁸. On the other hand, paraquat, used in rice, banana, cocoa, potato, corn and pineapple crops; glyphosate, used in bananas, sugar cane, beans and pineapple; and mancozeb, used in bananas and potatoes, possess active ingredients that are still found in more than a hundred commercial products registered in AGROCALIDAD according to information of 2016³⁸.

Health consequences associated with pesticides misuse in Ecuador

Although the increase in productivity associated with the use of pesticides is indisputable, their use has been highly

Type of pesticide	Number of registered trade names	Hazard classification		Most common crops for registered use
Fungicide	804	94	II	Banana, roses, potato, tomato, rice
		450	III	
		260	IV/U	
Insecticide	556	3	Ia	Roses, tomato, corn, potato, rice
		27	Ib	
		137	II	
		216	III	
		73	IV/U	
Herbicide	716	89	II	Rice, corn, sugarcane, African palm, banana
		396	III	
		231	IV/U	

Table 1. Use hazard classification and number of registered trade names for different types of pesticides in Ecuador until 2014. Source: Rivera³⁷.

questioned due to the possible adverse health effects of non-target living organisms. Some pesticides are incredibly toxic to humans and the ecosystem, so their use has been prohibited. However, pesticides may remain unnoticed in water and soil for a long time due to several factors such as persistence and composition⁸. The damage caused by pesticides can be acute or chronic according to the chemical composition of the pesticide, quantity, time of exposure, route of exposure, and many other factors. People who are more exposed to the harmful effects of pesticides are those in direct contact with the product and do not use adequate personal protective equipment during handling. Communities near crop areas also have a high risk of poisoning as well as the final consumer if there would be pesticide residues above the safe limits.

In 2012, according to the Center of Poison Information and Consulting (Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico CIATOX, Ecuador), approximately 1592 cases of pesticide-associated poisoning were registered, of which the highest number of cases were associated with five pesticides: paraquat (175), bromadiolone (174), glyphosate (153), cypermethrin (125) and carbofuran (104)³⁸. From this list, only carbofuran has been banned from the market. Nevertheless, some cases are treated with home remedies and go unnoticed for health center records.

The reactions produced by pesticides according to the time of exposure can vary between acute (short-term) and chronic (long-term). Acute poisoning can affect different organ systems like gastrointestinal (e.g., vomiting, diarrhea, constipation, abdominal cramping), respiratory (e.g., cough, airway irritation, rhinitis), or nervous (e.g., headache, profuse sweating, blurred vision)³⁹. On the other hand, the effects of chronic exposure do not always leave noticeable traces; they can appear from months to years after exposure and are associated with the development of different types of cancer, reproductive disorders, developmental abnormalities, and diseases associated with the nervous system³⁹.

Few studies in Ecuador focus on making obvious chronic health risks caused by exposure to pesticides. A study carried out in the province of Carchi, published in 2003 by researchers from the International Development Research Center (IDRC) - Canada, highlights the use of highly toxic but cheap pesticides such as carbofuran and methamidophos - now banned - in potato crops⁴⁰. Exposure to these pesticides is associated with genetic and reproductive disorders, skin diseases, and some types of cancer⁴⁰. On the other hand, in the city of Pedro Moncayo (Pichincha Province), another study showed the emergence of alterations in neurobehavioral performance in children who live near to flower farms when

Mother's Day is approaching, suggesting an association with the increased use of pesticides⁴¹. Researchers noted that the adverse effects tend to wear off over time, but further studies are required. This investigation was performed in children who do not work directly in the flower fields but who lived in neighboring communities or at least with one flower worker. At the same time, according to a study of the perception of risks to pesticides, populations bordering the banana sector in Machala showed to be affected by the disproportionate use of pesticides. Some of the workers blame the disregard and carelessness in the use of safety measures, also illegal use of airplanes for the irrigation of pesticides by large corporations put vulnerable groups and communities surrounding the sector at health risk⁴².

Thus, it can be observed that the lack of updated information makes it more challenging to obtain an authentic panorama of the effects produced by the indiscriminate use of pesticides in Ecuador. However, the few studies carried out to date give indications of the potential risk they represent in the agricultural population and its surroundings. It is necessary to coordinate efforts between the health, production, and scientific innovation sectors to improve the quality of life of vulnerable populations.

Remediation strategies

The use of pesticides has been persistent for the past decades. Although many of the products causing environmental and health damage have been banned, there are remnants in soils and water that possess a potential risk to the well-being of surrounding communities. This is why it is necessary to develop remediation technologies, to diminish the possible negative impact associated with pesticide residues. The proper application of remediation technologies can help to reduce, eliminate, isolate, or stabilize the contaminant. However, to choose a remediation strategy, several factors must be considered among them: characteristics of the place such as climatic conditions and other present pollutants, type of contamination (point or diffuse), concentration, and type of pesticide⁴³. Figure 3 shows the different physical, chemical, and biological processes that can be applied for the remediation of soils and bodies of water contaminated with pesticides. These processes are described in greater depth by Morillo and Villaverde⁴³.

A significant limitation of the remediation strategies is the variety of abiotic factors on *the field* that prevents standardized procedures, most investigations have been carried out at laboratory level and for a large-scale application would require significant investments⁴³. Bioremediation technologies show

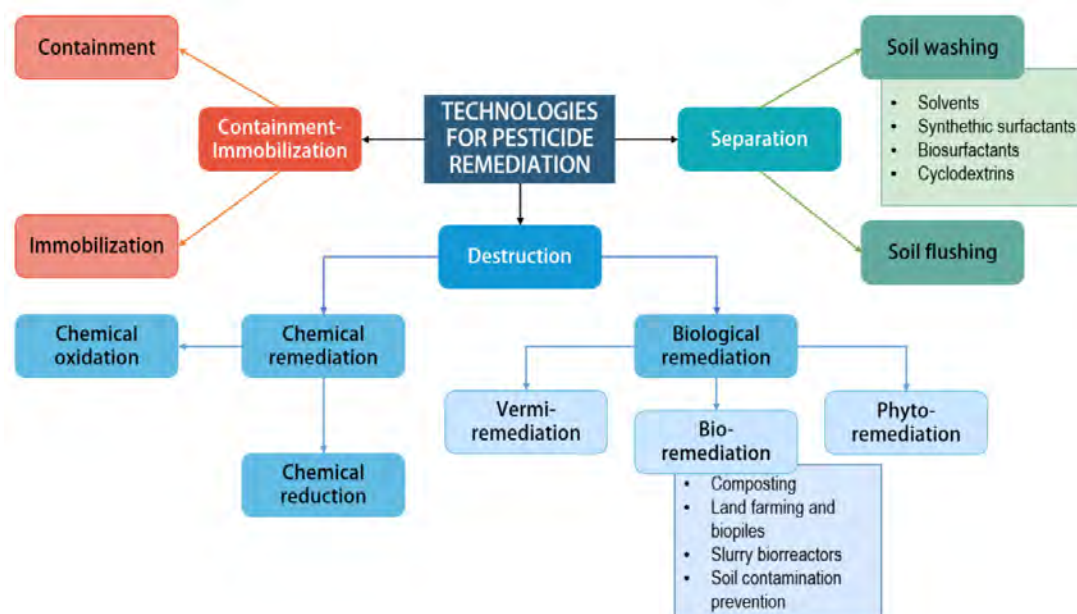


Figure 3. Physical, chemical, and biological technologies for pesticide remediation. Source: Morillo and Villaverde⁴³.

to be a relatively low-cost alternative in comparison with the other processes, and its implementation can be immediate. Nevertheless, bioremediation may imply observation of long-term results only, as well as the difficulty of predicting the outcome of the introduction of foreign organisms⁴³. In Ecuador, there are still very few studies related to remediation against contamination caused by agrochemicals, most of them seek to develop bioremediation strategies through the study of organisms with the potential to degrade pesticides at harmful concentrations⁴⁴⁻⁴⁷.

Conclusions

The use of pesticides in Ecuador has increased due to the need to satisfy local food needs, as well as to improve export goods to foreign markets. However, despite the benefits associated with the use of these agrochemicals, exposure to certain pesticides has created a risk to human and environmental health that is often disregarded over the necessity to generate economic profits. Ecuador lacks relevant regulations that allow all the actors involved to take adequate management measures. Although there are programs for the implementation of Good Agricultural Practices GAP, they ignore the reality of many small farmers who lack the training and knowledge for its proper and safe handling. In turn, this problem is accentuated by a disorganized registry of pesticides in the country, the prevalence of obsolete pesticides in the market, and the lack of control in the agroindustry over its environmental responsibility and the management of pesticides in vulnerable populations.

National policies should focus on strengthening information channels that guide the small farmers to become aware of the importance of environmental conservation, personal protection equipment, and health risks that may be implied by the misuse of pesticides. Although globally, most of the remediation strategies are still in development stages, the great diversity in both flora and fauna in Ecuador represents an excellent opportunity for the discovery of organisms with bioremediation potential. For this reason, the scientific academy plays an essential role in the development of new biotechnological tools for seed selection, use of natural resources, pest control, and the growth

of the agro-industrial sector. However, to achieve these goals, it is necessary to create public policies that link science and innovation from the smallest levels of production.

Bibliographic references

1. Brussaard L, de Ruiter PC, Brown GG. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric Ecosyst Environ.* 2007;121(3):233-44.
2. FAO. International Year of Plant Health, 2020: Communication guide [Internet]. Rome; 2019. Available from: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA7186EN>
3. Rasmussen WD, William A. Origins of agriculture. In: *Encyclopædia Britannica* [Internet]. Encyclopædia Britannica, inc.; 2019. Available from: <https://www.britannica.com/topic/agriculture>
4. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol.* 2009;2(1):1-12.
5. Cooper J, Dobson H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 2007;26:1337-48.
6. Gianessi LP. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Manag Sci.* 2013;69(10):1099-105.
7. Braconi D, Bernardini G, Santucci A. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *J Proteomics* [Internet]. 2016;137:19-34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
8. WHO. Children's Health and the Environment [Internet]. 2008. p. 62. Available from: <https://www.who.int/ceh/capacity/Pesticides.pdf>
9. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect.* 1990;87:245-54.
10. Tiwari B, Kharwar S, Tiwari DN. Pesticides and Rice Agriculture. In: *Cyanobacteria* [Internet]. Varanasi: Elsevier Inc.; 2019. p. 303-25. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00015-5>
11. Vale A, Lotti M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. In: Lotti M, Bleecker ML, editors. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. 1st ed. Elsevier B.V.; 2015. p. 149-68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X>
12. Roberts JR, Reigart RJ. N-Methyl Carbamate Insecticides. In: *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. Sixth. Washington DC: EPA; 2013. p. 56-62.
13. Roberts JR, Reigart JR. *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. Sixth. Washington DC: EPA; 2013. 272 p.

14. Hurtado Clavijo CM, Gutiérrez de Salazar M. Organophosphorates: acute intoxication practical issues. *Rev la Fac Med* [Internet]. 2005 [cited 2020 Mar 10];53(4):244-58. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
15. Blus LJ. Organochlorine pesticides. In: *Handbook of Ecotoxicology*, Second Edition. Carbondale; 2002. p. 313-39.
16. Coats JR. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*. 1990;87:255-62.
17. Van Den Berg H, Manuweera G, Konradsen F. Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases. *Malar J*. 2017;16(1):1-8.
18. Atkinson BL, Blackman AJ, Faber H. The Degradation of the Natural Pyrethrins in Crop Storage. *J Agric Food Chem*. 2004;52(2):280-7.
19. Valentine WM. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* [Internet]. 1990;20(2):375-82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50031-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50031-5)
20. Metcalf RL, Hotowitz AR. Insect Control, 1. Fundamentals. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH; 2014. p. 23.
21. Thatheyus AJ, Gnana Selvam AD. Synthetic Pyrethroids: Toxicity and Biodegradation. *Appl Ecol Environ Sci*. 2013;1(3):33-6.
22. Lebaron HM, Mcfarland JE. The Triazine Herbicides: A Milestone in the Development of Weed Control Technology. *Agriculture*. 1952;2016:1-12.
23. Trebst A. The Mode of Action of Triazine Herbicides in Plants. *Triazine Herbic*. 2008;101-10.
24. Klementova S, Keltnerova L. Triazine Herbicides in the Environment. In: *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*. Ceske Budějovice; 2015. p. 71-89.
25. Agrocalidad. Creación [Internet]. 2008. Available from: <http://web.agrocalidad.gob.ec/creacion/>
26. FAO. A scheme and training manual on good agricultural practices (GAP) for fruits and vegetables [Internet]. Bangkok; 2016. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i6677e.pdf>
27. Agrocalidad. Buenas Prácticas Agrícolas -BPA. Quito; p. 24.
28. Agrocalidad. AGROCALIDAD TRABAJA EN LA IMPLEMENTACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS AGROPECUARIAS A ESCALA NACIONAL [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 7]. Available from: <https://www.agricultura.gob.ec/agrocalidad-trabaja-en-la-implementacion-de-buenas-practicas-agropecuarias-a-escala-nacional/>
29. Agrocalidad. Buenas Prácticas Agrícolas para Hortalizas y Verduras [Internet]. Quito; 2015. p. 68. Available from: <http://web.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/Guía-de-BPA-para-hortalizas-y-verduras.pdf>
30. INEC. Información Ambiental en la Agricultura 2016 [Internet]. 2016. Available from: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf
31. WHO, FAO. Código Internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas. Directrices sobre opciones de manejo de envases vacíos de plaguicidas. [Internet]. Rome; 2008. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/SP_Advertisingfinal10.pdf
32. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Pesticides and related products used in Agriculture. Handling and Disposal of empty treated with Triple Wash. Requirements [Internet]. Ecuador Ecuador; 2013 p. 1-19. Available from: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/05/NTE-INEC-2634-Plasticos-post-consumo.pdf>
33. Agrocalidad. ACTUALIZACIÓN DEL INVENTARIO NACIONAL DE PLAGUICIDAS OBSOLETOS [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 10]. Available from: <http://web.agrocalidad.gob.ec/actualizacion-del-inventario-nacional-de-plaguicidas-obsoletos/>
34. FAO. Prevention and Disposal of Obsolete Pesticides [Internet]. [cited 2020 Feb 10]. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/crops/obsolete-pesticides/presentacion/es/>
35. INEC. Estructura del sector agropecuario, según el enfoque de las características del productor agropecuario y de las unidades de producción agropecuaria. Quito; 2008.
36. WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition [Internet]. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data "World Health Organization." 2020. 1-92 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332193/9789240005662-eng.pdf?ua=1>
37. Rivera S. El Registro de Plaguicidas en el Ecuador. Un estudio desde la perspectiva de la agroecología [Internet]. Universidad Politécnica Salesiana; 2015. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9021/1/UPS-QT06808.pdf>
38. Naranjo A. La otra guerra: La situación de los plaguicidas en el Ecuador [Internet]. Maldonado A, Chérrez C, Bravo E, editors. Quito; 2017. 141 p. Available from: http://www.swissaid.org.ec/sites/default/files/images/plaguicidas_web.pdf
39. Thundiyil J, Stober J, Besbelli N, Pronczuk J. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bull World Health Organ*. 2008;86(3):205-9.
40. Dale S. Preventing pesticide poisonings in Ecuador. *Int Dev Res Cent* [Internet]. 2003;4. Available from: <https://www.idrc.ca/sites/default/files/sp/Documents/EN/preventing-pesticide-poisonings-in-ecuador.pdf>
41. Suarez-Lopez JR, Checkoway H, Jacobs DR, Al-Delaimy WK, Gahagan S. Potential short-term neurobehavioral alterations in children associated with a peak pesticide spray season: The Mother's Day flower harvest in Ecuador. *Neurotoxicology* [Internet]. 2017;60:125-33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.002>
42. Brisbois B. Bananas, pesticides and health in southwestern Ecuador: A scalar narrative approach to targeting public health responses. *Soc Sci Med* [Internet]. 2016;150(January 2016):184-91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.socscimed.2015.12.026>
43. Morillo E, Villaverde J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;586:576-97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
44. Abad Y. CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS BIORREMIEDIADORES DE SUELOS CONTAMINADOS POR AGROQUÍMICOS EN LA PROVINCIA DE LOJA. [Internet]. Universidad de Cuenca; 2013. Available from: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26974/1/TESIS_YURI.pdf
45. Maldonado L. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE UN INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO EN MUESTRAS DE SUELO DE CULTIVO DE PAPA MEDIANTE *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [Internet]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito; 2017. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13678/1/UPS-QT11512.pdf>
46. Pérez M. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA Y ACCIÓN DE BIORREMEDIACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN SUELOS CON RESIDUOS DE PESTICIDAS DE LA FLORÍCOLA PENCAFLOR [Internet]. Universidad de las Américas; 2014. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2272/1/UDLA-EC-TIAM-2014-03.pdf>
47. Paredes M. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE UN INSECTICIDA CARBAMATO EN MUESTRA DE SUELO DE CULTIVO DE PAPA, MEDIANTE *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [Internet]. Tesis. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito; 2017. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13842/1/UPS-QT11514.pdf>

