



BIOTECNOLOGÍA Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR SALUD

Compilador

Juan Carlos Sepúlveda Arias

Autores

Jhon Jairo Melchor Moncada
Alcira Socarrás Cárdenas
Luz Eliana Mantilla Muriel
Juan Carlos Sepúlveda Arias
Lida Inés Mancilla Estacio
Manuel Felipe Villalba
Luz Ángela Veloza Castiblanco
Silvia Córdoba Romero
Iván Alberto Lopera Castrillón
Diego Fernando Cómbita Merchán
Jainer Enrique Aranzazu O
Carlos Andrés Toro
Lyda Cenobia Caballero
Lina Marcela Pedraza Ortiz
Leidy A. Palechor Ocampo
Jaime A. Cardona Ospina
Carlos Alberto Isaza Mejía
Juan David Anacona Montilla
Jenny Marcela Vélez Gómez
Fredy Alexander Tabares Villa
Sandra Catalina Garzón Castaño
Nancy Yadira Guerrero Pepinosa
Juliana Rivera Cano
Augusto Zuluaga Vélez
Andrea Paola Melo
Heidy Catalina Navia
Lina Marcela Orozco
Fernando Siller López
Yeidy Viviana Arias
Julieta Henao Bonilla
Diana María Gil Villa

La Editorial de la Universidad Tecnológica de Pereira tiene como política la divulgación del saber científico, técnico y humanístico para fomentar la cultura escrita a través de libros y revistas científicas especializadas.

Las colecciones de este proyecto son:
Trabajos de Investigación, Ensayos,
Textos Académicos y Tesis Laureadas.

Este libro pertenece a la Colección
Trabajos de Investigación.

BIOTECNOLOGÍA Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR SALUD

Compilador
Juan Carlos Sepúlveda Arias

Autores Varios



Universidad Tecnológica
de Pereira

Colección Trabajos de Investigación
Facultad Ciencias de la Salud
2020

Biotecnología y sus aplicaciones en el sector salud / Compilado
por Juan Carlos Sepúlveda Arias. – Pereira : Editorial
Universidad Tecnológica de Pereira, 2020.
395 páginas. -- (Colección Trabajos de investigación).
ISBN: 978-958-722-439-9
1. Biotecnología 2. Biomedicina 3. Enzimas – Análisis 4.
Química microbiológica 5. Vacunas – Biotecnología 5. Células madre
CDD. 660.6

Compilador

© Juan Carlos Sepúlveda Arias

Autores

© Jhon Jairo Melchor Moncada

© Alcira Socarrás Cárdenas

© Luz Eliana Mantilla Muriel

© Juan Carlos Sepúlveda Arias

© Lida Inés Mancilla Estacio

© Manuel Felipe Villalba

© Luz Ángela Veloza Castiblanco

© Silvia Córdoba Romero

© Iván Alberto Lopera Castrillón

© Diego Fernando Cómbita Merchán

© Jainer Enrique Aranzazu O

© Carlos Andrés Toro

© Lyda Cenobia Caballero

© Lina Marcela Pedraza Ortiz

© Leidy A. Palechor Ocampo

© Jaime A. Cardona Ospina

© Carlos Alberto Isaza Mejía

© Juan David Anacona Montilla

© Jenny Marcela Vélez Gómez

© Fredy Alexander Tabares Villa

© Sandra Catalina Garzón Castaño

© Nancy Yadira Guerrero Pepinoso

© Juliana Rivera Cano

© Augusto Zuluaga Vélez

© Andrea Paola Melo

© Heidi Catalina Navia

© Lina Marcela Orozco

© Fernando Siller López

© Yeidy Viviana Arias

© Julieta Henao Bonilla

© Diana María Gil Villa

Universidad Tecnológica de Pereira

Pereira, Colombia

Proyecto

“DESARROLLO DE CAPACIDADES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADAS A LOS SECTORES DE LA SALUD Y LA AGROINDUSTRIA EN EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA”, financiado por el Sistema General de Regalías de Colombia (Código BPIN 2012000100050). Trabajo de investigación

Universidad Tecnológica de Pereira

Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión

Editorial Universidad Tecnológica de Pereira

Pereira, Colombia

Coordinador editorial:

Luis Miguel Vargas Valencia

luismvargas@utp.edu.co

Teléfono 313 7381

Edificio 9, Biblioteca Central “Jorge Roa Martínez”

Cra. 27 No. 10-02 Los Álamos, Pereira, Colombia

www.utp.edu.co

Montaje y producción:

David Restrepo Suarez.

Universidad Tecnológica de Pereira

Impresión y acabados: Publiprint S.A.S

Reservados todos los derechos

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO 1.....	12
GENERALIDADES O FUNDAMENTOS BÁSICOS.....	13
La Biotecnología.....	13
Fermentaciones microbianas.....	17
Enzimas: generalidades, aislamiento y purificación.....	29
El ácido desoxirribonucleico (ADN).....	55
Células madre: generalidades.....	69
CAPÍTULO 2.....	95
HERRAMIENTAS CLAVE EN LA BIOTECNOLOGÍA.....	96
Inmovilización enzimática y sus aplicaciones.....	96
Producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico.....	114
Bacteriocinas: péptidos bioactivos con propiedad antimicrobial.....	144
CAPÍTULO 3.....	178
APLICACIONES EN LA BIOTECNOLOGÍA MÉDICA.....	179
La biotecnología como herramienta para la generación de vacunas de uso humano y animal.....	179
Aplicaciones clínicas de las células madre y de productos de células madre.....	219
Biomateriales y su aplicación en el campo de la Salud.....	285
Metagenómica y Metabólica: Generalidades y Potencial en Salud Humana.....	319
Plantas Medicinales.....	347
Actividad Biológica de Plantas de la Familia Bignoniaceae.....	363

FIGURAS

Figura 1.1. Bio-reactores comúnmente usados para fermentación en estado líquido (a) y fermentación en estado sólido (b).	21
Figura 1.2. Fermentación en estado líquido a escala de laboratorio.	21
Figura 1.3. Esquema del escalado de una fermentación microbiana a nivel industrial.	23
Figura 1.4. Separación de una mezcla de proteínas por cromatografía líquida.	31
Figura 1.5. Estructura general de un α - aminoácido. Los grupos amino (-NH ₂) y ácido carboxílico (-COOH) en medio acuoso se encuentran ionizados.	34
Figura 1.6. Formación de un enlace peptídico entre el grupo ácido carboxílico de un aminoácido. y el grupo amino de otro aminoácido.	36
Figura 1.7. Niveles de estructuración de las proteínas.	37
Figura 1.8. Proceso general para la purificación de enzimas a partir de una fermentación con microorganismos.	42
Figura 1.9. Esquema de un biorreactor.	42
Figura 1.10. Esquema general para la producción y purificación de enzimas.	43
Figura 1.11. Material biológico para la producción de enzimas.	44
Figura 1.12. Esquemización de la separación de biomoléculas por cromatografía.	50
Figura 1.13. Representación del homúnculo según Nicolas Hartsoeker. Modificado de Scott G	57
Figura 1.14. Microscopio utilizado por R. Hooke para observar las células de corcho.	58
Figura 1.15. Representación de un Cromosoma, histonas, doble hélice de ADN.	60
Figura 1.16. Dogma de la biología molecular.	62
Figura 1.17. Estructura de bases nitrogenadas y el nucleótido.	63
Figura 1.18. A. Estructura primaria del ADN enlaces fosfodiéster B. Estructura secundaria del ADN de doble hélice.	64
Figura 1.19. Células madre aisladas a partir de la masa celular embrionaria.	71
Figura 1.20. Típicos tejidos de los cuales son aisladas células madre mesenquimales.	75
Figura 1.21. Fuentes de células madre de origen dental, adaptado de Rivera-Cano.	78
Figura 1.22. Generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS), adaptada de Goldthwaite.....	80
Figura 1.23. Linajes celulares que pueden obtenerse a través de diferenciación de células madre.	81
Figura 1.24. Interacción entre un anticuerpo y un antígeno expresado por una célula madre.	83
Figura 1.25. Esquema de funcionamiento de un citómetro de flujo.	85
Figura 2.1. Descomposición del peróxido por la enzima catalasa.	96
Figura 2.2. Enzima inmovilizada mediante la técnica de atrapamiento en un poro.	99
Figura 2.3. Adsorción de una enzima a un soporte sólido.	100
Figura 2.4. Inmovilización enzimática mediante unión covalente.	101
Figura 2.5. Fenómeno de reticulación de una enzima.	102
Figura 2.6. Obtención del jarabe de maíz alto en fructuosa, conocido como HFCS (High Fructose Corn Syrup).	104
Figura 2.7. Estructura del aceite de palma.	104
Figura 2.8. Hidrólisis de triglicéridos por acción de una lipasa.	106
Figura 2.9. Triglicérido mayoritario de grasa de la leche humana (1,3-dioleoil-2-palmitoil glicerol).	107

Figura 2.10. Producción del Betapol®.	107
Figura 2.11. Esquema general de un biosensor.	108
Figura 2.12. Biosensor para la identificación de células cancerosas.	109
Figura 2.13. Biosensor electroquímico para la detección de compuestos tóxicos. ...	109
Figura 2.14. Inmovilización de proteínas - anticuerpos para técnicas de detección por ELISA.	110
Figura 2.15. Síntesis de insulina humana y producción de insulina humana recombinante.	119
Figura 2.16. Proceso de generación de una proteína recombinante.	121
Figura 2.17. Vector y componentes básicos.	125
Figura 2.18. <i>E. coli</i> , Bacteria Gram Negativa utilizada como sistema de expresión	127
Figura 2.19. <i>Saccharomyces sp</i> , Levadura utilizada como sistema de expresión.	128
Figura 2.20. Especies de parásitos del orden Trypanosomatida han sido utilizados para producción de proteínas recombinantes.	130
Figura 2.21. La planta <i>Morus sp</i> ha sido utilizada como plataforma de proteínas recombinantes.	131
Figura 2.22. Huevo, gusano y polilla del gusano de Seda <i>B. mori</i> . Plataforma de expresión de proteínas recombinantes.	131
Figura 2.23. Los roedores se encuentran entre los mamíferos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes.	132
Figura 2.24. Sistemas de expresión y métodos de transformación o transfección. ...	134
Figura 2.25. Línea de tiempo: Desarrollo investigativo de las bacteriocinas.	145
Figura 2.26. Modo de acción de las bacteriocinas, secuestro de moléculas importantes en la síntesis de peptidoglicano.	155
Figura 2.27. Modo de acción de las bacteriocinas, lisis directa de pared celular.	155
Figura 2.28. Modo de acción de las bacteriocinas, formación de poro en pared celular.	156
Figura 2.29. Modo de acción de las bacteriocinas, interrupción de procesos intracelulares.	156
Figura 3.1. Representación de la respuesta inmune primaria (primera exposición a un microbio) y de la respuesta inmune secundaria (re-exposición).	195
Figura 3.2. Proceso de producción de organismos vivos atenuados.	198
Figura 3.3. Desarrollo de vacunas de péptidos sintéticos.	199
Figura 3.4. Vacunas anti-idiotipo.	200
Figura 3.5. Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes.	201
Figura 3.6. Estructura de un plásmido.	207
Figura 3.7. Etapas del desarrollo de vacunas comestibles.	208
Figura 3.8. Origen de las células para el tratamiento en medicina regenerativa.	288
Figura 3.9. Representación de una célula madre y una célula diferenciada a hueso.	288
Figura 3.10. Ciclo típico en medicina regenerativa.	289
Figura 3.11. Estructura de los alginatos.	296
Figura 3.12. Estructura del ácido hialurónico.	297
Figura 3.13. Estructura de la agarosa.	297
Figura 3.14. Fotografía de esponjas obtenidas a partir de biomateriales para medicina regenerativa.	303
Figura 3.15. Árbol filogenético.	321
Figura 3.16. Componentes y estructura del ADN.	322
Figura 3.17. Representación del empaquetamiento de los genes y su ubicación.	323
Figura 3.18. Dogma central de la Biología Molecular.	324
Figura 3.19. Ciencias ómicas y sus analitos.	325