Received: 7 July 2020

Accepted: 10 ago 2020

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Antiviral and healing potential of *Sambucus nigra* extracts

Michalina Bartak¹, Agata Lange², Anna Stońska¹, Joanna Cymerys¹

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.18

Abstract: Nowadays, the application of alternative methods instead of clinical treatment creates a new possibility to prevent the development of diseases. Medicinal plants such as *Sambucus nigra* have been well known due to their extraordinary properties. The similarity to synthetic substances makes it potentially dependable; however, a high concentration of cyanogenic glycosides may exert detrimental consequences. It has been documented that *Sambucus nigra* extracts are used against both human and animal viruses, like influenza A and B viruses, human immunodeficiency virus (HIV), dengue virus (DENV-2), human herpesvirus type 1 (HSV-1) and human coronavirus NL63 (HCoV-NL63). Such reports are notably valuable especially considering the widespread usage of commercial drugs, which could be ineffective. This review provides insight on recent research on the health properties of plant *Sambucus nigra* as an antiviral medication that may help propose new therapy.

KeyWords: *Sambucus nigra*, extracts, antiviral, healing.

Introduction

One of the fundamental issues of general biology and present knowledge of the philosophy of nature is the problem of demarcation of nonliving and living matter. The definition of viruses is similar - they can be categorized as a connection between *mortuus et vivus materia*¹.

Coping with viral diseases using commercial drugs is difficult. They penetrate living cells and alter their metabolism using specific enzymes. It creates a possibility to replicate. The majority of synthetic drugs is precisely directed against the replication process. The main difficulty of antiviral cure is a high potential of getting synthetic substances resistance.

What is more, our knowledge of healing with antiviral drugs is not up to the standard level yet. As a result, finding alternative treatment methods became common². Using plants as medicine have long been known³. Nowadays, there is a widespread increase in using natural pharmaceuticals, which is defined as a less expensive source of healing⁴. Worldwide estimates prove that 70-80% of people rely on natural medicine because of its sufficient actions in healthcare. However, the topic of plant medicine is not flawless. Sometimes it may come from access to plants' material, including proper living conditions and some other dependencies⁵.

This study is aimed to better understand the health properties of plant *Sambucus nigra* as an antiviral medication that may help propose new therapy.

Sambuca nigra

Sambucus nigra L. is a part of *Adoxaceae* family (following *Integrated Taxonomic Information System*)⁶ in the northern hemisphere, especially in Europe, Northern America, and Western Asia^{7,8}. There are three subspecies of *Sambucus nigra* L.: *S. nigra* L. ssp. *nigra*, *S. nigra* L. ssp. *canadensis*, *S. nigra* L. ssp. *Cerulean*⁹.

Sambucus nigra is a 7- 10 meters high bush or rarely a small tree with a small white flower gathered in cyme (Figure. 1)⁷. The flowering season falls in June and July, but it usually happens in its third or fourth year. The leaves with total length in 30 cm are accumulated in 5-7 pair¹⁰. Both flowers and leaves (during rubbing) have a specific aroma, which can be found as an unpleasant¹¹. The elders' fruits are firstly green and

elongated, but during ripening, they become roundish black and shiny berrylike drupes. Each drupe contains 3-5 seeds inside. The seeds' maturation is connected with the mean October temperature, which is required to be approximately 7°C¹².

Black elder prefers soil based on nitrogen and calcium compounds. Despite its predilection for alkaline soil, it is also able to grow on a different type of soil even with a pH ranging between 4,2 and 8,0^{10,12}.

Constituents

Sambucus nigra's chemical composition is associated with plenty of factors - climate and manner of agriculture alike¹². Both extracts from fruits and flowers have shown a high possibility of reducing viral infections symptoms¹³.

Crucial constituents of black elder are RIPs (ribosomal inactivating proteins), which (beside lectins) are part of *S. nigra* agglutinins (SNAs). RIPs found in *S. nigra* fruits aim for specific cells or substances which many pathogens bind. They show higher potential than RIPs from other plants. Other antiviral substances present in black elders are peptic polysaccharides through their availability to activate Macrophages¹³. The main substances are present in Table 1.

Flowers

The flowers' extract is full of bioactive flavonoids and phenolic acids¹⁴. Through the Schmitzer *et al.* study¹¹, there were identified major flavonoids: flavonol glycosides rutin, kaempferol-3-rutinoside, and isorhamnetin-3-rutinoside.

Listed substances constitute 90% of total flavonoid concentration in elderflowers. In the case of phenolic acids, 70% of them were 5-caffeoylquinnic acid and 1,5-di-caffeoylquinnic. Using products from the black elder as medicine is supported by its electrochemical activity, which comparable to 21g ascorbic acid per kg dry flowers¹¹.

Fruits

The main products from black elders show the same properties, such as ones used in medical aid. Most of them are anthocyanins that are known for their health-related features,

¹ Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland.

² Department of Nanobiotechnology and Experimental Ecology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland.



Figure 1. *Sambucus nigra* – flowers, berries, and leaves (Source: Amedee Masclef – Atlas des Plantes de France, 1891).

Substance	Examples	References
Anthocyanins	cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-sambubioside	11,14
Vitamins	vitamin A-group, B-group, vitamin C, tocopherol	14
Sugars	glucose, fructose	11,14
Flavonoids	quercetin-3-rutinoside (rutin), quercetin-3-glucoside (isoquercitrin), kaempferol-3-rutinoside, isorhamnetin-3-rutinoside, isorhamnetin-3-glucoside	11,14, 17
Organic acids	quinic acid-containing caffeic, p-coumaric acid moieties, citric and malic acids	11

Table 1. The most abundant substances in *Sambucus nigra* (Source: as listed in table).

including antiviral and antibacterial activity, reducing oxidative stress and, as a result – free radicals. Among anthocyanins, cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-sambubioside were identified. *S. nigra* fruits consist of different variety of sugars with a total content from 68.53 to 104.16 g per kg fresh weight. The central part of this group is occupied by glucose and fructose. Furthermore, organic acids, such as citric and malic acid, are also established in berries. Their concentration in *S. nigra* berries has been observed six times higher than in apples¹¹.

Application of *Sambucus nigra*

There are plenty of purposes of using *S. nigra* even in everyday life, beginning in nutrition. The extracts from fruits are standard in the production of juice, jellies, or wine. However, there are a lot of other properties used in medicine (Figure. 2). Tea from fruits is intended for the treatment of colds and its' symptoms such as high temperature¹¹. Abundant in tannins and polyphenols extracted from the *S. nigra* shows antioxidant properties, resistance to U.V. radiation, and high biological

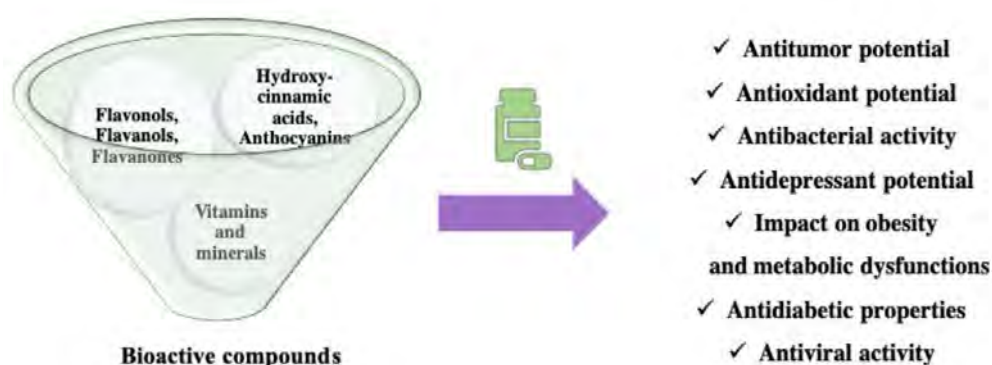


Figure 2. The bioactive compounds found in elderberry (own work based on 9).

activity, which can be a base of users in cosmetology^{15,16}.

What is more, the blackberries are valued in folk medicine. The infusion of blossom is popular for diaphoretic and diuretic properties^{7,8,17}. The black elder is associated with the immune system; it modules the production of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α ^{15,18}.

S. nigra extracts are also useful in healing diabetics or obesity. It is related to glucose metabolism in the human organism and insulin uptake. Additionally, *S. nigra* decreases cholesterol and lipids levels which may cause a weight loss^{13,19}.

Disadvantages of usage *Sambucus nigra*

As we mentioned in the introduction, using plant extract can have disadvantages. The main disadvantage in the case of *S. nigra* is the risk of allergenicity. That effect is due to the high amount of cyanogenic glycosides (CGG), which are present in all parts of *S. nigra*. Among them, sambunigrin and prunasin occur the most frequently (Fig. 3). The content of cyanogenic compounds might have health consequences manifested in poisoning¹². The mechanism of cyanide's toxicity relies on inhibition of oxidative phosphorylation caused by cytochrome oxidase, which stops electron transport. As a result, adenosine triphosphate (ATP) synthesis cannot proceed, and cellular respiration has to be halted²⁰.

Cyanogenic glycosides may be harmful to animals and humans when implemented between 0,5 and 3,5 mg per kg body weight. It is also known that there exists a possibility to reduce the high level of cyanide during boiling, fermentation, and drying. Despite processing methods that cause a decrease of the cyanide, the human body can only detoxicate it when the low level is present²⁰.

What is more, Forster-Waldl *et al.*²¹ in clinical trials showed detection of a protein of 33.2 kDa by IgE in patients' sera. That is why *S. nigra* is supposed to contain the allergen Sam n1 which is a representative of RIP (ribosomal inactivating protein)²¹.

Summarizing, excessive ingestion of black elders may result in the digestive system's diseases such as vomiting and diarrhea^{13,22}. The solution to the toxicity problem of the black elder is appropriate preparation, which may minimize its harmful effects¹³.

Antiviral properties of *Sambucus nigra* extracts

As we described in the introduction, the history of usage of plant extracts is well known. The therapeutic use of plants as a remedy is dated back to 5000 B.C⁵. Nowadays, a significant amount of *S. nigra* extracts are adopted as homeopathy medicines as well as pharmaceuticals. It is embedded in Slavic and European countries' culture and history^{23,24}. There are many documented examples of therapeutic use on several human and animal viruses²⁵.

Influenza virus

Influenza viruses, the members of the *Orthomyxoviridae* family, are enveloped negative-strand RNA viruses with segmented genomes containing seven to eight gene segments. They are divided into three types (A, B, and C), which differ in host range and pathogenicity. Influenza A infects a wide variety of hosts, including birds, swine, horses, humans, and other mammals, and it causes a seasonal epidemic. In humans, the virus causes an acute respiratory disease characterized by the sudden onset of high fever, cough, headache, and inflammation of the upper respiratory tract²⁶. Influenza A is classified

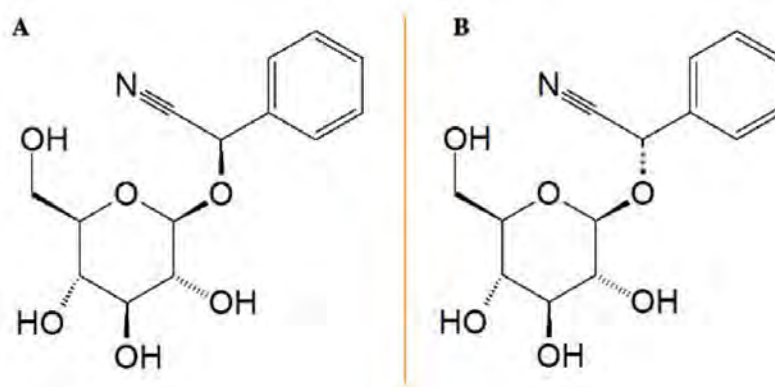


Figure 3. (A) Chemical structure of Prunasin [(R)-Prunasin], and (B) Sambunigrin [(S)-Prunasin] own elaboration based on PubChem. (Source: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sambunigrin#section=2D-Structure>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prunasin#section=Structures>).

based on surface glycoproteins: hemagglutinin (H.A.), which binds to host cell sialic acid conjugated glycoproteins and neuraminidase (N.A.), essential for viral release and propagation. There are 16 types of hemagglutinin (H1-H16) and nine types of neuraminidase (N1-N9)²⁷.

Even though *S. nigra* extract has already been used repeatedly for treating colds and influenza, the antiviral mechanisms of the elderberry extract are still under investigation^{28,29,30,31}. The clinical study presented by Kong²⁸ showed that administration of the elderberry extract to patients presenting flu symptoms significantly relieve influenza-like symptoms within 24 hours from the administration of the first dose. According to recent studies, it can be assumed that flavonoids in elderberry can inhibit the H1N1 influenza virus infection in vitro by binding to the surface of the virus²⁸. *S. nigra* constituents cause the deactivation of hemagglutinin and thus prevent the virus from entering and replicating in the host cell. The flavonoids in elderberry can also bind to neuraminidase and cause its inactivation; however, confirmation of this hypothesis requires additional research²⁸.

In a recent paper, Ulbericht *et al.*²⁵, provides the Natural Standard Evidence-Based Validated Grading Rationale™ of the clinical bottom line of *S. nigra*. The grading scale presents levels from A (strong scientific evidence) to F (strong contrary scientific evidence). Clinical trials on the impact of *S. nigra* for influenza virus have proven an excellent scientific basis for the use of *S. nigra* extracts to combat the disease caused by the virus, classifying it on level B (based on the criteria)²⁵.

In monography *S. nigra* by Throne Research (Biotech & Pharma; USA)⁹, authors provided the example of Zakay-Rones³¹ research, in which two randomized, placebo-controlled, double-blind studies, demonstrated the extract (Sambucol) that effectively inhibited influenza A and B strains after 48 hours post-infection symptoms. In the earlier study, 27 individuals experiencing common early flu symptoms were given Sambucol or placebo daily for three days – 2 tablespoons (children) or four tablespoons (adults). Patients were followed for six days, and symptoms were monitored. Serum from all subjects was analyzed for antibodies to influenza type A and B at the initial dose and during the convalescent phase. In the treatment group, significant improvement in flu symptoms was observed in 93.3 percent of subjects within two days after initial dosing, while 91.7 percent of the control group demonstrated improvement after six days. A complete resolution was achieved in the treatment group in 90 percent of patients after 2-3 days, while the placebo group yielded similar results after six days. Of these 27 patients, 23 had laboratory confirmation of influenza type B³¹. The mechanism is believed to be rendering viruses nonfunctional by staining and coating them. According to a review, *in vitro* as well as animal research reported that elderberry fruit (*Sambucci fructus*) affected influenza, other viral infections, and increased antibody titers³⁰.

Other studies have proved that elderberry extract may affect the immune system by enhancing the production of cytokines by monocytes^{32,33,34}. Torabian *et al.*³⁵, in their recent research, indicated that the immunomodulatory property of elderberry extracts manifested by increased expression of IL-6, IL-8, and TNF³⁵.

S. nigra has also inhibiting properties against avian influenza virus H9N2. Research presented by Karimi *et al.*³⁶ showed antiviral properties of the mixture of *Echinacea* and elderberry extract on the avian influenza virus. The extracts tested caused a reduction of the load of the virus and thus could be used as a valuable aid to control avian influenza in poultry fields³⁶.

In conclusion, elderberry extract shows multiple modes of therapeutic action against influenza infection, mainly by suppressing viral entry, affecting the post-infection phase, and viral transmission from cell to cell. Further research is still needed to define the antiviral activity of each of the active ingredients contained in the *S. nigra*. Only then will the treatment be fully effective¹³.

Human immunodeficiency virus

Human immunodeficiency virus (HIV) belongs to the *Lentivirus* genus of the family of *Retroviridae*. The genome of the virus is composed of two copies of positive-sense single-stranded RNA that codes for the nine genes, including the reverse transcriptase. HIV infects a variety of immune cells such as CD4+ T cells, macrophages, and dendritic cells and causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)³⁷.

Recent studies indicate that the elderberry extract also has activity against HIV, and it can effectively block the ability of HIV virions to infect host cells^{37,38}. Antiviral effectiveness show flavonoids and A-type proanthocyanidins (PACs) contained in *S. nigra* extract. These compounds bind to viral envelope glycoproteins, likely to the gp120, and block HIV entry into and infection of host cells likely through the CD4/CCR5 receptor system³⁹.

Interestingly in other cases, after application of the boiled extract of Sambucol (with Glucosamine sulfate, chondroitin, and commercial product-Thymate), a decrease of viral particles was observed from 39,000 particles/mL to an undetectable amount in ten days after the administration of a mixture⁹. Moreover, *S. nigra* extract (Sambucol) was tested for the potential to inhibit the infectivity of HIV isolates in CD4+ cell lines, peripheral blood lymphocytes, and laboratory HIV strains. *S. nigra* extract, prepared in two different dilutions, was incubated with the virus before adding to cells. A significant decrease in virus infectivity was observed, and no virus load could be detected after four- or nine-days post-incubation⁴⁰. Other studies show that the combination of elderberry extract and thymus extract has reduced the viral load in HIV patients. Unfortunately, studies do not sufficiently confirm the effect of this treatment method⁹.

The identified compounds of elderberry extract, mainly flavonoids, which inhibit HIV infection⁴¹, could be a new therapeutic target for HIV-1/AIDS, which shows promise for co-therapy uses with existing HIV-1 antiviral agents.

Herpes simplex type 1

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the member of the *Alphaherpesviridae* subfamily, causes a contagious infection that affects approximately 1/3 population of the world population⁴². HSV-1 has a double-stranded linear DNA genome that is approximately 152 kbp in length, and it is an etiological agent of orofacial blisters, keratitis, pneumonia, or encephalitis. Following primary infection in the mucosal epithelia, virions migrate to the trigeminal ganglion neurons, where the latent infection is established.

The influence of Sambucol against HSV-1 was examined in the cell line of human diploid fibroblasts. In their research, Morag *et al.*⁴² have used four HSV-1 strains – a reference strain, two acyclovir-resistant strains, and a strain isolated from a patient. Complete inhibition of viral replication was observed in all utilized strains, whether the cells were pre-incubated with the extract, simultaneously incubated with extract, or the extract was added 30 minutes after viral adsorption to cells. The complete inhibition of four strains of HSV-1 *in vitro* by

elderberry extract warrants further clinical trials in humans⁴². A formula of *S. nigra* (flower extract) in combination with *Hypericum perforatum* and *Saponaria officinalis* was also found to inhibit the replication of HSV-1 *in vitro*²⁹. Among the described flavonoids of *S. nigra*, the kaempferol and quercetin show the most promising activity against HSV-1⁴³.

Dengue virus

Another virus that is claimed to be cured with *S. nigra* extract is the dengue virus. Dengue virus (DENV) is a single positive-stranded RNA virus, which belongs to the family *Flaviviridae* and genus *Flavivirus*. DENV is a mosquito-borne, and it causes a wide range of clinical manifestations, from mild fever to potentially fatal dengue shock syndrome⁴⁴. Effective anti-dengue therapeutic drugs, as well as protective vaccines, have still not been developed⁴⁵.

The antiviral effect of various flavonoids obtained from various plants on the dengue virus has already been repeatedly confirmed^{46,47,48}. *S. nigra* methanolic extracts apart from flavonoids also contain alkaloids and small amounts of coumarins which exhibit anti-DENV-2 activity. In their research, Castillo-Maldonado *et al.*⁴⁵, revealed that methanolic extracts of leaves and flowers of *S. nigra* have anti-DENV-2 properties when added to Vero and BHK-21 cell lines. The best results were obtained when DENV-2 was pre-incubated with the extracts for 1 hour and then added to the cell cultures. They additionally confirmed this result by analyzing the synthesis of NS-1 and the extent of intracellular DENV-2⁴⁵.

Human coronavirus NL63

Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) is one of the common HCoVs species that occur worldwide. HCoV-NL63 belongs to the genus of *Alphacoronavirus* in the *Coronaviridae* family. The viral genome is positive-sense, single-stranded RNA. HCoV-NL63 infects the upper respiratory tract causing runny nose, cough, and sore throat and also infects the lower respiratory tract (pneumonia, bronchiolitis). Considering this, HCoV-NL63 is a significant pathogen, which is an etiological factor of mild and severe respiratory diseases and even acute undifferentiated febrile illness (AUFI). Preclinical studies by Weng *et al.*⁴⁹ show promising results by demonstrating that elderberry ethanol extract inhibits replication and attachment of HCoV-NL63. Researchers investigated that among phenolic acid constituents in plant ethanol stem extract (chlorogenic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid) caffeic acid in *Sambucus spp.* inhibits replication and attachment in human airway epithelial cells. Other phenolic acid components that showed prominent antiviral action was chlorogenic acid and gallic acid⁴⁹. More importantly, caffeic acid affects the binding of HCoV-NL63 to co-receptors (such as heparan sulfate proteoglycans) and the receptor (ACE2), the same that novel pathogenic SARS-coronavirus 2 utilizes^{49,50}. SARS-CoV-2 appeared in 2019 in Wuhan, China.

In contrast to several members of the coronaviruses that continuously circulate in the human population, SARS-CoV-2 has very high infectivity and causes the severe acute respiratory syndrome. Recent research indicates that SARS-CoV-2 also uses the ACE2 receptor to enter cell⁵¹. It is worth noting that unraveling which viruses use cellular factors during the replication cycle, including entry, can be used in antiviral therapy. Currently, there is no effective vaccination or therapy that could be used to treat COVID-19. For that reason, the finding presented by Weng *et al.* could help develop antivirals against human coronaviruses.

Infectious bronchitis virus

Infectious bronchitis virus (IBV) is of the species avian *Coronavirus*, which belongs to the family *Coronaviridae*. The viral genome is positive-sense single-stranded RNA⁵². IBV infects the respiratory tract of chickens and causes the deformation of produced eggshell, thus causing economic losses to the poultry industry⁵³. Due to the highly recombinant nature of the virus, current vaccination strategies are not sufficient against new infections, and for that reason, new methods defending against IBV are needed. In their work, Chen *et al.*⁵⁴ investigated the influence of three plant species: *Rhodiola rosea*, *Nigella sativa*, and *Sambucus nigra* on avian IBV replication. Among these plants, *S. nigra* presented the best results of inhibition in the early step of the infection cycle. More precisely, the results from these experiments revealed that combining pre-V (the only virus was treated before infection) treatment with post-treatment worked together to inhibit IBV replication fully. The pre-C (only cells were treated with extract before infection) treatment was not necessary for full virus inhibition, nor did it impact the viral load of the supernatant. However, it did work synergistically with pre-V treatment to reduce viral load in the cells an additional three orders of magnitude, as compared to pre-V treatment alone. Probably, the bioactive compounds are lectins (Elder bark agglutinin I (SNA-I), Elder bark agglutinin II (SNA-II), *Sambucus nigra* agglutinin-III (SNA-III)), from *Sambucus nigra* that could bind directly to viral proteins and inhibit infection. What is more, authors suspect that two flavonols isolated from *Sambucus nigra* fruits (same, which affect influenza: 5,7,3',4'-tetra-O-methylquercetin and 5,7-dihydroxy-4-oxo-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl-3,4,5 trihydroxycyclohexanecarboxylate⁵⁵) could also have an inhibitory impact on IBV replication⁵⁴.

Conclusions

Ancient knowledge of the antimicrobial properties of various plants' extracts provides an authoritative source for new antiviral drugs, which can be successfully used instead of synthetic medicine. Because of its chemical composition, *S. nigra* is a plant that finds its contribution in widespread use. *S. nigra* is rich in phenolic acids, flavonoids, catechins, and proanthocyanidins, and these compounds in addition to antiviral properties, they also show anti-cancer, immune-stimulating, antibacterial activity, antioxidant and antidepressant potential. The increasing resistance of viruses to commonly used drugs forces the development of new therapeutic methods that are not based on synthetic chemical compounds. In the present review, we provided insight on recent research on the health properties of plant *S. nigra* is an antiviral medication that may help propose new therapy.

The search for new antiviral therapies is especially important nowadays when humanity is struggling with the SARS-CoV-2 pandemic. Both influenza virus and Sars-CoV-2 have an RNA genome and cause respiratory disease. Moreover, there is preclinical research showing that *S. nigra* inhibits replication and viral attachment of Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), which similar to SARS-CoV-2, belongs to the coronavirus family⁴⁹. Among the above examples of antiviral applications, most reports refer to the use of *S. nigra* extracts in the treatment of diseases caused by the influenza A and B viruses. This is probably related to the high variability of influenza virus, as a result of which the flu vaccine is reformulated each season for a few specific influenza strains and is usually effective against three or four types of influenza acti-

vity in the world during that season. Based on evidence that *S. nigra* could be used in the treatment of influenza, it is tempting to speculate that it could also be applicable in the treatment of COVID-19. However, this hypothesis requires thorough research and confirmation.

The antiviral effect of *S. nigra* has also been documented against herpes simplex virus, human immunodeficiency virus, dengue virus, or infectious bronchitis virus. The possibility of full-value application of extracts *S. nigra* is not currently used. Despite this, it is worth noting that it has excellent potential for antiviral use due to its good tolerability and low extraction costs in contrast to synthetic drugs.

Conflict of interest

No conflict of interest is declared.