Figura 3.20. Mecanismo molecular de la fenilcetonuria.	326
Figura 3.21. Esquema de un análisis genómico.	328
Figura 3.22. Microbiota de varias áreas del cuerpo humano.	330
Figura 3.23. La microbiota del tracto gastrointestinal y las diferentes variables que afectan su composición.	332
Figura 3.24. Esquema de un análisis metabolómico.	339
Figura 3.25. Distribución geográfica de la familia Bignoniaceae.	364
Figura 3.26. Estructuras de compuestos con actividad biológica aislados de especies de la familia Bignoniaceae. A. Ácido Ferúlico. B. Beta-lapachona. C. Chrysin. D. Kaempferol (6→8") apigenin. E. Especiósido.	372

TABLAS

Tabla 1.1. Principales productos microbianos de interés comercial.	24
Tabla 1.2. Compuestos especializados no antibióticos producidos por microorganismos.	25
Tabla 1.3 Clasificación y nomenclatura de los 20 aminoácidos según la cadena lateral a pH fisiológico.	34
Tabla 1.4. Propiedades estructurales del ADN.	65
Tabla 1.5. Comparación del tiempo de procesamiento, concentración, rendimiento y pureza de ADN, por diferentes métodos. Modificada de Dundass N et al ¹¹	66
Tabla 2.1 Ventajas y desventajas de las bacterias y levaduras más usadas para la producción de proteínas recombinantes.	128
Tabla 3.1. Clasificación de los componentes del sistema inmune por moléculas, células y órganos.	184
Tabla 3.2. Principales ventajas y desventajas de las vacunas modernas.	210
Tabla 3.3. Lista de vacunas aprobadas, en proceso de aprobación o comercialización.	212
Tabla 3.4. Aspectos que deben ser resueltos mediante ensayos clínicos con células madre.	226
Tabla 3.5. Citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos presentes en los secretomas.	257
Tabla 3.6. Heterósidos y uso tradicional.	355
Tabla 3.7. Cumarinas más empleadas de acuerdo a su uso tradicional.	356
Tabla 3.8. Clasificación de las Quinonas y su uso tradicional.	357
Tabla 3.9. Terpenoides y usos tradicionales.	358
Tabla 3.10. Alcaloides de origen vegetal más importantes.	359
Tabla 3.11. Extractos y/o compuestos de la familia Bignoniaceae con actividad biológica.	379

INTRODUCCIÓN

La Biotecnología ha sido parte importante del desarrollo de la humanidad y constituye uno de los campos de la ciencia que más ha avanzado en los últimos años. Dentro de las múltiples áreas de la Biotecnología, en este libro nos hemos dedicado a evidenciar los avances en el área de la Biotecnología Roja, basados en la experiencia adquirida durante la ejecución del Programa “**DESARROLLO DE CAPACIDADES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADAS A LOS SECTORES DE LA SALUD Y LA AGROINDUSTRIA EN EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA**”, de la Universidad Tecnológica de Pereira y la Universidad Libre, Seccional Pereira, financiado por el Sistema General de Regalías de Colombia (Código BPIN 2012000100050).

El libro se encuentra distribuido en tres grandes capítulos, el primero de ellos relacionado con aspectos básicos como la clasificación de la Biotecnología, el estudio de las fermentaciones

microbianas, las enzimas y sus métodos de purificación, el estudio de los ácidos nucleicos y de las células madre. En el segundo capítulo, nos hemos enfocado en las herramientas de la Biotecnología como los procesos de inmovilización de enzimas, la producción de proteínas recombinantes y el estudio de los péptidos bioactivos. Finalmente, en el capítulo tres, nos enfocamos en las aplicaciones de la Biotecnología Roja o Médica, como las herramientas biotecnológicas para la producción de vacunas, las aplicaciones clínicas de las células madre, la aplicación clínica de los biomateriales, aplicaciones de la metagenómica y la metabolómica, finalizando con la importancia del estudio de las plantas medicinales en general y la actividad biológica de plantas del género *Tabebuia*, que ha sido ampliamente estudiada en la Universidad Tecnológica de Pereira.

Los autores han tratado de presentar la información compleja de una manera sencilla y comprensible para el público en general y, por lo tanto, consideramos que el libro podrá ser de utilidad para lectores de diversas disciplinas científicas, así como para estudiantes de pre y posgrado. Adicionalmente, consideramos que el libro será de utilidad para los docentes de la básica y la media, como texto para orientar los conceptos básicos y aplicaciones de la Biotecnología en sus estudiantes. Es importante mencionar que se procuró elaborar la mayoría de las figuras del libro.

Los autores.

1

CAPÍTULO
UNO

GENERALIDADES O FUNDAMENTOS BÁSICOS

La Biotecnología

Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

La Biotecnología es un área muy amplia en la cual se emplean procesos biológicos, células o componentes celulares con la finalidad de desarrollar nuevas tecnologías o productos que pueden tener aplicación en diferentes áreas como la medicina, la agricultura, la industria o la investigación, entre muchas otras aplicaciones. La biotecnología corresponde a la manipulación de organismos vivos o sus componentes para generar productos comerciales útiles para el hombre. A pesar de que el término “Biotecnología” es relativamente nuevo, se ha utilizado desde los inicios de nuestra civilización (en el proceso de domesticación y selección de plantas y animales para consumo humano), y ha sido pilar fundamental para el desarrollo de nuestra civilización. En las últimas décadas, se ha evidenciado el rápido avance de la biotecnología, convirtiéndose en uno de los sectores emergentes más importantes, con gran impacto sobre la economía mundial.

La Biotecnología incluye una gran cantidad de áreas como la bioquímica, genética, biología molecular, microbiología, inmunología, ingeniería de tejidos, entre muchas otras; y usa herramientas de diversas áreas del conocimiento como, por ejemplo, la ingeniería y las tecnologías de la información y la comunicación, para la generación de productos biotecnológicos.

Dados los múltiples sectores de aplicación de la Biotecnología, se han designado sus áreas principales mediante una clasificación empleando colores¹, como se indica a

continuación: blanca (industrial), verde (agricultura), azul (acuicultura y marina), roja (salud, médica, diagnóstico, farmacéutica), marrón (biotecnología de desiertos y regiones secas), rosada (patentes e invenciones), amarilla (alimentos y nutrición), dorada (bioinformática y bionanotecnología), y gris (bioprocesos y fermentaciones clásicas).

La **Biotecnología blanca** es aquella aplicada a procesos industriales y su objetivo es la creación de productos fácilmente degradables, que consuman menos energía y generen menos desechos durante su producción a través del uso de células y enzimas. La **Biotecnología verde** es aquella aplicada a los procesos agrícolas, como por ejemplo el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a plagas y enfermedades. Es importante indicar que la biotecnología verde se alinea con la generación de productos amigables con el medio ambiente (biofertilizantes, bioplaguicidas) e incluye el uso de plataformas vegetales para la producción de vacunas o proteínas de interés farmacológico². La **Biotecnología azul**, también denominada Biotecnología marina, se refiere a las aplicaciones de la biotecnología en los ambientes marinos y acuáticos, empleando los organismos completos o sus células o moléculas, como por ejemplo el uso del quitosano (presente en los caparazones de los crustáceos) para la generación de apósitos. La **Biotecnología roja** se refiere al uso de la biotecnología en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades nuevas y conocidas del ser humano. Algunos ejemplos son: la obtención de organismos para producir moléculas de interés biológico o farmacológico como los antibióticos, la insulina, eritropoyetina, el desarrollo de vacunas y nuevos fármacos (incluyendo los anticuerpos monoclonales). La **Biotecnología roja** también incluye el diagnóstico molecular de enfermedades, la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. La **Biotecnología marrón** se refiere al uso de la biotecnología en ambientes desérticos y regiones secas. La **Biotecnología rosada** se refiere a áreas de propiedad intelectual, patentes y bioseguridad de los procesos en los que interviene algún organismo vivo o alguna biomolécula

obtenida de ellos. La **Biotecnología amarilla** se refiere al uso de los organismos vivos y/o biomoléculas en la industria alimentaria. Principalmente, se basa en el uso de enzimas para la producción y procesamiento de los alimentos. La **Biotecnología dorada** se relaciona con el uso de las herramientas informáticas y modelos computacionales disponibles para el diseño de drogas, enzimas, rutas metabólicas (*in silico*); así como también novedosas nanoestructuras dentro de contextos biológicos. Por su parte, la **Biotecnología gris** tiene que ver con el uso de las herramientas de la ingeniería genética y la biología molecular para mejorar el medio ambiente (se incluye biorremediación, uso de biofiltros, entre otros aspectos).

La Biotecnología roja o médica ha sido importante en el desarrollo de estrategias para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas y ha permitido incluso el desarrollo de estrategias terapéuticas para enfermedades que previamente se consideraban no tratables³. Adicionalmente, la Biotecnología es clave para el estudio de los mecanismos responsables del desarrollo de patologías como la diabetes, enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea, el cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas, entre otras. Es importante mencionar que la Biotecnología ha impactado el área farmacéutica y actualmente la biofarmacéutica ha permitido el desarrollo de un gran número de medicamentos como los anticuerpos monoclonales humanizados y la producción de proteínas con potencial terapéutico como insulina y eritropoyetina, entre otros. Además, la Biotecnología ha permitido el avance de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos mediante la generación de nuevos biomateriales, muchos de los cuales se encuentran actualmente en uso clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kafarski P. Rainbow code of biotechnology. *Chemik*. 2012; 66:814– 6.
2. Cardona-Ospina JA, Sepúlveda-Arias JC, Mancilla L, Gutiérrez-López LG. Plant expression systems, a budding way to confront chikungunya and Zika in developing countries. *F1000Res*. 2016 Aug. 31; 5:2121.
3. Biotechnology Industry Organisation. Healing, fuelling, feeding: how biotechnology is enriching your life. 2010. Available from: <https://www.bio.org/sites/default/files/ValueofBiotech.pdf>

Fermentaciones microbianas

Jhon Jairo Melchor-Moncada; Alcira Socarrás-Cárdenas; Luz Eliana Mantilla-Muriel; Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

La revolución biotecnológica ha influenciado la industria química y/o farmacéutica, haciendo posible la producción de manera más económica, ya que utiliza otro tipo de materias primas a la industria del petróleo¹. Entre estos procesos biotecnológicos está la fermentación, la cual se basa en la utilización de fuentes renovables con un bajo impacto ambiental y en su mayoría sin generación de residuos peligrosos, siendo esta definida como un proceso o técnica biotecnológica en la cual un microorganismo, por acción enzimática, transforma un producto en otro; se puede citar la transformación de un carbohidrato, como el almidón o el azúcar, en otros compuestos como alcoholes o ácidos bajo la acción de las enzimas secretadas por una levadura. En este sentido, los productos finales de este proceso son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones. Este proceso fue descubierto por Pasteur, que la describió como “*la vie sans l’air*” (la vida sin el aire) debido a la propagación de levadura en un líquido carente de oxígeno²⁻⁴.