Bibliographic references

- Ślaga SW. Odrębność Żywej Materii Na Przykładzie Wirusów. Roczniki Filozoficzne, Filozofia Przyrody 1963; 87-108.
- Sohail MN, Rasul F, Karim A, Kanwal U, Attitalla IH. Plant as a source of Natural Antiviral Agents. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 2011;6(12):1125-1152.
- Sornpet B, Potha T, Tragoolpua Y, Pringproa K. Antiviral activity of five Asian medicinal plant crude extracts against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2017;10(9):871-876.
- Hafidh RR, Abdulmir AS, Jahanshahi F, Abas F, Abu Bakar F, Sekawi Z. Asia is the Mine of Natural Antiviral Products for Public Health. The Open Complementary Medicine Journal 2009;1:58-68.
- Pushpa R, Nishant R, Navin K, Pankaj G. Antiviral Potential of Medicinal Plants: An Overview. International Research Journal of Pharmacy 2013;4(6):8-16.
- Retrieved [June 3, 2020], from the Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov>. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=525081#null
- Novak FA. Wielki Atlas Roślin. Polskie wydawnictwo rolnicze i leśne. Warszawa, 1979;394-395
- Tundis R, Ursino C, Bonesi M, Loizzo MR, Sicari V, Pellicano T, Manfredi IL, Figoli A, Cassano A. Flower and Leaf Extracts of *Sambucus nigra* L. Application of Membrane Processes to Obtain Fractions with Antioxidant and Antityrosinase Properties. Membranes 2019;9:127.
- Monography' *Sambucus nigra* (Elderberry). Alternative Medicine Review. 2005;10(1):51-55.
- Szweykowska A, Szweykowski J. Słownik botaniczny, Wiedza Powszechna, Warszawa, 2003;69.
- Schmitzer V, Veberic R, Stampar F. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) and American Elderberry (*Sambucus canadensis* L.). Botanical, chemical and health properties of flowers, berries and their products. Berries: Properties, Consumption and Nutrition 2012;127-148.
- Charlebois D, Byers PL, Finn CE, Thomas AL. Elderberry: Botany, Horticulture, Potential. Horticultural Reviews 2010;37:213-280.
- Porter R, Bode R. A Review of the Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.). Products: Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.). Phytotherapy Research 2017;31. DOI: 10.1002/ptr.5782
- Kaack K, Christensen LP. Phenolic acids and flavonoids in tea processed from flowers of black elder (*Sambucus nigra*) stored in different packing materials. European Journal of Horticultural Science 2010;75(5): 214-220.
- Sidor A, Gramza-Michałowska A. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. Journal of Functional Foods 2014. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012
- Stoilova I, Wilker M, Stoyanova A, Krastanov A, Stanchev V. Antioxidant activity of extract from elder flower (*Sambucus nigra* L.). Herba Polonica Journal 2007;53.
- Mikulic-Petkovsek M, Samoticha J, Eler K, Stampar F, Veberic R. Traditional Elderflower Beverages: A Rich Source of Phenolic Compounds with High Antioxidant Activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2015. DOI: 10.1021/jf506005b.
- Barak V, Halperin T, Kalickman I. The effect of Sambucol, a black elderberry-based natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines. European Cytokine Network 2001;12(2): 290-296.
- Knudsen BF, Kaack KV. A Review of Traditional Herbal Medicinal Products with Disease Claims for Elder (*Sambucus nigra*) Flower. Acta Horticulturae 2015;1061:109-120.
- Bolarinwa IF, Oke MO, Olaniyan SA, Ajala AS. A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum 2016. DOI:10.5772/64886.
- Forster-Waldl E, Marchetti M, Scholl I, Focke M, Radauer C, Kinaciyan T, Jensen-Jarolim E. Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. Clinical & Experimental Allergy 2003; 33(12):1703-171
- Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. Journal of Science Food and Agriculture 2016;97(8):2623-2632.
- Luczaj L, Szymanski WM. Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 2007;3:17.
- Tizio A, Luczaj LJ, Quave CL, Redzic S, Pieroni A. Traditional food and herbal uses of wild plants in the ancient South-Slavic diaspora of Mundimitar/Montemitro (Southern Italy). Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 2012;8:21.
- Ulbricht C, Basch E, Cheung L, Goldberg H, Hammerness P, Isaac R, Khalsa K, Romm A, Mills E, Rychlik I, Varghese M, Weissner W, Windsor R, Wortley J. An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration. Journal of Dietary Supplements 2014;11:10.3109.
- Palese P, Shah ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, ed. DM Knipe, PM Howley, Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 5th ed., 2007;1647-90.
- Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, Xu X, Wang J, Ma J, Fan Y, Rakestraw KM, Webster RG, Hoffmann E, Krauss S, Zheng J, Zhang Z, Naeve CW. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. Science 2006; 311:1576-80.
- Kong F. Pilot Clinical Study on a Proprietary Elderberry Extract: Efficacy in Addressing Influenza Symptoms. Online Journal of Pharmacology and Pharmacokinetics 2009;5:32-43.
- Serkedjieva J, Manolova N, Zgornjak-Wowosielska I, et al. Antiviral activity of the infusion (SHS-174) from flowers of *Sambucus nigra* L., aerial parts of *Hypericum perforatum* L., and roots of *Saponaria officinalis* L. against influenza and herpes simplex viruses. Phototherapy Research 1990;4:97-100.
- Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. A systematic review on the sambuci fructus effect and efficacy profiles. Phytotherapy Research 2010;24(1):1-8.
- Zakay-Rones Z., Varsano N, Zlotnik M, Manor O, Regev L, Schlesinger M, Mumcuoglu M. Inhibition of several strains of influenza virus in vitro and reduction of symptoms by an elderberry extract (*Sambucus nigra* L.) during an outbreak of influenza B Panama. Journal of Alternative & Complementary Medicine 1995;1:361-369.
- Ho GT, Ahmed A, Zou YF, Aslaksen TH, Wangenstein G, Barsett H. Structure-activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries. Carbohydrate Polymers 2015;125: 314-322.
- Ho GT, Zou YF, Aslaksen TH, Wangenstein G, Barsett H. Structural characterization of bioactive pectic polysaccharides from elderflowers (*Sambucus flos*). Carbohydrate Polymers 2016; 135:128-137.
- Kinoshita E, Hayashi K, Katayama H, Hayashi T, Obata A. Anti-influenza virus effects of elderberry juice and its fractions. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2012;76(9):1633-1638.

35. Torabian G, Valtchev P, Adil Q, Dehghania F. Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). *Journal of Functional Foods* 2019;54:353-360.
36. Karimi S, Dadras H, Mohammadi A. The effect of the extracts of *Echinacea purpurea* and *Sambucus nigra* (black elderberry) on virus shedding in H9N2 avian influenza infected chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2014;3:256-261.
37. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436-441.
38. Fink R, Roschek B, Alberte RS. HIV type-1 entry inhibitors with a new mode of action. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2009;19:243-255.
39. Sahpira-Nahor O, Zakay-Rones Z, Mumcuoglu M. The effects of Sambucol® on HIV infection in vitro. *Annual Israel Congress of Microbiology* 1995; 6-7.
40. Mahmood N, Pizzi C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Hay AJ. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Research* 1993; 22(2-3):189-199.
41. Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiologica* 2017; 62(2):151-156.
42. Morag AM, Mumcuoglu M, Baybikov T, et al. Inhibition of sensitive and acyclovir-resistant HSV-1 strains by an elderberry extract in vitro. *Z Phytotherapy* 1997; 25:97-98.
43. Amoros M, Simões CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 1992; 55(12):1732-1740.
44. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496:504-507.
45. Castillo-Maldonado I, Moreno-Altamirano MMB, Serrano-Gallardo LB. Anti-dengue serotype-2 activity effect of *Sambucus nigra* leaves-and flowers-derived compounds. *Virology Research & Reviews* 2017. DOI:10.15761/VRR.1000117.
46. Muliawan SY, Kit LS, Devi S, Hashim O, Yusof R. Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on dengue virus type 2 replication. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine. Public Health* 2006;37(3):132-135.
47. Sánchez I, Gómez-Garibay F, Taboada J, Ruiz BH. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. *Phototherapy Research* 2000;14:89-92.
48. Tang LI, Ling AP, Koh RY, Chye S.M., Voon K.G. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2012;12:3.
49. Weng JR, Lin CS, Lai HC, et al. Antiviral activity of *Sambucus Formosana* Nakai ethanol extract and related phenolic acid constituents against human coronavirus NL63. *Virus Research* 2019; 273:197767.
50. Sungnak W, Huang N, Bécavin C et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine* 2020; 26:681-687.
51. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger, Nadine HT, Erichsen S, Schiergens T, Herrler G, Wu Nai-Huei & Nitsche A, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; 181:271-280.
52. Franzo G, Legnardi M, Tucciarone CM, Drigo M, Martini M, Cecchinato M. Evolution of infectious bronchitis virus in the field after homologous vaccination introduction. *Veterinary Research* 2019;50,92.
53. Sevoian M, Levine PP. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production, and egg quality of laying chickens. *Avian Diseases* 1957; 1:136.
54. Chen C., Zuckerman D.M., Brantley S., Sharpe M., Childress K., Hoiczky E., Pendleton A.R.: *Sambucus nigra* extracts inhibit infectious bronchitis virus at an early point during replication. *BMC Veterinary Research* 2014;10:24.
55. Roschek B, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte R S. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry* 2009; 70(10):1255-1261.

Received: 9 june 2020

Accepted: 12 july 2020

NEWS AND VIEWS

Iraq Faces the COVID-19 with Limited Health Capabilities and Major Medical Challenges

Wedad H. Al-Dahhan¹, Mohammed H. Al-Mashhadani¹, Rasha Raheem², Emad Yousif¹

DOI: 10.21931/RB/2020.05.03.19

Abstract: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease affecting the respiratory system, which has had an unprecedented effect on healthcare systems globally with severe impact on specialist services. In December 2019, a novel coronavirus strain (CoV) was detected in Wuhan, China. By January 2020, It named as 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by the World Health Organization (WHO). On February 24, Iraq announced that an Iranian student has infected by coronavirus disease (COVID-19) in the south of Iraq in the holy Shiite city (Najaf). This was the first confirmed case in the whole of Iraq. The patient entered the country before the Iraqi government decided to restrict the entry of Iranian citizens on border crossings or airports. This article sheds light on the following concepts: The unqualified health system in Iraq to face the pandemic disease like COVID-19; the religious rituals in Iraq which contributed to the events of large gatherings to visit the holy shrines which increase the virus spread. Finally, discuss the social customs and traditions where the spread of the Coronavirus in Iraq has modified Iraqi customs and traditions that show personal affection through physical touch.

KeyWords: Iraq, COVID-19, pandemic, social factors, disease spread.

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is an infectious disease affecting the respiratory system. It had an unprecedented effect on healthcare systems globally, with a severe impact on specialist services¹. In December 2019, a novel coronavirus was detected in Wuhan, a city of 11 million people in Hubei Province, China². A new coronavirus strain (CoV) was isolated; in January 2020, the World Health Organization (WHO) referred to it as 2019-nCoV³. This virus was renamed later as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and the disease it causes was named Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)⁴. On March 25 2020, more than eighteen thousand patients have died because of the virus, and 413 467 were confirmed cases in at least 180 countries around the world⁵.

On Monday, February 24, Iraqi authorities announced that an Iranian citizen, who entered Iraq before the Iraqi government decided to restrict the entry of Iranian citizens, has infected by coronavirus disease (COVID-19). The infected patient has come to Iraq as a student to study religious subjects on the holy Shiite city south of Iraq (Najaf) about 160 km from Baghdad, the capital of Iraq. This was the first confirmed case by the medical laboratory test. On February 20, the Iraqi government postponed the granting visas and the flight by Iraqi Airways for Iranian citizens after the news that several Iranians have been infected with COVID-19⁶. At the beginning of March 2020, as a precaution, the local authority in Karbala prevented the outsiders from entering the governorate, which limited millions of visitors to the province on the religious occasion. During that time, the COVID-19 positive cases started to increase based on an international statistic published on July 10. Moreover, there are now more than 12.0 million confirmed cases in 188 countries. More than 560,000 people have lost their lives, as shown in Figure 1⁷.

This article sheds light on the following concepts: The unqualified health system in Iraq to face the pandemic disease like COVID-19; the religious rituals in Iraq which contributed to the events of large gatherings to visit the holy shrines which increase the virus spread. Finally, discuss the social customs and traditions where the spread of the Coronavirus in Iraq has modified Iraqi customs and traditions that show personal affection through physical touch. Importantly, the economic factor plus the factors mentioned above have an essential role in the disease spreading in Iraq.

Overview of the health situation in Iraq

The Iraq Total Population 39,340,000 in 2018⁸ spread across 18 governorates, including three governorates in a semi-autonomous region of Kurdistan. The estimated population living in rural settings is 30.1% (2017), with 40.5% of the total population under the age of 15 (2017), with an annual population growth rate of 2.4% (2017) and a life expectancy at birth of 70.3 years (2017)⁹.

The Iraqi healthcare system considers one of the best across the Middle East; hence it has affected by wars and economic troubles since the 1980s. The most significant blows to the system came during the civil conflicts across the country after 2003. Furthermore, more decline, as a result of the Islamic State (ISIS) in 2014 and the war after that¹⁰.

A report by the World Bank Group in February 2017 entitled 'Iraq – Systematic Country Diagnostic' stated the following: 'Iraq's health care capacity has been severely undermined by the effects of various wars, international sanctions, sectarian violence, political instability, and fiscal pressures¹¹.

It was evident since the last two decades that Iraq is facing enormous healthcare challenges, no other country in the Middle East having worse healthcare than that. Although other countries have made health gains, Iraq deteriorated from high levels to one of the worst in the region¹².

¹ Department of Chemistry, College of Science, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq.

² Department of Pathology, Microbiology and Immunology, University of South Carolina School of Medicine, Columbia, SC, United States of America.

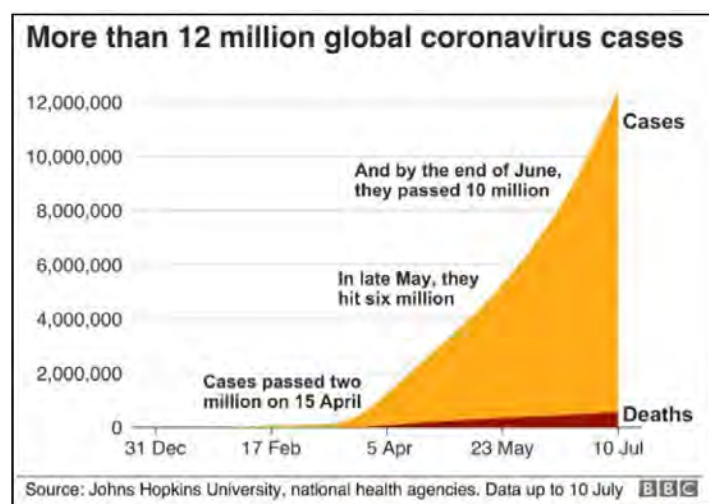


Figure 1. The virus is spreading rapidly in many countries, and the death toll is still climbing⁷.

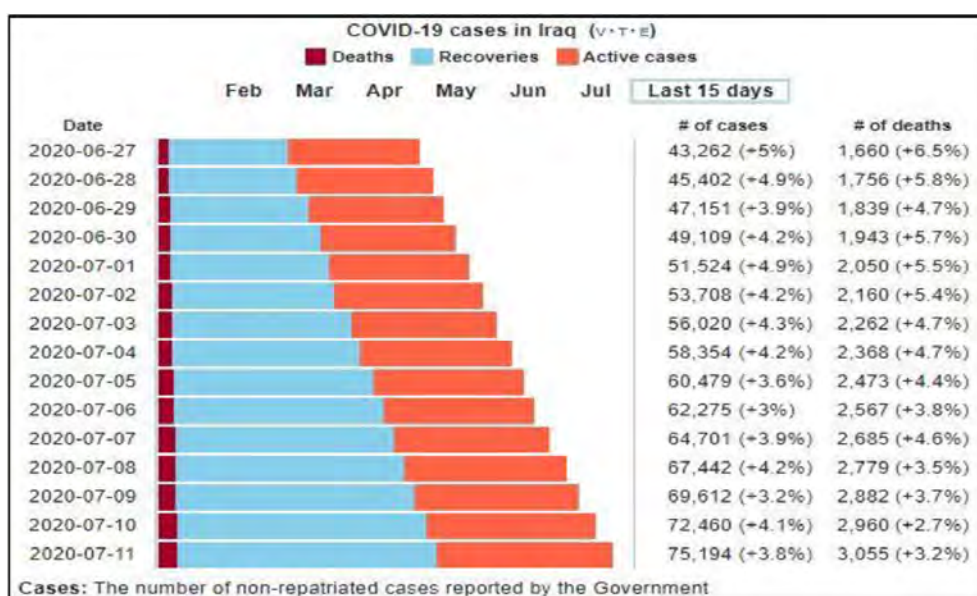


Figure 2. The confirmed cases of COVID-19 in Iraq between June 27 till July 11.

Confirmed COVID-19 cases and the health situation in Iraq during the Corona pandemic

On February 24, 2020, was confirmed the first case of Coronavirus in Al-Najaf governorate south of Baghdad, as mentioned before. On February 28 2020, the government went through quarantine across the country as this is the most robust approach to prevent the disease outbreak and protect the vulnerable people¹³. Iraqi people could face many challenges regarding this pandemic, lack of sufficient, and qualified infrastructure to control the outbreak of the disease. The hospitals do not have enough beds; moreover, these beds are not be disturbed equally around the country, according to the population¹⁴. Figure 2 shows the confirmed cases of COVID-19 in Iraq between June 27 till July 11. The figure shows that there were 75,194 confirmed cases in Iraq, including 3,055 deaths as of July 11, 2020. It has demonstrated that the curve has exponential growth, which is an indication of the massive increase of COVID-19 cases in Iraq, especially after the government has reduced restrictions about the quarantine on April 26¹⁵.

Religious visits pose a severe challenge to the spread of the Coronavirus

On March 17, Iraqi authorities decided to lock down all the country for week-long to stop the spread of the Coronavirus; most of the Iraqi people were adhering to that restriction.

However, the religious visits are an essential and crucial part of the religious beliefs of a large number of the Iraqi people who have been keen to perform these religious rituals for centuries, especially those visits where millions of visitors gather in one place. Some Iraqi pilgrims have traveled for tens of kilometers by foot, from Karbala to Baghdad, to visit the shrine of Imam Musa Kazim. Many pilgrims thought that infected patients would get well when they visit the shrine and advised people from China, Italy, and Iran to seek remedy here¹⁶.

The Grand Religious Authority supports the efforts of the Ministry of Health to address the Corona pandemic

Religious Authority directed the necessity of the obligation of following the directions of the experts to control the spread of the dangerous pandemic, and that includes prohibiting

holding gatherings and attending them for any reason¹⁷. Sayyid Sistani's (A respected Shea Imam) supports the ministry of health efforts. His support can be summarized by The responsibility of treating, caring for, and helping the ill is Wajib Kifa'ie (collective obligation on those members of the community who are capable of contributing) upon those who are qualified to do so, including medical doctors, nursing staff and others. However, it is the responsibility of the authorities concerned to provide them, all that they need to defend themselves from the risks of constricting the illness, and there is no excuse for the failure or delay in doing so. The work that is being done by these individuals, despite all the challenges they face, is priceless. Their effort is close in importance as fighting side by side in the trenches with the heroes defending the homeland and its people¹⁸.

Another case highlights the religious authority role during the pandemic; In a brief answer to questions about fasting the holy month of Ramadan with the spread of the Coronavirus (COVID-19) pandemic from religious authorities, it is obligatory to fast during the holy month of Ramadan. However, this obligation is lifted if a person has an authentic excuse, such as being not well, and one with chronic diseases. Otherwise, they need to do so, and it is not permitted for them to breakfasting¹⁹.

We should not forget to mention the detailed instructions that had been issued. The instructions are stating how the Coronavirus infected dead should be buried in a manner that guarantees the implementation of health precautions and the implementation of burial provisions under Islamic law²⁰.

Coronavirus changes Iraq's traditions of physical touch

The spread of the Coronavirus in Iraq has modified Iraqi customs and traditions that show personal affection through physical touch. The banning of social gatherings of Iraqis in celebration of joyful events or even for condolences is one of the Coronavirus changes. Many Iraqis are now practicing social distancing even with their dearest ones, fearing transmission of the Coronavirus. The regular Greeting ways disappeared, Men no longer kiss each other's cheeks, and women no longer hug each other, essentially ending timeless traditions, even if only temporarily.

Iraqi authorities enforced strict measures on March 13 because of the growing number of coronavirus cases. They also banned religious gatherings and visits, funeral services, and wedding parties. However, some Iraqis are not sticking to these measures. In Iraqi culture, especially in the central and southern provinces, the families of a deceased person would set up tents to receive people paying their condolences. Arab coffee and two meals are usually served during these funeral celebrations. Dozens of those attending the funeral procession would drink from the same cup without washing it. Nevertheless, the tribes, who enjoy vast social influence, banned this tradition. Disposable plastic cups were used, and some tribes even refrained from serving coffee.

The burial of the dead is an essential ritual in Iraq. Several Iraqi proverbs stress the sanctity of burying the dead. Iraqis often repeat an Arab proverb affirming that no deceased person should be left unburied. However, the spread of the Coronavirus seems to be putting an end to this well-entrenched ritual.

The Health Ministry of Iraq had to intervene to allow the families of the deceased to find places and ways to bury their dead.

While the pandemic has modified many Iraqi traditions and rituals, everyone still appears ready to resume these

traditions once the Coronavirus is defeated immediately. On April 13, Iraq registered 76 deaths and 1,352 confirmed cases of COVID-19^{21,22}.

All the factors together, is it working?

In Iraq, the religious authority, and the traditions and the tribe role control the Iraqi society more than the government power. The article spotlight the role of every factor during the pandemic. However, the number of new cases and death are increasing until the day of writing this article. The Economic factor and the poverty high rate are playing an important role that can overcome all the authorities in Iraqi society²³. Moreover, the World Development Indicators database also highlights the high poverty rates during the years before the Coronavirus pandemic²⁴.

On top of that, if we know the role of the stability of families, income was also a significant factor in people's experienced anxiety during the COVID-19 crisis, which could be explained by increased psychological and economic pressure²⁵. Adding all the factors together would explain the need of the unemployed people to support himself and his family with day by day life need. A free wok or street vendors, which in most of the time, they will not follow the social distance direction and other direction to avoid COVID-19 disease.

Conclusions

Corona pandemic (COVID-19) hit Iraq as it affected most of the world, but to varying degrees. This epidemic, which was unable to tackle the most significant global health systems and the world's economies collapsed. The countries' capabilities varied in how to deal with it since the specialists did not have complete information about this virus, which take a long time to determine the means to treat it. It was limited to laying down plans to neutralize its spread. Iraq, with its modest health capabilities, has drawn up plans to confront this epidemic. Iraq is still facing significant challenges due to the weak health culture in some segments of society, in addition to adhering to social customs and traditions that encourage gathering and visiting people, plus the adhering to religious rituals by visiting holy shrines by millions of visitors. The role of religious authorities in urging citizens to adhere to the state's instructions regarding this matter has emerged here.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Bibliographic references

1. Ching Ho H., Hughes T., Bozlu M., Kadioğlu A., Somani B. What do urologists need to know: Diagnosis, treatment, and follow-up during COVID-19 pandemic. *Turk J Urol*. 2020; 46(3): 169-177; DOI: 10.5152/tud.2020.20119.
2. Zhou P., Yang X., Wang X., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H., Zhu Y., Li B., Huang C. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270-273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7
3. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. *China Lancet*. 2020; 395, 497-506, 2020. DOI:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5
4. Chang L., Yan Y., Wang L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety, *Transfusion Medicine Reviews*. Article in Press, 2020. DOI: 10.1016/j.tmr.2020.02.003

5. WHO: Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report—65. March 25, 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200325-sitrep-65-covid-19.pdf?sfvrsn=2b74edd8_2 (accessed March 24, 2020).
6. Writethru L. Iraq announces 1st case of COVID-19 in Najaf, China. org.cn, www.china.org.cn. 2nd LD-Writethru: Iraq announces 1st case of COVID-19 in Najaf.
7. Coronavirus pandemic: Tracking the global outbreak, <https://www.bbc.com/news/world-51235105>
8. Afghanistan Statistical Yearbook 2018-19, issue no. 40, 2019 https://www.nsia.gov.af:8080/wp-content/uploads/2019/11/Afghanistan-Statistical-Yearbook-2018-19_compressed.pdf
9. The central organ of the statistics, Ministry of planning, Iraq Annual Statistical Report, 2017.
10. Al-Bayan Center Studies Series, Restoring the Iraqi Health-care Sector: The British National Health Service as a Model, 2018. <http://www.bayancenter.org/en/wp-content/uploads/2018/06/786564532.pdf>
11. Home Office, Country Policy and Information Note, Iraq: Medical and healthcare issues, Version 1.0, May 2019. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/800235/_external_Iraq_-_Medical_and_healthcare_-_CPIN_-_v1.0__May_2019_.pdf
12. Alwan A., Health in Iraq, the Current Situation, Our Vision for the Future and Areas of Work, Second Edition, 2004.
13. Coronavirus COVID-19 global cases by the center for systems science and engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU), Accessed on 13th March 2020, <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
14. WHO. Iraq Health profile, Retrieved at 26th Feb 2020 from, https://rho.emro.who.int/sites/default/files/Profiles-briefs_files/EMRO-PUB_EN_19621_Iraq.pdf, 2015.
15. World Health Organization and Iraqi Health Ministry reports. https://en.wikipedia.org/wiki/COVID-19_pandemic_in_Iraq
16. Aziz H., Karbala-Baghdad pilgrims defy Iraq coronavirus curfew, <https://www.rudaw.net/english/middleeast/iraq/22032020>, 2020.
17. The office of His Eminence Sayyid Ali al-Sistani, Questions About Coronavirus (COVID 19), <https://www.sistani.org/english/archive/26405/>
18. The office of His Eminence Sayyid Ali al-Sistani, Rulings Regarding the Efforts of Medical Professionals Caring for Coronavirus Patients (COVID 19), <https://www.sistani.org/english/archive/26398/>
19. The office of His Eminence Sayyid Ali al-Sistani, Inquiries regarding fasting the holy month of Ramadan with the spread of the Coronavirus pandemic (COVID-19), <https://www.sistani.org/english/archive/26418/>
20. The office of His Eminence Sayyid Ali al-Sistani, Questions about Preparing the Bodies of Those Deceased from Coronavirus (COVID-19), <https://www.sistani.org/english/archive/26412/>
21. Al-Jaffal O., Coronavirus changes Iraq's traditions of physical touch, <https://www.al-monitor.com/pulse/originals/2020/04/iraq-health-culture-coronavirus-covid19.html>, 2020.
22. Mohammed H. Al-mashhadani, Raghda Alsayed, Zainab Hussain, Nadia Salih, Emad Yousif, An Overview of Possible Therapeutic Approaches Against Novel Coronavirus Disease 2019 Pandemic, *Al-Nahrain Journal of Science, Special Issue: COVID-19*, 2020, 6–11.
23. The United Nations news. Political will 'fundamental' to realizing a more just and prosperous Iraq: UN envoy. <https://news.un.org/en/story/2020/05/1063772>
24. The World Bank Working for a World Free of Poverty, World Development Indicators database <https://data.worldbank.org/country/IQ>
25. Cao, W., et al., The psychological impact of the COVID-19 epidemic on college students in China. *Psychiatry Res*, 2020. 287: p. 112934.

Received: 13 July 2020

Accepted: 5 Ago 2020

NEWS AND VIEWS

Use of natural diatoms for drug delivery

Castro Dario, Cuasquer Joselyn, Chavez Eva

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.20

Abstract: Diatoms are microalgae organisms that have a cover of silica, with a fascinating ordered porous structure that varies in size, giving them some different characteristics. Because of their different size, shape, and structure, it has incredible properties, letting them be capable of been functionalized with other particles. Therefore, due to the ordered pore structure, the high surface area, biocompatibility, availability, and low processing cost, they present a growing potential for drug delivery when talking about silica materials, natural and synthetic, not to mention that is less expensive and a green alternative.

KeyWords: Diatoms, Biosilica, Surface functionalization.

Introduction

Diatoms are unicellular microalgae that are the most outstanding natural source of porous silica; these species can be found in every aqueous habitat; there exist probably around 100000 species of them. Nowadays, diatoms are marveling nanotechnologists who are hoping these amazing pore structures can show them how to improve minute structures to do better tasks.

The first time that the idea of build new biological materials by the structure of the diatom came in 1999 where scientists realize the potential that present diatoms due to the nano-scale design and the genetic control, essential features for the human engineering¹.

During their accelerated growth cycle, diatoms absorb substantial amounts of trace elements and nutrients from the surface water layer, especially silicon to form their shells, and zinc, which plays a vital physiological role in their development².

Morphology of Diatoms

The diatoms show a very diverse and successful lineage of photosynthetic Stramenopiles (Chromalveolates) with cell walls formed by amorphous silica and consisting of two parts, termed frustules, as their most striking feature. Their high abundance, coupled with the resilience of diatom frustules to disintegration in healthy waters, has resulted in massive sedimentary aggregation and a significant fossil record. The diatoms, as mentioned before, are unicellular beings, but some form colonies. The diatom plastids are derived from red algal secondary symbiosis and are golden brown due to the high concentration of the carotenoid fucoxanthin³. Diatoms were abounding and believed to be the most important group of eukaryotic phytoplankton, in charge of almost 40% of principal marine productivity⁴.

Reproduction of diatoms

Diatoms reproduce by two different modes, sexual and asexual. The ability to reproduce sexually is associated with the cell size of the diatom. It is the most pervasive strategy for re-establishing cell size⁵. A male gametangial cell initially experiments a progression of separated divisions to shape a number set of sperm mother cells, at that point, experience meiosis to frame flogged sperm. Oogonial female cells are capable of producing just one or even a maximum of two eggs, and then the fertilization forms a zygote⁶; on the other

hand, Diatoms have a unique mode of asexual reproduction. The vegetative cell division involves a successive reduction in the mean cell. New sibling valves are usually formed in close juxtaposition to each other. There are many consequences because of this, and as an example is a fact that diatoms must be able to escape from the inevitable size diminution if they are to survive, it means that with the time they must use the sexual reproduction to recover standard size⁶.

Types of diatoms

Diatoms have unique features, and good structural architecture made-up of silica provides various opportunities for the design of new materials⁷. More than 10 000 species of diatoms are known, and they are characterized based on the shape and structure of their cell walls, the diatom's cell wall structure can be a hexagonal, rod and circular shape⁸. There are two major types of diatoms, centric (Figure 1) and pennate, which are easily differentiated by frustule symmetry. Pennate diatoms tend to be elongated and centric diatoms are radially symmetrical. The centric type is of primary interest as having nano-engineering potential. The cylindrical type (Figure 2), its uniform pore structure, well-aligned pores, and wide ranges of heights and diameters⁹.