Con la aplicación de la biotecnología en el campo de las fermentaciones, se ha obtenido un mejoramiento de los procesos y técnicas tradicionales. La fermentación en la industria, hoy en día, tiene amplias aplicaciones y usos, entre los productos generados, se encuentran: bebidas alcohólicas, enzimas, alimento y aditivos para alimentos, vitaminas, vacunas, antibióticos, etc., ya que las técnicas de fermentación funcionan con bacterias, hongos filamentosos, levaduras y algas unicelulares⁵.

Antecedentes

Si revisamos la historia de la humanidad, podemos encontrar y comprobar que el ser humano ha utilizado las fermentaciones durante muchos años sin conocer la existencia de los microorganismos y el papel que éstos han desarrollado en nuestras vidas. Un caso particular lo encontramos, por ejemplo, en la antigua Mesopotamia, donde se utilizó la fermentación en la producción de vino, cerveza o pan para su consumo diario⁶.

Se conoce que en el año 20.000 a. C., en los pueblos primitivos, se preparaban bebidas con grado alcohólico utilizando diferentes zumos de frutas. Fue hacia el 6.000 a. C. que los egipcios heredaron estos métodos, perfeccionándolos y, de esta manera, elaboraron pan y cerveza a partir de cebada o trigo. Estos métodos de elaboración de vino y cerveza también se extendieron a Mesopotamia y China hacia el año 3.000 a. C. hasta aproximadamente el año 1.070 a. C., donde se desarrollaron tecnologías de la elaboración, por ejemplo, de vinagre a partir de zumos de frutas fermentados, elaboración de cerveza y la fabricación de quesos y leches fermentadas. La cabra y la oveja fueron los primeros animales en domesticarse, razón por la cual los primeros quesos se desarrollaron a partir de la leche fermentada de estos animales⁷.

Hasta el siglo XVII, se producía vinagre cuando se dejaba el vino expuesto al aire durante un tiempo prolongado, ignorando la causa o intervención de las bacterias en este proceso. Gracias a las investigaciones de Pasteur en 1864, se encontró que el ácido acético o vinagre era producido por unos microorganismos llamados "*mycoderma aceti*". Posteriormente, Pasteur realizó una modificación al proceso original tomando el nombre de Método Orleans. En este método se utilizan toneles de madera y se llenan con vino y vinagre en igual proporción. A medida que transcurre el tiempo ésta mezcla se acidifica y se produce vinagre, retirándose

una parte y se llena nuevamente con vino. Un inconveniente de este método es su velocidad de transformación, ya que toma entre 2 y 6 semanas, por lo que es un proceso lento⁸.

Todo lo que conocemos hoy en día como fermentación, comenzó a entenderse con Antoine- Laurent Lavoisier (743-1794). Él demostró que, a través de una simple transformación química de azúcar en alcohol, podría reemplazarse el concepto de *entidad misteriosa* a la cual se le atribuían estos procesos. Louis Pasteur (Dole, Francia, 1822 - Marnes-la-Coquette, 1895) fue un químico y bacteriólogo francés, el cual es considerado el fundador de la microbiología y de la medicina moderna. Preocupado por dar solución a las dificultades técnicas que se presentaban en la industria vinícola y de cerveza en la región, comenzó sus investigaciones sobre fermentación, permitiéndole determinar y validar el supuesto que las levaduras eran microorganismos responsables de la generación de alcohol en procesos fermentativos y, además, le permitió verificar que las bacterias eran las responsables de que se generaran otras sustancias durante la fermentación. El experimento que realizó Pasteur consistió en elevar la temperatura antes del proceso fermentativo, sometiendo el jarabe a altas temperaturas y de esta manera pudo evitar la presencia de bacterias indeseables^{7,8}.

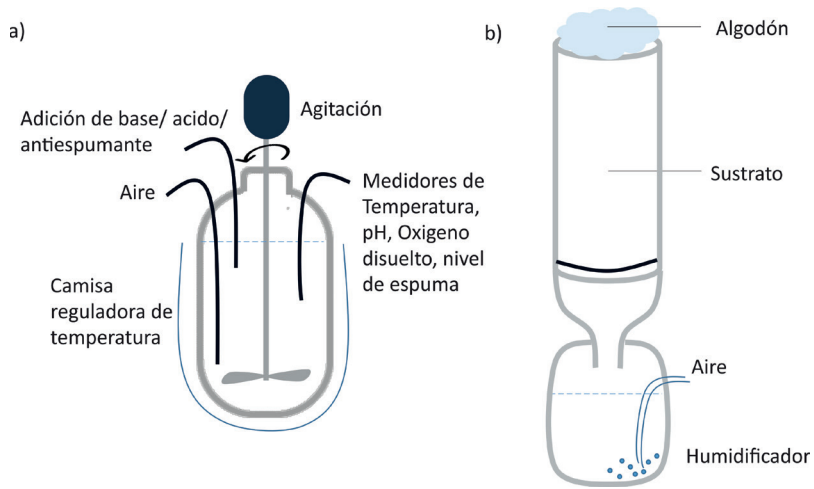
Hasta finales del siglo XIX, se tenía aceptado el concepto de que los procesos que ocurren en la naturaleza y en la vida eran consecuencia de fenómenos que se daban a nivel celular y de una fuerza divina. En 1896 esto fue desacreditado por un experimento, el cual dio origen a lo que hoy conocemos como Bioquímica: combinación de bio (vida) y química^{7,9}. Este desarrollo lo realizó Eduard Buchner y observó que se formaban burbujas en la parte superior de la mezcla de fermentación, lo cual le recordó lo que había propuesto Pasteur sobre fermentación sin aire. La hipótesis de Buchner fue la siguiente: los procesos fermentativos ocurren debido a la actividad de la *zimasa* (enzima). Ahora se conoce que este proceso se lleva a cabo por enzimas: glicólisis (*glycos*: dulce,

lysis: ruptura). Todos éstos descubrimientos le permitieron a Eduard Buchner recibir el premio Nobel de Química en el año 1907^{7,8,10,11}.

Métodos generales de fermentación

La fermentación microbiana es proceso mediante el cual se utilizan microorganismos para la producción de ciertos metabolitos (enzimas, proteínas, alcoholes, entre otros) a partir de nutrientes orgánicos, bien sea en presencia de oxígeno (aerobio) o en ausencia de oxígeno (anaerobio). Existe una gran variedad de microorganismos utilizados para la producción de metabolitos de interés, del sistema eucariótico son las levaduras y hongos, mientras que para el sistema procariótico son las bacterias gram-positivas y gram-negativas. Lo anterior, se debe a que presentan un fácil manejo, se pueden cultivar en ausencia de luz y tienen alta tasa de crecimiento. Por otro lado, la selección del microorganismo ideal es muy importante para que el proceso fermentativo sea exitoso y se basa en que el crecimiento sea rápido, produzca los metabolitos de interés cerca a la temperatura ambiente, mientras el consumo de nutrientes provenga de fuentes económicas y por supuesto que sean inofensivos para el ser humano. También se debe tener presente que el proceso fermentativo, requiere conocimiento tanto de ingeniería química como de microbiología, para un proceso eficiente. En la actualidad, son utilizados dos métodos de fermentación conocidos como: fermentación en estado líquido y fermentación en estado sólido, los cuales se ilustran en la **Figura 1.1**^{12,13}.

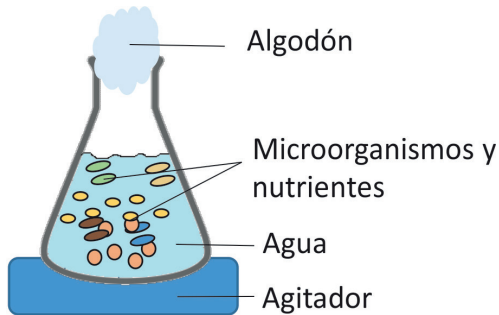
Figura 1.1. Bio-reactores comúnmente usados para fermentación en estado líquido (a) y fermentación en estado sólido (b).



Fuente: elaboración propia.

Fermentación en estado líquido

Figura 1.2. Fermentación en estado líquido a escala de laboratorio.



Fuente: elaboración propia.

Este proceso se realiza con exceso de agua, en donde se usa un recipiente con agitación, interna o externa, con capacidad desde pocos mililitros hasta miles de litros que contiene el microorganismo con los nutrientes (**Figura 1.2**). En este proceso se deben controlar parámetros como pH, oxígeno disuelto, temperatura, agitación, tiempo de fermentación y la formación

de espuma; por tanto, las condiciones del proceso deben de estar optimizadas para producir la mayor cantidad de metabolitos de interés. La fermentación en estado líquido es el proceso más utilizado a nivel industrial, debido a la facilidad en el escalado, comparado con la fermentación en fase sólida. Además, el escalado del proceso de fermentación aerobio (con presencia de oxígeno) tiene más variaciones que el anaerobio (en ausencia de oxígeno), debido a que se deben de tener controlados los valores de oxígeno durante todo el proceso de fermentación^{12,14}.

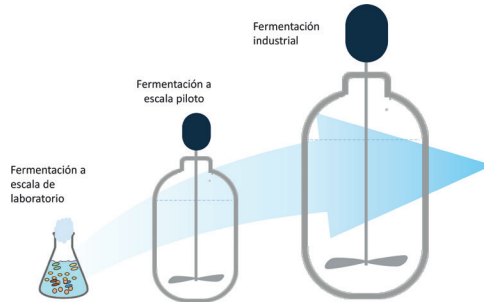
Fermentación en estado sólido

Este método de fermentación es particularmente reciente y se realiza en casi ausencia de agua, por lo que genera menos residuos. Los nutrientes empleados con este método son generalmente residuos agroindustriales y son varios los factores que se deben controlar, como el tipo de nutriente, el tamaño de partícula, el tiempo de cultivo y el nivel de humedad inicial. Sin embargo, pequeñas partículas pueden aglomerarse, interfiriendo con la aireación microbiana y con el proceso de fermentación, dado que no se ha desarrollado un sistema eficiente que permita controlar los parámetros para este tipo de fermentación, todavía existen pocas aplicaciones a nivel industrial de este tipo de fermentación¹³.

Control de la fermentación

Los fermentadores son parecidos a un reactor químico, en donde son controlados los parámetros críticos del proceso, tales como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, nivel de espuma, coeficientes de transferencia de masa y calor. Cuando estos parámetros han sido optimizados a escala de laboratorio, el proceso está listo para la producción a escala industrial, como se observa en la **Figura 1.3**. Por lo tanto, el monitoreo de estos parámetros es importante para obtener resultados reproducibles, por ello se emplean sensores especializados^{13,14}.

Figura 1.3. Esquema del escalado de una fermentación microbiana a nivel industrial.



Fuente: elaboración propia.