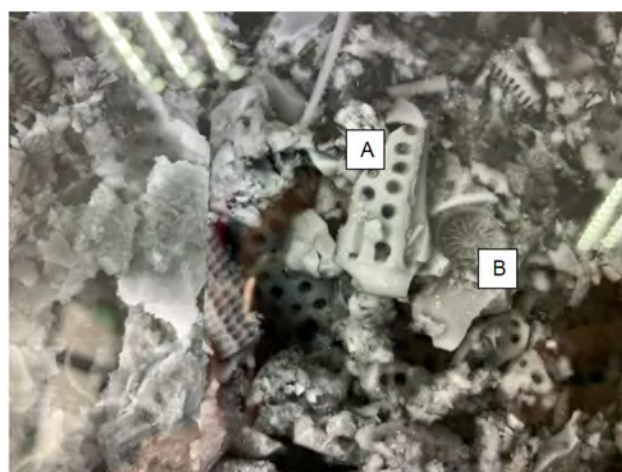


Figure 1. Microscopic picture showing both types of diatoms (A) cylindrical and (B) centric.

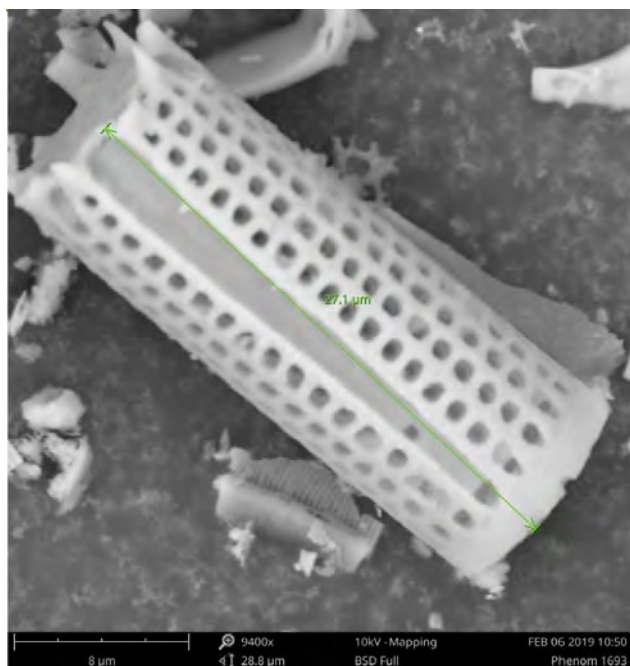


Figure 2. Cylindrical diatom looked by Scanning Electron Microscope (SEM).

Chemical composition of diatoms

Two types of silicon are found: condensed silica (SiO_2) and weakly polymerized silicate species (inorganic silicate, or silicate ester). The chemical composition of the diatom surface contains many lipids as peptides, polysaccharides, hydrocarbon-like compounds, also sort of SiO_2 , and $\text{Mg}(\text{OH})_2$. XPS analysis reveals a high concentration of lipids in the form of carboxylic esters; additionally, the organic part of the walls contains protonated nitrogen and phosphate. They are attributed not only to phospholipids but also, and possibly mainly, to phosphopeptides already described in diatom frustule, like silaffins or silacidins, also in walls Sulfate groups are also detected and are attributed to monoesters of polysaccharides¹⁰.

Applications of diatoms

Diatoms have a considerable quantity of applications in different areas. Nanotechnology is one of the fields where these marvelous microalgae have considerable applications worth to mention such as Bio-mineralization, which is a natural method where biosystems are used to extract minerals that derive from organic compounds and can be assisted by micro-organisms including diatoms, bacteria, and fungus¹¹. Diatoms are used more often than the others because of their large number of individuals and also by the capability of produce biosilica, which is an essential mineral for their structure^{11,12}.

The unique structure of the frustules in diatoms allows us to use them in water filters, building materials, chromatography supports, and also cadmium production because this metal is a waste in the development of diatoms¹². The improvement in the nanotechnology field encourage the production of smaller and efficient pieces to assemble electronic, optical, chemical, or biomedical devices¹³.

Industries nowadays produce much more pollutants that are released in freshwater at the environment that create a considerable adverse alteration in the physical, chemical, and biological properties of the water¹¹. For this reason, all the pollutants in the environment must be managed

and controlled. Biological methods for pollutants involve techniques to reduce their toxicity in the environment by transforming and mineralization of these pollutants. Diatoms are used in biodegradation of pollutants due to their quick response of disturbances in the environment and also their structure. There is evidence that certain diatoms species are capable of working as biological indicators for pollutants in rivers¹¹.

Diatoms had formed a 2D array, thus bringing up their use in biodevices development. Freshwater diatoms have been used to make biosensors for water quality assessment using alternating current dielectrophoresis to chain live diatom cells to create a 2D array¹⁴. Nanomedicine and medical applications employ nanomaterials, nano electrical biosensors, and molecular nanotechnology with drug delivery vehicles, diagnostic devices, and physical therapy applications being all-important in the general panorama. The big problem nanomedicine has to deal with is toxicity, biodegradability, and environmental impact. Using diatoms or their derived frustules instead provides intricate homogeneity while also surpassing the shortcomings as they are non-toxic, biodegradable, and readily available in the environment. Some of these applications are biosensors, immunodiagnosics, optical biosensors, and drug delivery¹⁴.

Mesoporous silica nanoparticles can be produced with several variations of size, morphology and tunable properties, the last one associated with specific applications, as mentioned before in the introduction, the synthesis of these materials includes complex chemical processes as well as toxic and expensive reagents. The characteristics that a diatoms' silica shells possess can excel the ones shown in the existing synthetic silica nanoparticle delivery systems, some of them: the frustules can be easily functionalized, protected, and engineered for controlled drug loading and successive delivery through the nanopores. In 2016, Ragni et al. mentioned the work of other authors that demonstrated the potential of diatom silica as a rising biomaterial for the delivery of a certain desired drug to a specific site¹⁵.

Drug delivery system

Drug delivery is one of the technological advances whose main objective is the administration or release of medications in the individual. The use of medications is a common practice in human history, but how medications are administered has varied and improved over time, being much more efficient¹⁶. Thanks to the use of biotechnology, we have been able to generate more specific and compound medicines, making their administration more intricate. The most modern systems include the use of microspheres and polymer microcapsules, nanoparticles, and natural polymers¹⁷.

In order to consider a specific type of drug delivery, it is necessary to consider the clinical needs and the factors that characterize them, such as the physicochemical properties of the drug, the disease to be treated, in which part of the body has its interaction if the treatment will be for chronic or acute diseases, among others¹⁷. According to the National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering of the USA, the most recent drug delivery systems research can be described in 4 different categories such as administration routes, administration vehicles, cargo, and mark strategies¹⁶.

Controlled delivery systems

Controlled systems are used to maintain adequate levels

of drugs in the body, which is necessary for the administration of certain medications making their use more efficient. The main objective for which this system was conceived is to maintain constant levels of medications in the patients' blood for a while, thus avoiding a decrease in the concentration of medication between administrations, ensuring that the dose does not reach toxic levels for the patient¹⁸. Chemical-controlled systems of the bioerosion or biodegradation system, which consists of the degradation of the polymers where the medicine is distributed in water-soluble molecules, can also use the system Pendant chain of a biodegradable polymer which, upon contact with the water destroys these bonds by releasing the medication in the body¹⁹.

Diatoms for drug delivery system

One of the main objectives in drug delivery is to develop new and efficient carries for drugs with less toxicity for the patient and reduce the risk of manage high amounts of drugs incorporations²⁰. Through the years, several experiments had been made facing the struggles for drug delivery, and as a result, bio-templating was developed and one of them came from diatoms²¹. The diatom nanostructure has adequate characteristics such as absorption capacity and packing for drug delivery²³. Using diatoms for drug delivery allows us to understand the effect of surface functionalization on controlling diffusion rates and drug delivery due to the drug packing and release in bare diatoms and modified diatoms¹.

Properties of diatoms in a drug delivery system

Diatom shells possess a combination of chemical, mechanical, and structural characteristics that surpass the obstacles associated with the delivery of therapeutic agents and offer several advantages over existing synthetic microparticle delivery systems. They have a pillbox structure with a hollow and sizeable inner space with micro- and nano-scale porosity, high surface area, excellent biocompatibility, amorphous silica, high permeability, low density, non-toxicity and the ability to mimic the nature of constituents for natural bone and medical implant, this make diatom silica a promising biomaterial for drug-delivery applications²³ (Figure 3). Diatoms with distinct 3-d of silica cell walls and highly-ordered pore structures, offering a great potential to replace synthetic mesoporous materials also as suitable carrier system used porous diatomite nano-carriers for delivering small interfering ribonucleic acid (siRNA) inside the human epidermoid cancer cells²⁴.

Diatom's frustule

The diatoms have an outer wall composed of silica called frustule which consists of two leaflets, a small one called hypotheca and a larger one called an epitheca, each of which is formed from a leaflet that forms the outer surface and a girdle that is a circular band of silica on the edges of the valve³. These leaflets are located from different sheets, which gives them a variation in porosity that can range from microns to nanometers, and their distribution depends on the species. The use of frustules diatoms has varied over time and can be found in these physical properties that allow its application in fields such as nanotechnology and biotechnology, where we can highlight its use for the production of bio-inspired solar cells due to its capacity of collecting light with high efficiencies, such as nanostructured substrates in plasmonics, optical sensors, and biosensors, nanoparticles as vectors in drug delivery. It is possible to generate variations in the frustule diatoms in terms of their porosity, morphology, and geometry to be able to generate new, more efficient techniques; this is possible through the modification of specific genes that are involved in the formation of the frustule diatom²⁵.

Dolatbadi and de la Guardia exposed some studies about the functionalization of diatom biosilica frustules with antibodies and enzymes²⁶. Trying to take out a new characteristic of diatoms, it is known that diatom-silica microcapsules were functionalized with dopamine-modified iron-oxide NPs. Then a new property to use diatoms was born, the magnetic diatoms, which by the way, have an enormous potential to be used as magnetically-guided drug-delivery micro-carriers.

Separation and purification of diatom biosilica

It is essential for the use of diatoms to purify the samples of any impurity, such as clay and organic substances. These substances are present in the diatoms because the environment and the conditions that were exposed the diatoms for their development²⁷.

For the purification process, we can take diatoms directly from freshwater and put them for two weeks in a growth medium rich in silicate for their treatment with piranha solution to remove organic waste²⁸, pulverize the samples using Milli Q water followed by sonication, filtration and sedimentation processes^{24,29}.

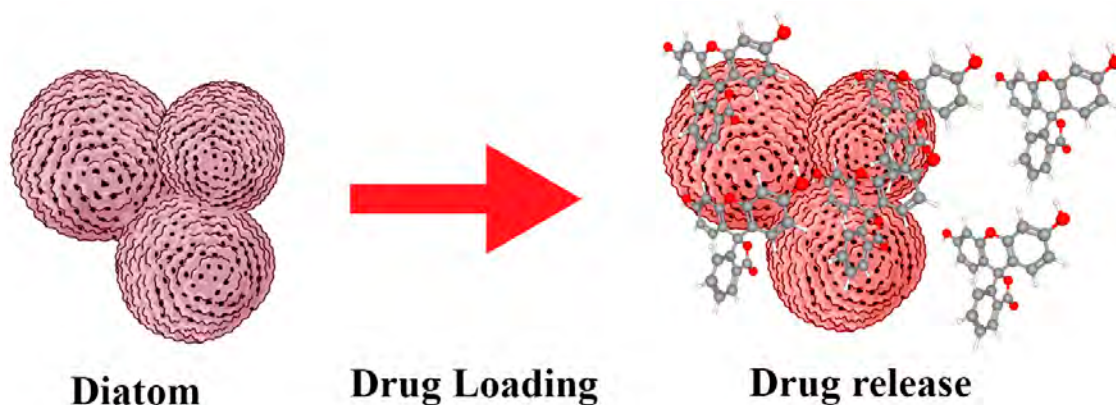


Figure 3. Diatom as a drug delivery system. The drug is loaded inside the silica frustule of the diatom. Once the encapsulation is exposed to the right environmental conditions, its content will get discharged into the media.

Diatoms as drug carriers

The use of silica-based particles has been increasing over the years creating a wide range of porosities and scales for drug delivery; these synthetic particles have the perfect characteristics such as a wide surface area, thermal stability, biocompatibility, among others. However, their high cost, the unnecessary production time and the use of toxic materials have made it necessary to look for other natural sources of these silica structures for the drug delivery, with diatoms being the best positioned with their exceptional characteristics³⁰.

In-vitro tests and experiments have been made in which the diatoms take an essential role as the carriers of certain drugs, such as the indomethacin with which it was possible to demonstrate loading capacity (22 wt%) and prolonged drug release over two weeks giving promising results in the use of diatoms³⁰. Other drugs tested in diatoms were mesalamine and prednisone both are common drugs to the treatment of gastrointestinal disorders, the drug delivery property of diatoms with these two drugs where tested in monolayers of colon cancer cells and demonstrate low toxicity at a concentration of 1000 µg/ml and also a stable release of drugs in a period; moreover, the study prove that the diatoms enhance the permeability of the drug by the permeation of the monolayer cell culture³¹.

Conclusions

The use of diatoms for drug delivery presents a new option in the field. However, studies are still lacking³¹; the results that have been obtained to date are very encouraging, opening new research areas and generating a viable solution to the use of silica structures synthetic, which have high production costs and use toxic materials in their production. Diatoms are one of the many natural resources that we have within our reach to be able to develop better and more efficient methods of drug delivery since these present exceptional characteristics to package and release drugs inside; we have before us a great opportunity which it needs to be further researched and developed.