Microorganismos mejorados

Se sabe que no todos los microorganismos tienen la capacidad de producir cantidades deseables de metabolitos para aplicaciones industriales, por lo que se han realizado mejoras con herramientas clásicas o moleculares con el fin de obtener cepas de microorganismos hiperproductoras del metabolito de interés. Estas mejoras han sido realizadas por métodos como la mutación de cepas y la tecnología del ADN recombinante, lo que disminuye costos y aumenta la productividad¹⁵.

Importancia de las fermentaciones en el sector salud

Desde la edad de oro de la microbiología (1857-1914), se atribuyó a los microorganismos la causa de las denominadas enfermedades infecciosas, se comenzó a mejorar el aislamiento y la comprensión del metabolismo microbiano. En 1928 Alexander Fleming descubre la Penicilina como producto del metabolismo del hongo filamentoso *Penicillium*, pero 12 años después el bioquímico alemán Ernest Boris Chain y el farmacólogo Australiano Howard Walter Florey desarrollaron un método de purificación de la Penicilina que permitió su síntesis y distribución a nivel mundial. En la actualidad, la comprensión del metabolismo microbiano ha llevado a otro nivel la farmacología donde procesos de fermentación microbiana más estructurados son llevados a

cabo, para producir a gran escala nuevos metabolitos que van direccionados a solucionar problemas de salud humana, un ejemplo es la producción de insulina a partir de transformación microbiana^{14,15,16}. Los productos comerciales utilizados por el ser humano que son obtenidos de procesos fermentativos son resumidos en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1. Principales productos microbianos de interés comercial.

SUSTANCIAS	MICROORGANISMOS
Productos Industriales	
Etanol (a partir de glucosa)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
Etanol (a partir de lactosa)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Acetona y butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Enzimas	<i>Aspergillus, Bacillus, Mucor, Trichoderma</i>
Productos agrícolas	
Giberelinas	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Aditivos alimentarios	
Aminoácidos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Ácidos orgánicos	<i>Aspergillus niger</i>
Nucleótidos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Polisacáridos	<i>Xanthomonas</i>
Productos médicos	
Antibióticos	<i>Penicillium, Streptomyces, Bacillus</i>
Alcaloides	<i>Claviceps purpurea</i>
Insulina, hormona de crecimiento humana	<i>E. coli, Sacharomyces cerevisiae</i> y otros (tecnología del DNA recombinante)
Biocombustibles	
Hidrógeno	Microorganismos fotosintéticos
Metano	<i>Methanobacterium</i>
Etanol	<i>Zymomonas</i>

Fuente: elaboración propia.

Además de los productos a gran escala que se han producido durante la última mitad del siglo XX (**Tabla 1.1**), como los antibióticos, aminoácidos y ácidos orgánicos, los microorganismos se usan para la producción de compuestos especializados no antibióticos enfocados a la salud humana (**Tabla 1.2**). Estos incluyen las hormonas, agentes antitumorales e inmunomoduladores, ionóforos y compuestos especiales que producen las bacterias, hongos, protistas, insectos y plantas.

Tabla 1.2. Compuestos especializados no antibióticos producidos por microorganismos.

Tipo de compuesto	Fuente	Producto específico	Proceso
Estatinas	<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina	Agente reductor del colesterol
	<i>Penicillium citrinum</i>	Paravastatina	Agente reductor del colesterol
	<i>Actinomyces</i>		
Inhibidores de enzimas	<i>S. clavaligerus</i>	Ácido clavulánico	Inhibidor de penicilinas
	<i>Actinoplanes sp</i>	Acarbosa	Inhibidor de la glucosidasa intestinal (disminuye la hiperglucemia y la síntesis de triglicéridos)
	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina A	Transplante de órganos
Inmunosupresores	<i>S. tsukubaensis</i>	FK-506	Transplante de órganos
	<i>S. hygroscopicus</i>	Rapamicina	Transplante de órganos
	<i>S. peniceticus subsp. caesius</i>	Doxorrubicina	Tratamiento del Cáncer
Agentes antitumorales	<i>S. peniceticus</i>	Daunorrubicina	Tratamiento del Cáncer
	<i>S. caesiosus</i>	Mitomicina	Tratamiento del Cáncer
	<i>S. verticillus</i>	Bleomicina	Tratamiento del Cáncer

Fuente: elaboración propia.

Perspectivas en el Departamento de Risaralda

El Departamento de Risaralda, a través del nodo de Biotecnología, proyecto que está en el marco de la Red de Nodos Ciencia y Tecnología, está formando alianzas con sectores académicos y de empresarios con el propósito de apuntar a la convocatoria de INNpuls Colombia, que le permita obtener recursos para desarrollar dicho nodo biotecnológico.

El Grupo Infección e Inmunidad y el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica

de Pereira han enfocado su investigación en tres áreas principales: Biotecnología, Medicina Genómica y Microbiología. En el área de la biotecnología se ejecutó un proyecto en el cual se utilizó un biorreactor para producir mediante un proceso fermentativo una enzima (Serratiopeptidasa), producida por la bacteria *Serratia marcescens*, aislada del intestino del gusano de seda *Bombyx mori*, con actividad fibrinolítica y antiinflamatoria. En el proceso de fermentación se han aprovechado los residuos de la industria sericícola de la región como medio de cultivo y nutrientes para llevar a cabo el proceso en unas condiciones de operación específicas. Se realizó la caracterización bioquímica de la enzima (incluyendo la secuenciación de dicha proteína) así como de sus parámetros cinéticos¹⁷.

Bibliografía

1. Kirk O, Borchert TV, and Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 345–351.
2. Lehninger AL, Cox MM, and Nelson DL. *Lehninger principles of biochemistry.* 7th Ed. W.H. Freeman and Company. New York. 2013.
3. Francine É, Moreira AM, Dallago RM, Treichel H, Oliveira C, Machado TP, et al. Bioresource technology production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. *Bioresour Technol.* 2017; 225: 134–141.
4. Singh-Dhillon G, Kaur S. *Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production. Apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass.* 1st Ed. Academic Press. Canada. 2016.
5. Brahmachari G, Demain AL, Adrio JL *Biotechnology of microbial enzymes. Production, biocatalysis and industrial applications.* 1st Ed. Academic Press. India. 2016.
6. Hugh J. *Vintage: The story of wine.* 1st Ed. Simon and Schuster. New York. 1989.
7. Holmes FL. *Lavoisier and the chemistry of life. An exploration of scientific creativity.* 1st Ed. Univ of Wisconsin Press. England. 1986.
8. Sáez-Gómez JM. *Un benefactor universal: Pasteur.* 1st Ed. Nivola Libros y Ediciones. 2004.
9. Aragón JJ. *Un recorrido por el nacimiento de la enzimología y los orígenes de la Bioquímica actual.* Universidad Autónoma de Madrid: Fundación General. 2009; 11:15-24.

10. Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. Biochemistry. 6th Ed. W. H. Freeman and Company. New York. 2007.
11. Rodwell VW, Weil PA, Botham KM, Bender D, and Kennelly PJ. Harpers illustrated biochemistry. 30th Ed. McGraw-Hill Education. 2015.
12. Arora S, Rani R, Ghosh S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. J Biotechnol. 2018; 269: 16–34.
13. Durand A. Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochem Eng J. 2003; 13: 113–125.
14. Larroche C, Sanromán MÁ, Du G, and Pandey A. Current developments in biotechnology and bioengineering. Bioprocesses, bioreactors and controls. 1st Ed. Elsevier. 2017.
15. Pandey A, Negi S & Soccol CR. Current developments in biotechnology and bioengineering. Production , isolation and purification of industrial products. 1st Ed. Elsevier. 2017.
16. Janson JC. Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications. 3th Ed. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ. 2011.
17. Vélez-Gómez JM, Melchor-Moncada JJ, Veloza LA, Sepúlveda-Arias JC. Purification and characterization of a metalloprotease produced by the C8 isolate of *Serratia marcescens* using silkworm pupae or casein as a protein. Int J Biol Macromol. 2019; 135:97-105.

Enzimas: generalidades, aislamiento y purificación

Jhon Jairo Melchor-Moncada; Lida Inés Mancilla; Jenny Marcela Vélez-Gómez; Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

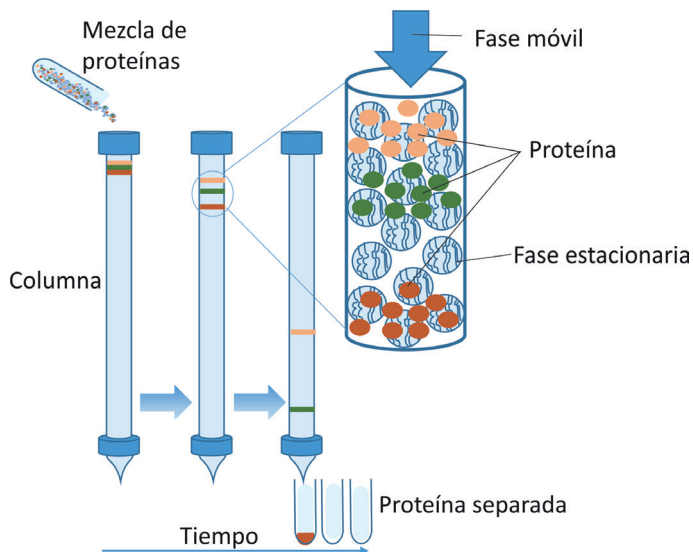
Introducción

Las enzimas son moléculas producidas por los seres vivos con la función de catalizar o acelerar los procesos biológicos. La mayoría de ellas son proteínas y comercialmente las más comunes se obtienen del medio intra y extracelular de hongos, bacterias o de material animal o vegetal¹⁻³. En el campo biotecnológico, las enzimas son de gran importancia por su aplicación en procesos del sector industrial como la producción de alimentos, procesamiento de cuero, industria química; así como la elaboración de fármacos de uso humano o veterinario^{4,5}. En estos procesos se requiere un alto nivel de pureza de la enzima para la generación de productos de alta calidad y la optimización de los procesos industriales⁵. Un ejemplo del uso de enzimas en la industria alimentaria es la lactasa, la cual es de gran utilidad en la producción de lácteos. La lactasa es necesaria para la degradación de la lactosa, disacárido presente en la leche, en las dos unidades que lo conforman: glucosa y galactosa⁶. La lactasa mejora la digestibilidad de la lactosa en las personas que carecen de la enzima. La fermentación de azúcar a alcohol mediante el uso de microorganismos como levaduras es otro ejemplo de procesos biotecnológicos⁴. En el campo biológico y biomédico básico, el aislamiento de las enzimas permite comprender su comportamiento metabólico o identificar un producto derivado de una ruta del metabolismo, realizar el diagnóstico de enfermedades asociadas con deficiencia enzimática o usarse como fármaco. Es evidente que el aislamiento y purificación de las enzimas de interés comercial son procesos de gran importancia para la caracterización o estudio de sus

propiedades físicas y químicas. La optimización en la estrategia de obtención y purificación enzimáticas es clave para el uso de las enzimas en diferentes campos, incluyendo el uso biomédico⁷.