Bibliographic references

- Chao, Joshua T, Manus JP Biggs, and Abhay S Pandit. 2014. "Diatoms: A Biotemplating Approach to Fabricating Drug Delivery Reservoirs." *Expert Opinion on Drug Delivery* 11 (11)
- Vance, Derek, Susan H. Little, Gregory F. De Souza, Samar Khatiwala, Maeve C. Lohan, and Rob Middag. 2017. "Silicon and Zinc Biogeochemical Cycles Coupled through the Southern Ocean." *Nature Geoscience* 10 (3): 202-6.
- Brinkmann N., Friedl T., Mohr K.I. (2011) Diatoms. In: Reitner J., Thiel V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht.
- Falkowski, Paul G, Richard T Barber, Victor Smetacek, Paul G Falkowski, Richard T Barber, and Victor Smetacek. 1998. "Linked References Are Available on JSTOR for This Article : Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production." *Science* 281 (5374): 200-206.
- Gandhi, H.P. 1966. Freshwater diatom flora of Jog Falls, Mysore State. *Nova Hedwigia*, 11: 89-197.
- Gandhi, H. P., A B. Vora and D. J. Mohan, 1983. Fossil diatoms from Baltal, Karewa beds of Kashmir. *Current Trends in Geology*, Vol. VI, (Climate and Geology of Kashmir) 6:61-68.
- A. Jantschke, A.K. Herrmann, V. Lesnyak, A. Eychmüller, E. Brunner, Decoration of diatom biosilica with noble metal and semiconductor nanoparticles (<10 nm): assembly, characterization, and applications, *Chem. - Asian J.* 7 (2012) 85-90.
- K.M. Wee, T.N. Rogers, B.S. Altan, S.A. Hackney, C. Hamm, Engineering and Medical Applications of Diatoms, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2005) 88-91.
- Y.S.S. Sofia Sotiropoulou, Sonny S. Mark, and Carl A. Batt, Bio-templated Nanostructured Materials, *Chem. Mater.* 20 (2008) 821-834
- Tesson, B., M. J. Genet, V. Fernandez, S. Degand, P. G. Rouxhet, and V. Martin-Jézéquel. 2009. "Erratum: Surface Chemical Composition of Diatoms (*ChemBioChem* (2009) Vol. 10 (2011-2024))." *ChemBioChem* 10 (12): 1915.
- Jamali, Ali Akbar, Fariba Akbari, Mohamad Moradi Ghoraklu, Miguel de la Guardia, and Ahmad Yari Khosroushahi. 2012. "Applications of Diatoms as Potential Microalgae in Nanobiotechnology." *BiolImpacts* 2 (2): 83-89.
- Jiao, Jun, Timothy Gutu, Debra K. Gale, Clayton Jeffries, Wei Wang, Chih Hung Chang, and Gregory L. Rorrer. 2009. "Electron Microscopy and Optical Characterization of Cadmium Sulphide Nanocrystals Deposited on the Patterned Surface of Diatom Biosilica." *Journal of Nanomaterials* 2009.
- Gordon, Richard, Frithjof A.S. Sterrenburg, and Kenneth H. Sandhage. 2005. "A Special Issue on Diatom Nanotechnology." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 5 (1): 1-4.
- Mishra, Meerambika, Ananta P. Arukha, Tufail Bashir, Dhananjay Yadav, and G. B.K.S. Prasad. 2017. "All New Faces of Diatoms: Potential Source of Nanomaterials and Beyond." *Frontiers in Microbiology* 8 (JUL): 1-8.
- Ragni, Roberta, Stefania Cicco, Danilo Vona, Gabriella Leone, and Gianluca M. Farinola. 2017. "Biosilica from Diatoms Microalgae: Smart Materials from Bio-Medicine to Photonics." *Journal of Materials Research* 32 (2): 279-91.
- Nbib.nih.gov. (2019). Drug Delivery Systems | National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. [online] Available at: <https://www.nibib.nih.gov/node/42846>
- S.S. Davis (2000) Drug delivery systems, *Interdisciplinary Science Reviews*, 25:3, 175-183
- Bhowmik, D. et al. (2012). Controlled Release Drug Delivery Systems. *The Pharma Innovation*. Available: http://www.thepharmajournal.com/vol1Issue10/Issue_dec_2012/3.1.pdf
- Dr. Liji Thomas, M. (2019) Chemically Controlled Drug Delivery Systems. from <https://www.news-medical.net/health/Chemically-Controlled-Drug-Delivery-Systems.aspx>
- Venkatesan, Jayachandran, Baboucarr Lowe, and Se-kwon Kim. 2015. "Application of Diatom Biosilica in Drug Delivery," 245-54.
- Maher, Shaheer, Tushar Kumeria, Moom Sin Aw, and Dusan Losic. 2018. "Diatom Silica for Biomedical Applications : Recent Progress and Advances" 1800552: 1-19.
- Farinola, Gianluca M, Stefania R Cicco, Dipartimento Chimica, Bari Aldo, and Moro Via. 2017. "Diatoms Biosilica as Efficient Drug-Delivery System," 3825-30.
- Aw, Moom Sinn, Spomenka Simovic, and Jonas Addai-mensah. n.d. "Silica Microcapsules from Diatoms as New Carrier for Delivery of Therapeutics P Reliminary Communication," 1159-73
- Bariana, Manpreet, Moom Sinn Aw, Mahaveer Kurkuri, and Dusan Losic. 2013. "Tuning Drug Loading and Release Properties of Diatom Silica Microparticles by Surface Modifications." *International Journal of Pharmaceutics* 443 (1-2): 230-41.
- De Tommasi, E., et al., Diatom Frustule Morphogenesis and Function: a Multidisciplinary Survey, *Mar. Genomics* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2017.07.001>
- Dolatabadi, Jafar Ezzati Nazhad, and Miguel de la Guardia. 2011. "Applications of Diatoms and Silica Nanotechnology in Biosensing, Drug and Gene Delivery, and Formation of Complex Metal Nanostructures." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (9): 1538-48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.015>.
- M.S. Aw, S. Simovic, Y. Yu, J. Addai-Mensah, D. Losic, Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications, *Powder Technol.* 223 (2012) 52-58
- N.L. Rosi, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Control of nanoparticle assembly by using DNA-modified diatom templates, *Angew. Chem.* 43 (2004) 5500-5503.

29. I. Rea, N.M. Martucci, L. De Stefano, I. Ruggiero, M. Terracciano, P. Dardano, N. Migliaccio, P. Arcari, R. Tate, I. Rendina, A. Lamberti, Diatomite biosilica nanocarriers for siRNA transport inside cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1840 (2014) 3393-3403.
30. Aw, Moom Sinn, Spomenka Simovic, Jonas Addai-Mensah, and Dusan Losic. 2011. "Silica Microcapsules from Diatoms as New Carrier for Delivery of Therapeutics." *Nanomedicine* 6 (7): 1159-73.
31. Zhang, Hongbo, Mohammad Ali Shahbazi, Ermei M. Mäkilä, Tiago H. da Silva, Rui L. Reis, Jarno J. Salonen, Jouni T. Hirvonen, and Hélder A. Santos. 2013. "Diatom Silica Microparticles for Sustained Release and Permeation Enhancement Following Oral Delivery of Prednisone and Mesalamine." *Biomaterials* 34 (36): 9210-19. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.035>.

Received: 20 June 2020

Accepted: 20 July 2020

NEWS AND VIEWS

Pruebas rápidas para COVID-19, la mejor alternativa para Ecuador Rapid tests for COVID-19, the best alternative for Ecuador

Ruth T. Valencia Portillo¹, Bernardina Amorín Uscata¹, Fernando Alexis Gonzales-Zubiate², Katia Juscamaíta Medina³, Orlando R. Sevillano¹,
Eduardo Milton Ramos-Sanchez^{1,4}

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.21

Resumen: La enfermedad respiratoria COVID-19 causada por el virus SARS-Cov-2 cuenta con más de 18 millones de personas infectadas y más de 600 mil muertes en el mundo, en Ecuador se tienen ya más de 88 mil infectados. Siendo el cuarto país con menos pruebas de diagnóstico realizadas, Ecuador podría afrontar un retraso en la investigación epidemiológica y una ausencia de datos reales de la población afectada. Se cuenta con dos tipos de pruebas para el diagnóstico de SARS-CoV-2: las pruebas moleculares que son el Gold estándar y que se basan en la detección del virus (qRT-PCR y RT-LAMP) y las pruebas rápidas que detectan anticuerpos generados por la respuesta inmunológica del paciente. Ambas pruebas presentan pros y contras que las hacen complementarias y aumentan su alcance, ya que el foco poblacional es distinto. Las pruebas moleculares pueden detectar la presencia del virus en media, una semana antes y hasta una semana después de la aparición de los síntomas. Sin embargo, qué ocurre con los individuos asintomáticos que no fueron sometidos a ningún tipo de prueba diagnóstica y que ignoran si fueron infectados o no, y en qué momento fueron infectados. Para este grupo existen las pruebas rápidas, pruebas que detectan la respuesta inmunológica del individuo. Es así como las pruebas de diagnóstico se convierten en herramientas de vital importancia, complementando los estudios de los cuadros clínicos y la búsqueda activa de personas asintomáticas que ya pasaron del pico de carga viral. Inicialmente, la cuarentena controló el número de infectados pero la dinámica económica ha obligado a la población a salir de su hogar y es por esto que en este momento se necesitan nuevas estrategias para minimizar los efectos del SARS-CoV-2. En conclusión, las pruebas rápidas serían una solución que aceleraría la identificación y aislamiento de los individuos infectados, estimando con mayor exactitud el número de contagios, lo que permitiría una mejor toma de decisiones y el desarrollo de políticas públicas para contrarrestar la presente pandemia.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, Ecuador, pruebas moleculares, pruebas rápidas.

Abstract: The respiratory disease COVID-19 caused by the SARS-Cov-2 virus has more than 18 million people infected and more than 600 thousand deaths worldwide, in Ecuador there are already more than 88 thousand infected. Being the fourth country with less diagnostic tests performed, Ecuador could face a delay in epidemiological research and an absence of real data from the affected population. There are two types of tests for the diagnosis of SARS-CoV-2: molecular tests that are the gold standard and are based on virus detection (qRT-PCR and RT-LAMP) and rapid tests that detect antibodies generated by the immune response. Both tests have pros and cons that make them complementary and increase their scope, since the population-focused is different. Molecular tests can detect the presence of the virus on average, one week before and up to one week after the onset of symptoms. However, what happens to asymptomatic individuals who did not undergo any type of diagnostic test and who do not know if they were infected or not, and at what time they were infected. For this group there are rapid tests that detect the immune response of the individual. That is how diagnostic tests become vital tools, complementing the studies of clinical pictures and the active search for asymptomatic individuals who have already passed the peak of viral load. Initially, the quarantine controlled the number of infected, but the economic dynamics have forced the population to leave their homes, and this is why new strategies are currently needed to minimize the effects of SARS-CoV-2. In conclusion, rapid tests would be a solution that would accelerate the identification and isolation of infected individuals, estimating the number of infections more accurately, allowing better decision-making and the development of public policies to counter the current pandemic.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, Ecuador, molecular tests, rapid tests.

Introducción

La pandemia global COVID-19, enfermedad infecciosa causada por el beta coronavirus SARS-Cov-2, actualmente cuenta con 18,6 millones de personas infectadas y más de 700 mil muertes en el mundo¹. El nuevo epicentro de infección el día de hoy es Sudamérica y a pesar de las duras medidas ejercidas por las autoridades sanitarias, no se avizora el pico de la pandemia en los países de esta región. Ecuador se posiciona en el sexto país más afectado con más de 88 mil casos (5.07/1000 habitantes); siendo las provincias de Guayas (22.1 % de casos), Pichincha (19.4. % de casos) y Manabí (8.5 % de

casos) las más afectadas².

Actualmente Ecuador es el cuarto país en América del Sur con menor número de pruebas de diagnóstico realizadas por millón de personas¹, estas pruebas comprenden pruebas moleculares (o PCR) y pruebas rápidas. La cantidad exigua de estas pruebas trae como consecuencia un retraso en la investigación epidemiológica, así como también en la evaluación real del impacto generado por el virus. Las pruebas moleculares se basan en la detección de material genético del virus (carga viral), que puede identificar una infección precoz (aún

¹ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, IMTSP-USP, São Paulo, Brazil.

² School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Ecuador.

³ Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin Escobedo EsSalud, Red Asistencial, Arequipa, Perú.

⁴ Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas 0100, Perú.

Corresponding author: eduardors22@hotmail.com

en ausencia de síntomas) o en un estadio inicial³. Por otro lado, las pruebas serológicas detectan los anticuerpos producidos como respuesta a la infección a partir del sexto día después de los primeros síntomas. anticuerpos que duran en media 6 semanas o más³. El desarrollo de pruebas serológicas nace de la necesidad de tener una herramienta para el diagnóstico y estudios seroepidemiológicos, ya que estas pruebas son más fáciles de aplicar y necesitan de menos infraestructura que las pruebas moleculares.

Las pruebas moleculares están basadas en la técnica de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qRT-PCR) denominada como el Gold estándar para detección de SARS-CoV-2. Esta prueba detecta genes conservados del virus como el gen RNA dependiente de RNA polimerasa (RdRp), el gen de la cápside (E) y el gen de la proteína *Spike* (S)⁴; actualmente existen kits moleculares en los que se identifica más de un gen, mejorando así la especificidad y eficiencia de la prueba⁵. Para la detección de genes virales se usan muestras de hisopado nasofaríngeo, heces, esputo y lavado bronquio-alveolar de una persona infectada, siendo estos dos últimos los de mejor sensibilidad^{6,7}; esta técnica, en algunos casos, permite la detección incluso hasta una semana antes del inicio de los síntomas. Además del qRT-PCR, existe otra técnica molecular siendo implementada recientemente para la detección de SARS-CoV-2, la transcripción reversa seguida de una amplificación isotérmica mediada por lazo (RT-LAMP) desarrollada por Baek y colaboradores a inicios de este año⁸. En este ensayo se utilizan *primers* diseñados para amplificar genes del virus SARS-CoV-2, como por ejemplo el gen de la nucleocápside del RNA viral⁸ o, como es mostrado en otros estudios, los genes *orf1ab* y *Spike*⁸. RT-LAMP genera resultados en aproximadamente 30 minutos y es interpretado por una evaluación colorimétrica que no tiene reacción cruzada aparente con otros coronavirus, virus de influenza u otros virus respiratorios⁸. Tanto qRT-PCR como RT-LAMP tienen alta especificidad en casos de bajo o nulo sesgo operacional, sin

embargo la existencia de un error en la toma de muestra puede dar como resultado un falso negativo^{6,7,9}, siendo este uno de los problemas más frecuentes. Eventualmente la falta de experiencia del personal de colecta, dan como resultado una amplificación insatisfactoria o un resultado falso negativo. Un paciente falso negativo es un riesgo para la salud pública por la capacidad de diseminación, obstaculizando así el objetivo de contener la propagación del virus. No obstante, la sensibilidad de la prueba puede variar no solo por un error en la colecta sino también dependiendo del tipo de muestra colectada, el tiempo de infección (periodo ventana de la prueba) o la carga viral del paciente¹⁰ (Tabla 1).