El proceso para obtener una enzima, con un nivel relativamente alto de pureza, incluye varias etapas consecutivas a partir de una matriz compleja o extracto celular, que contiene una gran cantidad de otras enzimas y otros tipos de moléculas como lípidos y carbohidratos⁸. Debido a que cada etapa de purificación involucra pérdidas en la enzima de interés, se busca establecer una estrategia óptima en la purificación de este tipo de biomoléculas que permita obtener el más alto nivel de pureza en el menor número de etapas⁹. En la purificación de las enzimas se emplean estrategias que implican métodos basados en diferencias de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las enzimas, como su forma, solubilidad en solventes específicos, peso molecular y carga eléctrica. El método más empleado para purificar las enzimas es la cromatografía, técnica que separa las moléculas de acuerdo a las diferencias de interacción con una fase estacionaria (presente en una columna) y una móvil (representada por un líquido o solvente)¹⁰. En esta técnica las moléculas se separan debido a la diferencia de afinidad o interacción con la fase estacionaria, de manera que las moléculas que posean una interacción más fuerte con la fase estacionaria (constituyente de la columna) serán retenidas, tomando más tiempo para su salida que aquellas con una interacción débil. Como resultado final, cada molécula tendrá un tiempo de salida o elución, separándose de las demás (**Figura 1.4**). Además de la cromatografía, existen procedimientos más sencillos que se emplean para purificar las enzimas. Algunos de estos procedimientos de purificación se basan en la precipitación selectiva o pérdida de la solubilidad de la proteína⁵. La precipitación de la enzima se puede lograr modificando el pH o la temperatura del medio en donde se encuentra o por tratamiento con ciertas soluciones de sales en altas concentraciones. En este capítulo, se presentan las propiedades físicas y químicas de las enzimas, así como las técnicas más empleadas para el aislamiento y purificación de las mismas.

Figura 1.4. Separación de una mezcla de proteínas por cromatografía líquida.



Fuente: elaboración propia.

Antecedentes

La propiedad de las enzimas de acelerar las reacciones químicas de los seres vivos o catálisis biológica, es conocida desde finales del siglo XVIII, gracias a los estudios realizados por Spallanzani, quien demostró que es posible lograr la digestión de carne empleando secreciones del estómago. Alrededor de 1897, Eduard Buchner demostró que la fermentación de azúcar en alcohol, con extractos de levadura libre de células, era realizada por moléculas activas. Fue entonces que Frederick Wilhelm Kühne utilizó por primera vez el término “enzimas” para referirse a las moléculas detectadas por Buchner. Más tarde, en 1926, James Sumner cristalizó la enzima ureasa y postuló que era una proteína simple, concluyendo que las enzimas son proteínas. Sin embargo, por la ausencia de otros estudios, esa idea permaneció sin confirmar hasta la década de 1930, cuando John Northrop y Moses Kunitz aislaron una serie de enzimas digestivas y demostraron que eran proteínas.

A partir de 1940, el número de enzimas obtenidas con alto grado de pureza se incrementó, debido al aumento en la eficiencia de los métodos de purificación para la obtención de enzimas intracelulares. El desarrollo de técnicas de purificación y análisis de la estructura tridimensional de las proteínas permitió el incremento en el aislamiento de nuevas enzimas, así como la determinación de sus características estructurales y sus mecanismos de acción^{1,2,11}.

La identificación de la estructura de los 20 aminoácidos que conforman las proteínas se logró a principios del siglo XX. El desarrollo de las técnicas de secuenciación de proteínas hizo posible que en 1951 Sanger y Tuppy obtuvieran la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la insulina, hormona que regula la concentración de glucosa en la sangre, demostrando por primera vez que las proteínas tienen una única estructura primaria. Paralelamente, en 1950, Pehr Edman desarrolló un proceso químico de secuenciación de aminoácidos que fue automatizado en 1967. La primera enzima intracelular secuenciada fue la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que se conforma de 330 aminoácidos, denominados residuos de aminoácidos. A mediados del siglo XX, una nueva técnica, conocida como espectrometría de masas, permitió mejorar el proceso de secuenciación de las enzimas. En la misma época, el desarrollo de la técnica de cristalización de las proteínas y su análisis por cristalografía de rayos X, permitieron la comprensión de la función y estructura de las enzimas. Desde entonces, el proceso continúa con el creciente desarrollo en herramientas técnicas e informáticas^{2,3,11}.

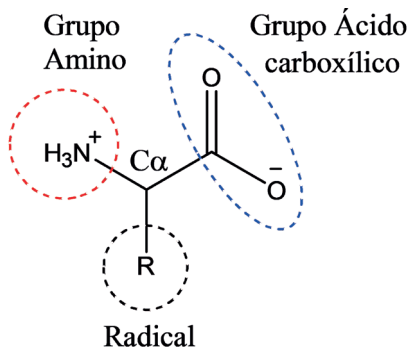
Las enzimas son, en su gran mayoría, de naturaleza proteica, a excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalíticas que, junto con los carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, conforma las principales macromoléculas de los seres vivos o biomoléculas^{1,2,5,6}. Antes de hablar de la separación y purificación de las enzimas, es importante entender la estructura

y propiedades de estas biomoléculas, para luego ocuparnos de las técnicas utilizadas para el aislamiento y posterior purificación de las enzimas.

Propiedades y estructura de las proteínas

Las proteínas están compuestas por unidades básicas denominadas aminoácidos (aa). Existen 20 diferentes aminoácidos, que a su vez pueden estar presentes en las proteínas en diferentes cantidades. Cada aminoácido se conforma de una estructura básica que contiene un carbono central o carbono alfa (α) al cual se unen cuatro grupos diferentes o sustituyentes que le dan sus propiedades específicas. Estos grupos son: un grupo amino ($-\text{NH}_2$, grupo funcional con comportamiento básico), un grupo ácido carboxílico ($-\text{COOH}$, grupo funcional ácido), un hidrógeno y un grupo radical o cadena lateral que es específico para cada aminoácido, otorgándole sus propiedades físicas y químicas (-R) (**Figura 1.5**)^{6,11}. Las diferencias entre aminoácidos se deben al grupo radical -R que varía en estructura, tamaño y carga eléctrica, lo que confiere a la molécula una solubilidad particular en agua. Dependiendo del radical -R, los aa se pueden clasificar en alifáticos y aromáticos, teniendo en cuenta la estructura del radical o de acuerdo al tipo de enlaces e interacción de estos con el agua en polares y por consiguiente hidrofílicos (o solubles en agua) y no polares (es decir, hidrofóbicos o insolubles). Los aminoácidos hidrofílicos o polares pueden ser clasificados de acuerdo a su carga eléctrica al pH fisiológico (7,3-7,4) como neutros o con carga eléctrica. Estos últimos, a su vez, se clasifican de acuerdo a la carga eléctrica; con carga negativa (los que presentan grupos ácidos) y con carga positiva (aquellos que poseen grupos básicos)^{1,3,10}. En la **Tabla 1.3** se puede observar el nombre, el símbolo de tres letras y de una letra para los 20 aminoácidos, así como su clasificación.

Figura 1.5. Estructura general de un α -aminoácido. Los grupos amino ($-\text{NH}_2$) y ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) en medio acuoso se encuentran ionizados.



Fuente: elaboración propia.

Tabla 1.3 Clasificación y nomenclatura de los 20 aminoácidos según la cadena lateral a pH fisiológico.

Aminoácido	Abreviación / Símbolo
Aromáticos	
Fenilalanina	Phe / F
Tirosina	Tyr / Y
Triptófano	Trp / W
Neutros polares o hidrófilos	
Serina	Ser / S
Treonina	Thr / T
Cisteína	Cys / C
Asparagina	Asn / N
Glutamina	Gln / Q
Neutros no polares o hidrófobicos	
Glicina	Gly / G
Alanina	Ala / A
Prolina	Pro / P
Valina	Val / V
Leucina	Leu / L
Isoleucina	Ile / I
Metionina	Met / M

Con carga negativa o ácidos	
Aspartato	Asp / D
Glutamato	Glu / E
Con carga positiva o básicos	
Lisina	Lys / K
Arginina	Arg / R
Histidina	His / H

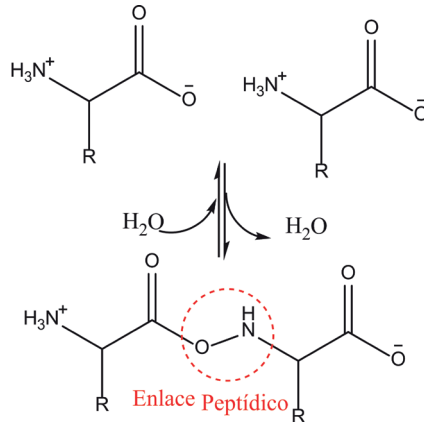
Fuente: elaboración propia.

En solución acuosa, debido a la presencia de un grupo funcional amino y uno ácido carboxílico, los aminoácidos presentan un comportamiento **anfótero**, es decir, presentan simultáneamente carga positiva y negativa de acuerdo al pH de la solución. Su carga eléctrica neta varía con el pH siendo positiva cuando el pH es cercano a 1, negativa si el pH es mayor que 8 o cero. La carga eléctrica de un aminoácido es cero cuando se encuentra en un pH, donde las cargas positivas debido a los grupos aminos protonados, presentes en el carbono alfa o la cadena lateral, son iguales a las negativas producidas por la disociación de los grupos carboxilo, encontrados en el carbono alfa o la cadena lateral o radical R. Este pH se conoce con el nombre de pH o **punto isoelectrico (PI)**^{3,5,6}.

Las proteínas se conforman por la unión de varios aminoácidos, mediante un enlace covalente llamado **enlace peptídico** (*Figura 1.6*), la carga eléctrica y otras propiedades de los aminoácidos se extienden a estas macromoléculas, sin embargo, sólo los grupos ionizables de la cadena lateral aportan a la carga eléctrica de la proteína, debido a que este enlace involucra la participación de los grupos amino y carboxilo del carbono α . Durante la formación del enlace peptídico se produce la pérdida de una molécula de agua, razón por la cual el aminoácido que conforma la cadena de la proteína se conoce como residuo de aminoácido. La unión de pocos aminoácidos mediante el enlace peptídico permite la formación de oligopéptidos. Cuando el número de aminoácidos es menor a 50, las moléculas producidas

se denominan péptidos. Un polipéptido está formado por menos de 100 residuos de aminoácidos, mientras que se definen como proteínas a moléculas conformadas por más de 100 residuos de aminoácidos^{2,6,9,12}.

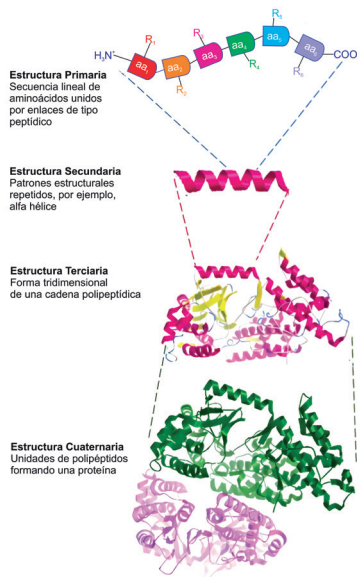
Figura 1.6. Formación de un enlace peptídico entre el grupo ácido carboxílico de un aminoácido. y el grupo amino de otro aminoácido.



Fuente: elaboración propia.

Se pueden identificar cuatro niveles estructurales en las proteínas, a saber: estructura primaria, secundaria, terciaria y en algunas proteínas existe una estructura cuaternaria, como se esquematiza en la **Figura 1.7**. La secuencia lineal de aminoácidos, que representa el tipo y orden en que se unen los diferentes aminoácidos que la conforman, se refiere a la **estructura primaria**, la cual determina la función biológica de la misma y la estructura tridimensional que adopta, por tanto, diferentes proteínas tienen diferentes secuencias de aminoácidos y cualquier cambio en este nivel estructural se traduce en una proteína anormal.

Figura 1.7. Niveles de estructuración de las proteínas.



Fuente: elaboración propia.

La interacción por puentes o enlaces de hidrógeno entre los grupos polares del enlace peptídico de los residuos de aminoácidos, da como resultado una conformación estable con patrones estructurales repetidos o estructura secundaria, como es la hoja plegada beta, giros beta y alfa hélice. Las interacciones entre grupos funcionales diferentes de las cadenas laterales o radical de aminoácidos ubicados distantes en la cadena, permite la generación de diversas conformaciones con arreglos tridimensionales en la proteína. Estas interacciones pueden ser enlaces débiles como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, enlaces o atracciones entre grupos polares o con cargas eléctricas opuestas, e incluso enlaces covalentes como enlaces disulfuros. Lo que permite que las cadenas de polipéptidos adopten una estructura tridimensional o **estructura terciaria**. Por último, la **estructura cuaternaria** se genera cuando una proteína se compone de dos o más cadenas polipeptídicas unidas por interacciones fuertes como atracciones polares, cargas eléctricas opuestas o enlaces covalentes entre grupos R de la cisteína por puentes disulfuro^{1,2,11}. A continuación, trataremos los aspectos relacionados con las enzimas.

Las enzimas

Las **enzimas** son consideradas las proteínas especializadas más importantes que catalizan las reacciones químicas de los seres vivos, sin modificar su propia estructura o consumirse durante la reacción que catalizan. Solo catalizan reacciones que son posibles, pero aumentando en unidades de miles la velocidad de reacción. No alteran las constantes de equilibrio de las reacciones que catalizan. Son altamente específicas y producen solamente un compuesto o producto a partir de los reactantes o sustratos. Algunas enzimas muestran una especificidad más amplia, hacia un grupo de sustratos similares estructuralmente. Las enzimas son sensibles a factores ambientales, de tal manera que su velocidad de catálisis se afecta o modifica por cambios en el pH y la temperatura. También las afecta la concentración de sales o la fuerza iónica del medio. Las enzimas son reguladas, es decir que su actividad puede incrementarse o reducirse de acuerdo a las necesidades de la célula^{4,6}.

Las enzimas poseen una región de su secuencia conocida como sitio activo, con especificidad para interaccionar con sustratos, a los cuales transforma. El sitio activo tiene la capacidad de disminuir la energía de activación de las reacciones (energía necesaria para iniciar la reacción) para que sucedan en tan solo segundos, con alta eficiencia y selectividad, bajo condiciones suaves de temperatura y pH, en soluciones acuosas. La actividad biológica de las enzimas depende de la integridad de la conformación tridimensional o nivel estructural terciario, llamada conformación **nativa**. Por esta razón, la pérdida de la estructura terciaria de la enzima, como la disociación de sus cadenas polipeptídicas, generalmente, afecta su actividad catalítica. Esta actividad se pierde completamente cuando los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de la proteína se rompen. En síntesis, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las enzimas son de vital importancia para la actividad catalítica de las mismas^{1,5,13}.

Las enzimas tienen pesos moleculares que se encuentran en un rango desde 12 kDa hasta 1.000 kDa. Algunas enzimas están compuestas solamente por aminoácidos y pueden realizar su función biológica completa, mientras que otras necesitan de un componente químico adicional para realizar su función catalítica. A este complemento necesario para la actividad enzimática se le denomina **cofactor**, cuando se trata de un compuesto inorgánico, que pueden ser uno o más iones inorgánicos como el Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , o **coenzima**, si se trata de una molécula orgánica de mayor peso molecular. Las coenzimas que generalmente son producidas en nuestro organismo son productos derivados de las vitaminas^{2,3}.

Principios generales de nomenclatura

Existen dos nomenclaturas oficiales para las enzimas, la primera es el nombre común o recomendado y la segunda es el nombre sistemático. El nombre sistemático, consiste de dos partes: la primera contiene el nombre del sustrato o en caso de varios sustratos, estos van separados por coma. La segunda parte, con la terminación *asa*, describe la acción de la enzima o reacción que cataliza. Existe una lista de nombres sistemáticos recomendados: oxidorreductasa, oxigenasa, transferasa. Para estas últimas se agrega un prefijo que indica el grupo que se transfiere, con una clave formada por la sigla EC (*Enzyme Commission*) seguido por un código de cuatro números separados por punto, donde el primer número se refiere a la clase, el segundo a la subclase, el tercero a la sub-subclase y el cuarto a un número asignado para la enzima, por ejemplo, para el nombre común melibiosa corresponde un nombre sistemático y código EC de alfa-galactosidasa (EC. 3.2.1.22)^{1,14}.

Clasificación

La clasificación de las enzimas está íntimamente ligada a su nomenclatura^{1,2,6}. El nombre incluye la reacción que cataliza y el sustrato sobre el cual trabaja. Las enzimas se clasifican según la reacción que catalizan en seis grandes clases:

Oxidoreductasas: catalizan reacciones de óxido-reducción. Utilizan dos sustratos, uno de ellos recibe hidrogeniones (es el compuesto reducido) que dona otro compuesto (el oxidado). Son designadas como deshidrogenasas u oxidasas. Ejemplo: alcohol deshidrogenasa, citocromo oxidasa.

Transferasas: transfieren grupos funcionales, por ejemplo, un grupo metil ($-\text{CH}_3$) o un grupo fosfato ($-\text{PO}_4$) de un compuesto (denominado donante) a otro (denominado receptor). Son nombradas de acuerdo al esquema donante-aceptor grupo transferido, así las enzimas transglucosidasas transfieren grupos de monosacáridos, las transfosforilasa y fosfomutatas transfieren grupos fosfatos, las transaminasas transfieren grupos aminos, las transmetilasas realizan la transferencia de grupos metilos, mientras las transacetilasas se encargan de la transferencia de grupos acetilo.

Hidrolasas: modifican las moléculas al catalizar la remoción o adición de una molécula de agua, con lo cual pueden dar lugar a rotura de enlaces con formación de dos productos. Se clasifican en hidrolasas e hidrasas. Las primeras incluyen esteratas (hidrolizan lípidos), carbohidrasas, nucleasas, desaminasas, amidasas y proteasas.

Liasas: catalizan la ruptura no hidrolítica de grupos funcionales del sustrato. Rompen o forman enlaces C – O, C – N, C – S o C – C. Ejemplo: fosfoglicerolmutasa y aldolasa.

Isomerasas: movilizan grupos funcionales dentro de una misma molécula, cambiando la geometría o estructura de la molécula para producir formas isoméricas del sustrato. Ejemplo: la enzima fumarasa que cataliza la conversión de ácido fumárico a ácido maléico.

Ligasas: forman enlaces C – O, C – N, C – S o C – C entre diferentes moléculas con hidrólisis simultánea de ATP.

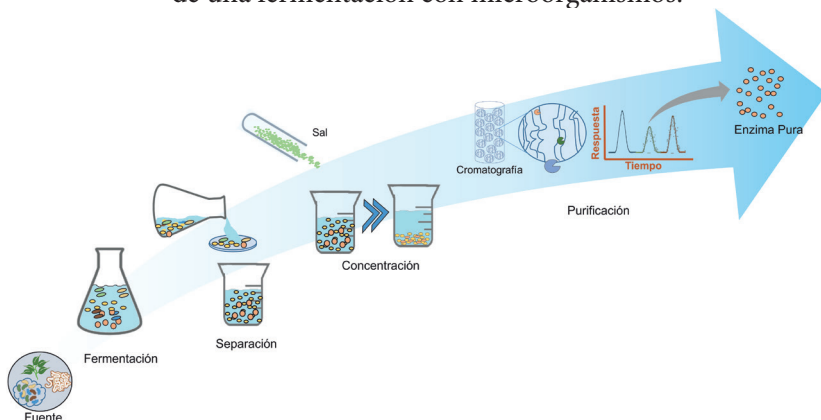
Cada clase está a su vez conformada por una subclase y cada subclase por una sub-subclase. La subclase está determinada por una descripción más precisa de la reacción llevada a cabo

por la enzima. Ejemplo: las Transferasas se clasifican en las subclases quinasas, transferasas que catalizan la transferencia de grupos fosfatos, transaminasas las que transfieren grupos aminos, transacetilasas, por transferir grupos acetilos.

Métodos generales de producción, aislamiento y purificación de enzimas

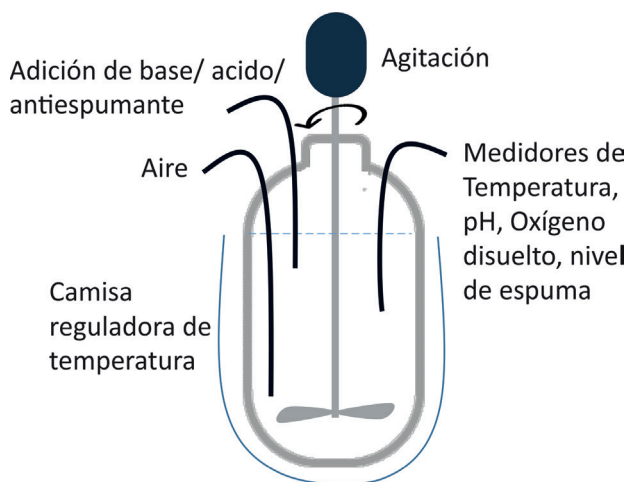
Muchas enzimas como las amilasas, hidrolasas, celulasas, lipasas, ureasas, entre otras; son utilizadas en procesos industriales tales como: industria cosmética, química, de alimentos, farmacéutica, de textiles, de papel, de biocombustibles, entre otras. Por lo que hay una elevada demanda de éstas a nivel industrial. Por lo tanto, es importante la obtención de enzimas puras, existiendo pautas básicas para lograr la purificación de las mismas, la mayoría de las veces el protocolo es obtenido por el ensayo y error. Generalmente, en la industria se purifican enzimas a partir de microorganismos, aunque existen otras fuentes de obtención de enzimas como órganos de animales y extractos vegetales^{4,7,12}. En la **Figura 1.8** se muestran las etapas generales de un proceso de producción y purificación de enzimas de origen microbiano. En este proceso se requiere una elevada cantidad de material de inicio, para lo cual se emplean frecuentemente cultivos líquidos o biorreactores. Los biorreactores (**Figura 1.9**) son sistemas artificiales que reúnen las condiciones para que los microorganismos realicen las reacciones que permitan transformar los sustratos (materia prima) en metabolitos o biomasa (productos)^{10,13}. Un proceso común usado para la producción de enzimas que involucra microorganismos, es el uso de un reactor para cultivar varios litros de medio inoculado, en condiciones aeróbicas con agitación constante¹⁵. Una gran variedad de microorganismos eucariotas, como levaduras y hongos, se emplean para la producción industrial de enzimas. También se utilizan, de manera frecuente, sistemas procarióticos basados en bacterias gram negativas y gram positivas¹⁶.

Figura 1.8. Proceso general para la purificación de enzimas a partir de una fermentación con microorganismos.



Fuente: elaboración propia.