Con relación a las pruebas rápidas, estas son complementarias en el diagnóstico por SARS-CoV-2, especialmente en la segunda semana del inicio de los síntomas cuando la probabilidad de un resultado falso negativo de la prueba qRT – PCR es alta¹¹. Las pruebas rápidas detectan anticuerpos generados por la respuesta inmunológica del paciente ante las infecciones virales, inicia con la producción de la inmunoglobulina M (IgM) considerada como la respuesta adaptativa, detectable a partir del día 5–7 del inicio de la infección (primer día de la aparición de síntomas), seguida de inmunoglobulina G (IgG) o respuesta humoral adaptativa (anticuerpos de alta afinidad) que aumenta los niveles en la semana tres y decrece después de la novena semana^{12,13} (Figura 1). Las pruebas rápidas son de bajo costo, rápidas (aproximadamente 15 min) y requiere menos personal ya que utilizan equipamiento menos sofisticado, reduciendo los sesgos operacionales y presentando baja probabilidad de contaminación para el operador (Tabla 1).

A diferencia de las pruebas moleculares que utilizan secreciones mucosas que contienen virus, las pruebas rápidas y en general las actuales pruebas serológicas son de primera generación y aún están siendo perfeccionadas, estas pruebas serológicas incluyen Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), Inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA), e Inmunoensayos de electroquimioluminiscencia (EIA),

	PROS	CONTRAS
Pruebas Moleculares (qRT-PCR y RT-LAMP)	• Gold estándar (qRT-PCR). • Detecta material genético del virus. • Diagnóstico precoz incluso una semana antes de los síntomas. • Altamente específica. • Bajo costo (RT-LAMP)	• Equipamiento sofisticado. • Personal más capacitado en toma de muestra. • La sensibilidad disminuye después de la primera semana del inicio de síntomas. • Alto costo (qRT-PCR).
Pruebas Rápidas	• Detecta anticuerpos del paciente. • Diagnóstico tardío. • Altamente sensible. • De bajo costo. • Equipos menos sofisticados. • Puede ser realizado en sangre. • Bajo riesgo de contaminación para quien toma la muestra	• Es una prueba complementaria no confirmatoria. • Algunos pacientes producen bajas cantidades de Ig G. • Los primeros días de infección puede dar resultados falsos negativos. • Debe ser una prueba compuesta de Ig G e IgM. • Puede detectar pacientes ya recuperados.

Tabla 1. Análisis de los pros y los contras de las pruebas Moleculares y las pruebas rápidas para SARS-CoV-2.

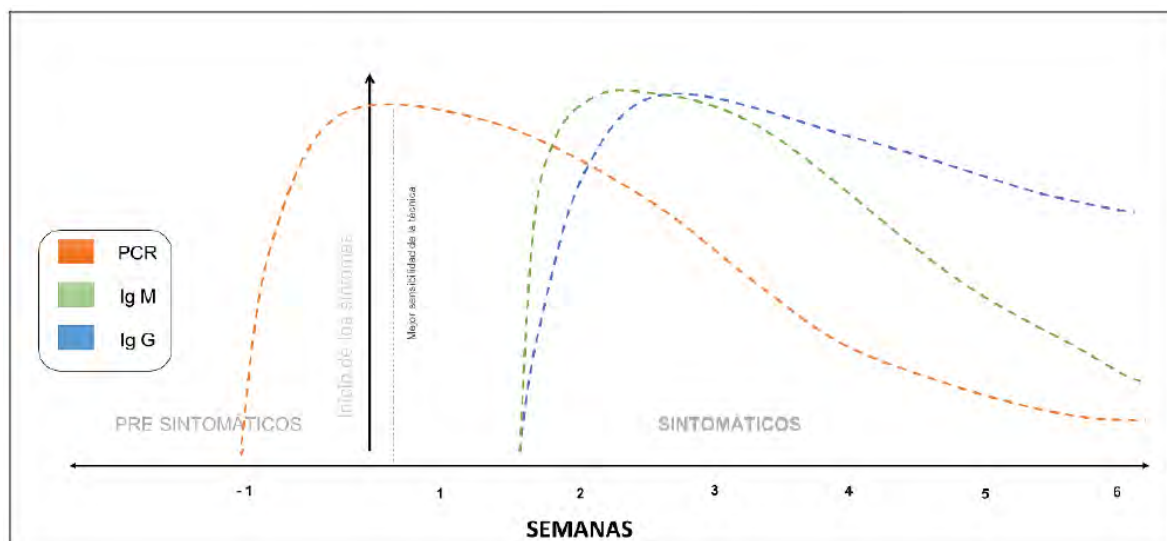


Figura 1. Variación estimada de la curva de eficiencia de los métodos moleculares y serológicos desde el inicio de la infección por SARS-CoV-2. Las técnicas moleculares son las únicas que tienen la capacidad de detectar un paciente con SARS-CoV-2 antes de presentar síntomas, la detección de las inmunoglobulinas se da a partir de la segunda semana de presentar síntomas (el presente gráfico con los intervalos de tiempo estimados y las tasas de detección viral se basan en datos de varios informes publicados).

analizan principalmente sangre, suero o plasma. Se sabe que las pruebas serológicas que usan suero y plasma son consideradas como fuentes de baja contaminación viral y tienen mejor sensibilidad que las realizadas con sangre total o capilar¹⁴. Las pruebas rápidas también pueden ser complementarias al diagnóstico debido a la existencia de pacientes con sospecha de COVID-19 que obtuvieron resultados negativos en las pruebas moleculares debido a factores mencionados anteriormente.

¿Cuál sería la real importancia de las pruebas rápidas? Estas son importantes porque brindan la facilidad de identificar a las personas con síntomas y también a un grupo no tan estudiado: "los individuos asintomáticos". Estos individuos normalmente no serían detectados por una prueba molecular ya que el periodo ventana de la prueba es de aproximadamente 15 días (una semana antes y hasta una semana después de iniciados los síntomas) (Figura 1) y en el caso de los individuos asintomáticos este periodo es indetectable. La identificación de estos dos grupos en un metaanálisis serológico de la población generaría información suficiente que permitiría la toma de decisiones para la instauración de políticas públicas como aislamiento social y apertura económica.

En la actualidad se realizan estudios serológicos de diversos tipos como por ejemplo medición de niveles de anticuerpos entre hombres y mujeres para observar correlaciones en cuanto a la producción de Ig G¹⁵, otros estudios comparan seroprevalencia de Ig G en diversos grupos etarios¹⁶ o estudios de metaanálisis como los ya realizados en Alemania (Gangelt), Suiza (Ginebra) y en algunas ciudades de Estados Unidos (Chelsea-MA, San Miguel-CO, Santa Clara-CA, Los Ángeles-CA) donde se identificaron no solo a personas con síntomas sino también asintomáticas¹⁷.

Los individuos asintomáticos tienen la capacidad de transmisión del virus¹⁸, por ello los estudios de seroprevalencia de anticuerpos Ig M e Ig G contra SARS-CoV-2 están orientados a su identificación y seguimiento, incluyendo el histórico de contacto con personas para de esta forma mitigar la propagación de la enfermedad en las ciudades^{16,18}. La identificación de las personas asintomáticas tiene dos objetivos: saber el número real de personas infectadas o potencialmente expuestas a in-

fección en una población y la identificación de estas para realizar estudios futuros de respuesta inmunológica, ya que por el momento se tiene información limitada de la inmunología de estos pacientes¹⁹.

Conclusiones

Con un número creciente de contagios y expansión del virus en el mundo, la implementación de un plan para identificar y aislar a las personas infectadas en Ecuador es imprescindible para el control y reducción del número de casos, ya que se necesita una aproximación más real del número de contagios y de población afectadas para que el Ministerio de Salud Pública pueda demarcar estrategias futuras.

Es importante resaltar que aún se sabe poco sobre cómo evoluciona la infección asintomática, por consiguiente, las pruebas rápidas ayudarían a la identificación de individuos asintomáticos y esto promovería la formulación de proyectos nacionales estratégicos en los cuales se estudie la respuesta inmune protectora presente en este grupo, el perfil temporal del anticuerpo sérico con el objetivo de evaluar el tiempo de duración de inmunidad humoral y la evaluación de la protección inmune de la población.

Si bien la cuarentena brindó cierto control sobre el número de infectados, pierde fuerza a medida que la dinámica económica se va reiniciando en diferentes partes del Ecuador. En este contexto, las pruebas rápidas viabilizan una alternativa no solo de identificación sino también una estrategia de seguimiento clínico, más aún en cantones donde no se posee la infraestructura ni el número adecuado de personal calificado para realizar las pruebas moleculares.

Referencias bibliográficas

1. Worldometer. Coronavirus Cases. Worldometer 1-22 <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries> (2020) doi:10.1101/2020.01.23.20018549V2.

2. SITUACIÓN NACIONAL POR COVID-19. INFOGRAFÍA N°160. Inicio 29/02/2020- Corte 05/08/2020 08:00. Fuente: Ministerio de Salud Pública del Ecuador. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/08/INFOGRAFIA-NACIONALCOVI-19-COE-NACIONAL-08h00-05082020-v2-2.pdf>
3. Ma, H. et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cellular and Molecular Immunology* (2020) doi:10.1038/s41423-020-0474-z.
4. Corman, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 25, (2020).
5. Romano, C. M., Chebabo, A. & Levi, J. E. Past, present, and future of COVID-19: A review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* vol. 53 1–8 (2020).
6. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. WHO - Interim guidance 2019, 1–7 (2020).
7. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 2249–2251 (2020).
8. Baek, Y. H. et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerging Microbes and Infections* 9, 998–1007 (2020).
9. Zhao, J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019 | *Clinical Infectious Diseases* | Oxford Academic. *Clinical Infectious Diseases* ciaa344, (2020).
10. Vashist, S. K. In vitro diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics* vol. 10 (2020).
11. Wölfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581, 465–469 (2020).
12. Document of Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), of 01/04/2020 - RCPA advises against COVID-19 IgG/IgM rapid tests for the detection of early COVID disease.
13. Azkur, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 75 1564–1581 (2020).
14. Montesinos, I. et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of Clinical Virology* 128, (2020).
15. Zeng, F. et al. A comparison study of SARS-CoV-2 IgG antibody between male and female COVID-19 patients: A possible reason underlying different outcome between sex. *Journal of Medical Virology* (2020) doi:10.1002/jmv.25989.
16. Ling, R. et al. Seroprevalence and epidemiological characteristics of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in asymptomatic people in Wuhan, China. doi:10.1101/2020.06.16.20132423.
17. Levesque, J. & Maybury, D. W. A note on COVID-19 seroprevalence studies: a meta-analysis using hierarchical modelling. (2020) doi:10.1101/2020.05.03.20089201.
18. Yu, X. et al. Unclear but present danger: An asymptomatic SARS-CoV-2 carrier. *Genes & Diseases* (2020) doi:10.1016/j.gendis.2020.07.010.
19. Long, Q.-X. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine* (2020) doi:10.1038/s41591-020-0965-6.

Received: 10 julio 2020

Accepted: 6 agosto 2020

DE LA CURIOSIDAD ACADÉMICA A LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA



ESCUELA DE
CIENCIAS MATEMÁTICAS
Y COMPUTACIONALES



ESCUELA DE
CIENCIAS FÍSICAS
Y NANOTECNOLOGÍA



ESCUELA DE
CIENCIAS QUÍMICAS
E INGENIERÍA



ESCUELA DE
CIENCIAS DE LA TIERRA,
ENERGÍA Y AMBIENTE



ESCUELA DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS
E INGENIERÍA

Centro de Biotecnología y Biomedicina ha desarrollado CEBITROPIN, producto que es una variante monomérica de la hormona folículo estimulante bovina de tipo recombinante (rbFSH), producida artificialmente desde cultivos celulares estandarizados y obtenidos bajo estándares de calidad GMP.



PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

Hormona rbFSH purificada y liofilizada.

El producto contiene:

1 vial con 0,5 mg de la hormona y
20 mL de solución diluyente.

USOS DEL PRODUCTO

1. Superovulación.

Para inducir la superovulación en ganado bovino se recomienda administrar por vía intramuscular 2,5 mL de la hormona cada 12 horas, durante cuatro días. Previo a la recolección de óvulos, se sugiere establecer un protocolo de sincronización del celo.

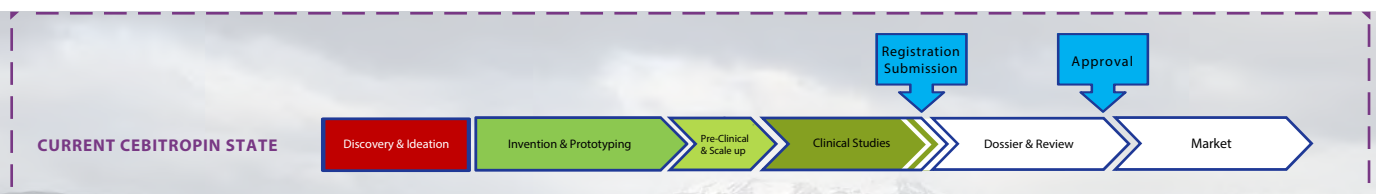
2. Sincronización del Celo.

Para sincronizar el celo en protocolos de inseminación artificial de tiempo fijo se recomienda la administración intramuscular de 2,5 mL de la hormona rbFSH en conjunto con prostaglandina F2 o una prostaglandina análoga a la F2 alfa.

3. Otros Usos.

Esta hormona puede ser utilizada para maduración *in vitro* de embriones bovinos.

ESTADO ACTUAL DE DESARROLLO DEL PRODUCTO



Docencia, investigación,
extensión y proyección
social al servicio del territorio



Fortalezas institucionales

- > Biotecnología
- > Limnología
- > Derechos Humanos – Posconflicto
- > Internacionalización
- > Inclusión Social
 - SER – Servicio Educativo Rural
 - Educación de Alfabetización
- > MII S – Instituto de formación para el trabajo y el desarrollo humano
- > Formación humanística “Ruta Humanística en el currículo - Cátedra abierta Madre de la Sabiduría”
- > Investigación y desarrollo tecnológico
- > Comprometida con la calidad
- > Centro de Estudios Territoriales
- > Biodiversidad
 - Herbario
 - Ichtiología
 - Fitoteca

Áreas del conocimiento

- Ciencias Agropecuarias
 - Ciencias de la Educación
 - Ciencias de la Salud
 - Ciencias Económicas y Administrativas
 - Ciencias Sociales
 - Derecho
 - Ingenierías
 - Teología y Humanidades
- > 26 programas de pregrado
 - > 16 programas de posgrado
 - 1 doctorado
 - 8 maestrías
 - 7 especializaciones

www.uco.edu.co Universidad Católica de Oriente @unio



“Servicio educativo con calidad en
Personas, procesos y servicios”

Contacto institucional Universidad Católica de Oriente
Sector 3, Cra. 46 No. 40B 50 - PBX: +57(4) 569 90 90. Ext. 694
Fax: +57(4) 501 09 72 - Email: uco@uco.edu.co