Figura 1.9. Esquema de un biorreactor.

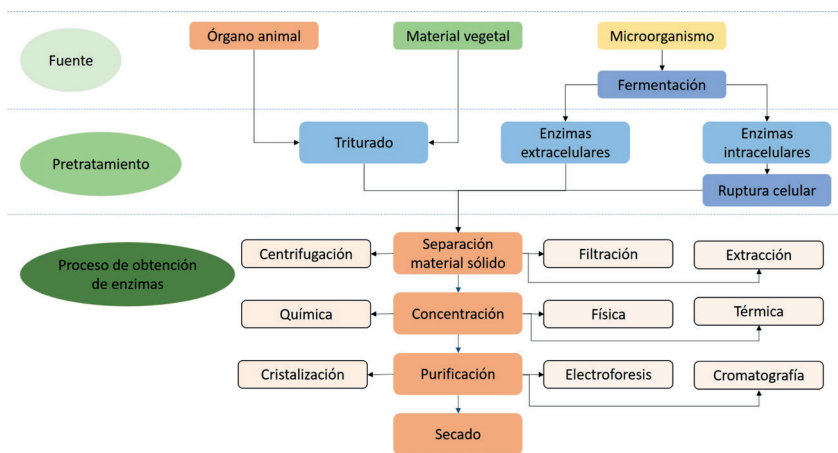


Fuente: elaboración propia.

El grado de pureza comercial de la enzima depende de la aplicación final de la misma, así las enzimas que se emplearán con fines terapéuticos deben tener un grado de pureza superior. Para el aislamiento de enzimas se puede partir de órganos animales, material vegetal o microorganismos. La secuencia de pasos en la purificación de una enzima depende de su ubicación dentro de la célula. Por ejemplo, aislar una enzima intracelular involucra

su separación a partir de una serie de compuestos como lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, que constituyen mezclas biológicas complejas, mientras que aislarla del medio extracelular (cuando la célula la secreta), generalmente implica una muestra con menor complejidad que la anterior. Debido a su complejidad y alto grado de especificidad en su conformación nativa, las enzimas deben ser purificadas evitando someterlas a condiciones de temperatura, pH y fuerzas iónicas extremas, que afecten dicha conformación. Esto implica que para el aislamiento de las enzimas se requiere utilizar los métodos adecuados, para conservar su conformación nativa y con ella su actividad enzimática^{8,12,16}. Un esquema general para la producción y purificación de enzimas se muestra en la **Figura 1.10**.

Figura 1.10. Esquema general para la producción y purificación de enzimas.



Fuente: elaboración propia.

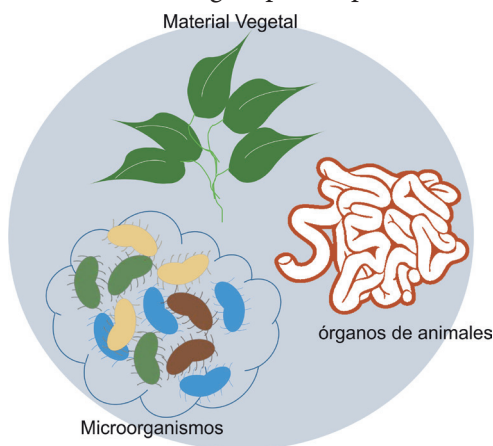
Fuentes biológicas para la obtención de enzimas (Figura 1.11)

Órganos animales

Con el fin de mantener la actividad enzimática, los órganos fuente de la enzima de interés, deben ser transportados y almacenados a baja temperatura. El material animal debe

estar libre de lípidos, debido a que éstos interfieren en los pasos de purificación. Los órganos congelados son posteriormente cortados o macerados mecánicamente y las enzimas se extraen en presencia de una solución tampón adecuada. Esta solución debe contener inhibidores de proteasas, que permitan preservar la enzima de interés. Un procedimiento alternativo es el tratamiento del órgano animal fuente de la enzima con enzimas digestivas^{9,12}.

Figura 1.11. Material biológico para la producción de enzimas.



Fuente: elaboración propia.

Material Vegetal

Este material que contiene la enzima a purificar es triturado o macerado, empleando diferentes técnicas y las enzimas son extraídas en presencia de solución tampón conteniendo inhibidores de proteasas y conservando el pH adecuado. La ruptura celular puede realizarse con tratamiento enzimático.

Microorganismos

Los microorganismos son una fuente importante para la producción de enzimas y, en la actualidad, su utilidad se ha potenciado gracias a las modificaciones que se realizan empleando las técnicas de ingeniería de proteínas, biología molecular y genética. Con dichas técnicas es posible transferir un gen de

otra especie a un microorganismo para lograr que produzca una proteína que normalmente no es producida por dicho microorganismo. Para el aislamiento de enzimas producidas en medio extracelular, la purificación se inicia con la separación de las células de la solución, mientras para las enzimas intracelulares es necesario realizar la ruptura de las células^{8,10,13}.

• Métodos mecánicos para la ruptura celular

En la ruptura celular los métodos mecánicos comúnmente empleados son la homogenización a alta presión y la trituration de las células en molino a alta velocidad en un ambiente húmedo.

• Métodos no mecánicos para ruptura celular

La ruptura celular mediante métodos no mecánicos generalmente requiere del uso de enzimas o compuestos químicos. También es posible romper las membranas celulares sometiendo las células a altas temperaturas. A nivel de laboratorio, el ultrasonido es uno de los métodos físicos más frecuentemente utilizados. Otro método es el secado y fraccionamiento con solventes orgánicos, en donde la estructura de la pared celular es alterada con el fin de permitir la extracción del contenido celular.

Separación del material sólido

Luego de la ruptura celular, el paso a seguir es la separación de las enzimas intracelulares o extracelulares, a partir de una solución compleja. El proceso de separación del extracto celular del medio extracelular es difícil cuando se trabaja con microorganismos, debido a la pequeña diferencia que existe entre la densidad de las células y el medio. Para lograr la separación inicial, este proceso se realiza con varios ciclos de procesos de filtrado a través de filtros de diferentes tamaños de poro, complementando con centrifugación a diferentes velocidades. En general, se pueden utilizar procesos de filtración, centrifugación,

extracción líquido-líquido o floculación y flotación, bien sea por separado o en conjunto, para lograr la separación de sólidos^{6,8,10}.

Filtración

La filtración es un proceso mecánico que permite separar los sólidos del líquido por medio de una membrana porosa, la cual tiene un diámetro de poro definido, que puede retener inclusive bacterias. Durante la filtración, la suspensión se deposita en la membrana. De acuerdo al tamaño de los poros de la membrana se logra retener una gran cantidad de material sólido no deseado para obtener el extracto celular donde se encuentra la enzima a purificar.

Centrifugación

El tipo de centrifuga utilizado para la remoción de material sólido, depende del contenido de sólidos y el tamaño de partícula. En esta técnica el extracto celular se separa de los residuos sólidos debido a su menor masa, por acción de la fuerza centrífuga, ubicándose en la parte superior del tubo, mientras los residuos sólidos de mayor peso van a depositarse en el fondo.

Extracción

Este método es utilizado para aislar enzimas intracelulares, por medio de un sistema acuoso de dos fases o extracción líquido-líquido, basado en la distribución de las biomoléculas en una solución acuosa que contiene una mezcla incompleta de un polímero y propilenglicol o un polímero y sal. En este método las biomoléculas se separan debido a su mayor o menor afinidad con cada componente de la mezcla de extracción.

Floculación y flotación

La floculación es un proceso mediante el cual las partículas son desestabilizadas para formar aglomerados de partículas

mayores, para ello existen agentes. Por otro lado, la flotación se debe a la inestabilidad de los aglomerados que son separados en la superficie de la solución.

Concentración

Luego que las muestras están libres de sólidos o material particulado, es conveniente realizar un proceso de concentración, el cual, dependiendo de la disponibilidad de equipos, reactivos o nivel de procesamiento (escala laboratorio o industrial), se realiza por los siguientes procesos^{3,5,8,10,12,14,16}:

Métodos térmicos

Es poco utilizado, debido a que las enzimas son inestables con el aumento de temperatura. Sin embargo, existen instrumentos especializados para lograr la evaporación con solo un tratamiento suave de calor.

Métodos químicos

La concentración de proteínas por estos métodos se basa en el conocimiento de las propiedades químicas de las enzimas. Los métodos más empleados son:

Precipitación por sales: el proceso “*salting out*” para una proteína puede realizarse con diferentes tipos de sales neutras, la más común y utilizada es el sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). La proteína interactúa con la sal en lugar del agua, lo que conduce a una menor interacción entre el agua y la capa de solvatación de la proteína, dejando las regiones hidrofóbicas libres para combinarse intermolecularmente, dicho fenómeno conlleva a la precipitación de las proteínas.

Precipitación por solventes orgánicos: la adición de solventes orgánicos como etanol, butanol, acetona o isopropanol modifican la constante dieléctrica del

agua, que a su vez pierde interacción con las proteínas, produciendo agregados proteicos y alterando su estructura terciaria, lo que conlleva a su desnaturalización y posterior precipitación.

Precipitación por polímeros: las proteínas también precipitan con la adición de polímeros neutros como el polietilenglicol, en este proceso los polímeros disminuyen el agua disponible para la solvatación de las proteínas.

Precipitación por punto isoelectrico: como se sabe, las proteínas presentan una carga neta negativa cuando se encuentran en pH por encima de su punto isoelectrico y una carga neta positiva cuando el pH disminuye. Al llegar a un pH igual al punto isoelectrico de la proteína, es decir, donde se igualan las cargas negativas y positivas, ésta logra una carga neta igual a cero. En este pH la interacción iónica entre las mismas moléculas es menor y por tanto la solubilidad disminuye causando su precipitación.

Métodos físicos

La **Ultrafiltración** es un proceso donde existe la separación de partículas muy pequeñas y moléculas disueltas en una muestra. La separación se presenta debido a la diferencia de tamaño molecular de las biomoléculas a separar; sin embargo, se ve afectada por propiedades moleculares, electrostáticas y químicas. Las membranas de ultrafiltración varían en tamaño de 1 K a 1.000 K de peso molecular, las moléculas que poseen tamaño en este rango serán retenidas en la membrana y las demás, como el agua y las sales, pasarán a través de ella. Con estas membranas también podemos retener material particulado y coloidal.

Purificación

Con los pasos anteriores, se consigue purificar parcialmente la enzima de interés, si el propósito es utilizarla en aplicaciones industriales, esta purificación parcial es suficiente, sin embargo,

si se requiere para fines analíticos o usos farmacológicos se debe alcanzar alta pureza, la cual se logra con los siguientes métodos de purificación^{3,8,10,14,16}:

Cristalización

Es un proceso utilizado especialmente en la purificación de enzimas con fines industriales. Las proteínas pueden inducir a la formación de cristales mediante la sobresaturación de la solución en la que se encuentren. Bajo estas condiciones de saturación, las proteínas pueden cristalizarse en forma repetitiva, logrando mantenerse juntas mediante enlaces covalentes. Desafortunadamente esta metodología presenta diversas desventajas como el hecho de que la cristalización difícilmente se puede realizar en medio acuoso (las proteínas son biológicamente activas en agua). La dificultad para obtener proteínas de alta calidad y la alta sensibilidad de las muestras de interés a temperatura, pH, fuerza iónica, son algunas de las desventajas de esta metodología.

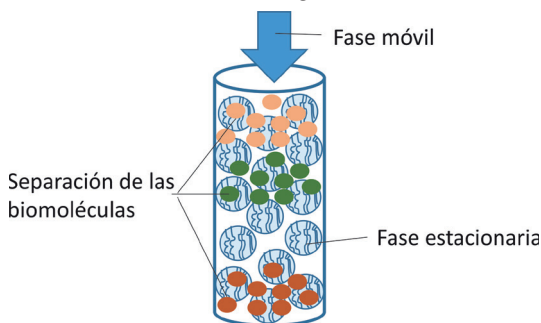
Electroforesis

Es usada para obtener enzimas puras a nivel de laboratorio. Existen 3 tipos de electroforesis, dependiendo de las condiciones en que se realice: isotacoforesis, gradientes de porosidad y electroforesis de zona, siendo esta última la más utilizada, la cual es una técnica en la que las moléculas se separan en zonas o bandas en un *buffer* y se estabilizan en un medio sólido poroso o de otro tipo, como: papel, gel agar o gel poliacrilamida.

Cromatografía

Es una técnica de separación mediante la cual una mezcla de moléculas, en este caso específico las biomoléculas, son separadas por la interacción que se presenta entre una fase estacionaria y una fase móvil, como se esquematiza en la **Figura 1.12**. Existen diferentes tipos de cromatografía para la purificación de proteínas, entre las cuales tenemos las siguientes¹⁷:

Figura 1.12. Esquematación de la separación de biomoléculas por cromatografía.



Columna cromatográfica
Fuente: elaboración propia.

Cromatografía de Intercambio Iónico

Como se sabe, las enzimas modifican su carga eléctrica de acuerdo al pH en que se encuentran. Esta cromatografía se basa en el intercambio de aniones o cationes que posee la fase estacionaria con la enzima. Es uno de los métodos más utilizados, debido a la alta capacidad de unión con proteínas, a su sencilla realización y su eficiencia para eliminar impurezas no deseadas. Además, permite que la elución de la enzima se dé a condiciones suaves, lo que facilita la conservación de la estructura de la proteína. Una desventaja que presenta la técnica es su baja selectividad.

Cromatografía Hidrofóbica

Se basa en la interacción de los residuos de aminoácidos de la proteína lo suficientemente expuestos, con ligandos (grupos químicos específicos) hidrofóbicos de la fase estacionaria. Esta cromatografía es utilizada cuando se ha precipitado la enzima con métodos de salado o para muestras provenientes luego de la elución por cromatografía de intercambio iónico, ya que los tampones de alta fuerza iónica mejoran la interacción hidrofóbica. Las condiciones de elución en esta técnica se realizan mediante la disminución de la concentración de sal y es una elución suave, lo que permite conservar la actividad biológica de la biomolécula.

Cromatografía de Exclusión Molecular

La separación se da de acuerdo al tamaño y a la forma de las biomoléculas. Las proteínas más grandes que el poro de mayor tamaño de la fase estacionaria, no pueden atravesarlo y por lo tanto eluyen en primer lugar. Las proteínas más pequeñas que el poro de la fase, pasan a través del poro retardando su tiempo dentro de la misma y, por lo tanto, su elución.

Cromatografía de Afinidad

Es la técnica de cromatografía para proteínas más selectiva, por ende, es utilizada en las etapas finales de los procesos de purificación permitiendo la purificación de enzimas con alta pureza. Esta alta selectividad se presenta gracias a las interacciones altamente específicas que presentan residuos de aminoácidos de proteínas con ligandos particulares bajo ciertas condiciones. La enzima de interés es adsorbida en la fase estacionaria fuertemente, mientras que el resto de moléculas al no adherirse se pueden retirar con un simple lavado; invirtiendo la condición inicial se puede recuperar la enzima o molécula blanco.

Estabilidad y formulación de productos

Un factor importante de las enzimas para aplicaciones farmacéuticas, en química de alimentos o simplemente con fines de caracterización, es la estabilidad de las mismas cuando son mezcladas con otros compuestos. Algunas son estabilizadas por sales, preservantes, carbohidratos o proteínas inertes o simplemente por liofilizado. Además, se debe de tener especial cuidado con la contaminación por metales pesados, agentes oxidantes o sustancias que podrían alterar la actividad catalítica, por lo que el material en donde se empacan o almacenan debe estar limpio, bien sellado y, en algunos casos, proporcionar protección de la luz. Cuando se trata de aplicaciones que involucren enzimas de uso a nivel de laboratorio, éstas por lo general son modificadas

mediante inmovilización por enlaces covalentes con biopolímeros, lo que incrementa la estabilidad en solución y/o la resistencia térmica. Sin embargo, dependiendo de la aplicación de la enzima, se utilizan diferentes formas de estabilización, sin embargo, durante el proceso de caracterización enzimática, es preferible que la enzima esté libre de estabilizantes que podrían alterar su función. La liofilización le da estabilidad a las enzimas^{4,5,10,15,16}.

Conclusiones

La estrategia de purificación de una enzima está directamente relacionada tanto con la fuente de material del cual se parte, como con las propiedades fisicoquímicas de la misma. La calidad y cantidad de enzima obtenida en el proceso de purificación es afectada por el número de pasos durante el proceso. Es por esta razón que durante la estandarización de un protocolo óptimo de purificación se debe seleccionar aquel que implique el menor número de etapas posibles. Un protocolo de purificación sencillo y de baja complejidad representa menores costos en producción, lo que conlleva a la disminución en el valor comercial de la enzima. En el marco del proyecto “Desarrollo de Capacidades Científicas y Tecnológicas Aplicadas a los Sectores de la Salud y la Agroindustria en el Departamento de Risaralda (2014-2019)” financiado por el Sistema General de Regalías, se adelantaron trabajos relacionados con la purificación de una proteasa (Serratiopeptidasa) a partir de fermentación microbiana con la bacteria *Serratia marcescens*, aislada del intestino del gusano de seda *Bombyx mori* L, en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira. La proteasa fue purificada por métodos cromatográficos (intercambio aniónico y exclusión molecular), se caracterizó fisicoquímicamente y se determinaron algunos parámetros de cinética de reacción, usando como sustrato caseína modificada con grupos cromóforos¹⁸.

Bibliografía

1. Lehninger AL, Cox MM, and Nelson DL. Lehninger principles of biochemistry. 7th Ed. W.H. Freeman and Company. New York. 2013.
2. Rodwell VW, Weil PA, Botham KM, Bender D, and Kennelly PJ. Harpers illustrated biochemistry. 30th Ed. McGraw-Hill Education. 2015.
3. Bugg T. Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. 1st Ed. Blackwell Publishing Ltd. West Sussex, UK. 2012.
4. Pandey A, Negi S & Soccol CR. Current developments in biotechnology and bioengineering. Production , isolation and purification of industrial products. 1st Ed. Elsevier. 2017.
5. Brahmachari G, Demain AL, Adrio JL Biotechnology of microbial enzymes. Production, biocatalysis and industrial applications. 1st Ed. Academic Press. India. 2016.
6. Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. Biochemistry. 6th Ed. W. H. Freeman and Company. New York. 2007.
7. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol. 2002; 13: 345–351.
8. Rosenberg IM. Protein analysis and purification. Benchtop Techniques. 2th Ed. Birkhäuser. Boston. 2005.
9. Burgess RR, Deutscher MP. Methods in enzymology. Guide to protein purification. 2th Ed. Elsevier Inc. USA. 2009.
10. Bonner PL. Protein purification. 1st Ed. Taylor and Francis Group. New York. 2007.

11. Pratt CW, Cornely K. Essential biochemistry. 3th Ed. Wiley and Sons. USA. 2014.
12. Janson JC. Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications. 3th Ed. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ. 2011.
13. Singh-Dhillon G, Kaur S. Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production. Apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass. 1st Ed. Academic Press. Canada. 2016.
14. Aehle W. Enzymes in industry. Production and applications. 2th Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Germany 2004.
15. Francine É, Moreira AM, Dallago RM, Treichel H, Oliveira C, Machado TP, et al. Bioresource technology production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. Bioresour Technol. 2017; 225: 134–141.
16. Larroche C, Sanromán MÁ, Du G, and Pandey A. Current developments in biotechnology and bioengineering. Bioprocesses, bioreactors and controls. 1st Ed. Elsevier. 2017.
17. Bobály B, Sipkó E, and Fekete J. Challenges in liquid chromatographic characterization of proteins. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016; 1032:3-22.
18. Vélez-Gómez JM, Melchor-Moncada JJ, Veloza LA, Sepúlveda-Arias JC. Purification and characterization of a metalloprotease produced by the C8 isolate of *Serratia marcescens* using silkworm pupae or casein as a protein. Int J Biol Macromol. 2019; 135:97-105.

El ácido desoxirribonucleico (ADN)

Sandra Catalina Garzón-Castaño, Nancy Yadira Guerrero-Pepinosa, Grupo Infección e Inmunidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

A lo largo de la historia, varios eventos empíricos y científicos en el campo de la biología celular y molecular, han permitido dar una explicación sobre la transmisión de los rasgos de las especies que habitan el planeta tierra. Las características genotípicas que diferencian a los organismos vivos se relacionan con la información codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN) o material genético que se encuentra principalmente en el núcleo de la célula, esta información es transmitida (heredada) de los padres a su descendencia (hijos) de manera que la mitad de la información genética proviene de la madre y la otra mitad del padre; por lo tanto la descendencia siempre tendrá rasgos característicos de la familia de la cual proviene, así las plantas, los animales, los hongos las bacterias, entre otros, tienen diferente información genética y por consiguiente diferentes características físicas.

El genotipo de los organismos puede verse afectado por factores ambientales y, de esta manera, se generan las características fenotípicas, las cuales pueden observarse a simple vista, por ejemplo, el color de los ojos, la estatura, todas estas marcan una diferencia individual y son las que generan la amplia diversidad entre los individuos que pertenecen a una especie. Los avances en el entendimiento de la estructura y funcionamiento del ADN han permitido identificar y explicar los diferentes mecanismos que tiene una enfermedad genética y sus posibles tratamientos.

Breve historia sobre la transmisión de los caracteres hereditarios

La genética es la ciencia que estudia los procesos biológicos de la herencia, ya sean bioquímicos, fisiológicos, morfológicos o conductuales, y trata de explicar la transmisión de los caracteres de una generación a otra en los diferentes organismos que habitan el planeta tierra. A lo largo de los tiempos siempre se ha tenido curiosidad por entender la transmisión de los rasgos y características de los padres a sus hijos. Históricamente, muchas civilizaciones han desarrollado prácticas de mejoramiento genético que le han permitido obtener alimentos que suplan las necesidades de la población, por ejemplo, en la antigua Mesopotamia se seleccionaban las cepas de arroz, pastos y lentejas para el consumo humano y se reconoció la importancia de la semilla como portadora de todas las características de la planta¹.

Para dar explicación a la formación y desarrollo de los organismos, varios filósofos como Leucipo de Mileto (Siglo V a. C.), Anaxágoras (500-428 a. C.) y Demócrito (460-370 a. C.) observaron diferencias hereditarias en las partes del cuerpo y para dar una explicación a esta observación se refirieron a las gémulas o pequeños sedimentos que provienen de cada órgano del cuerpo, que por vía sanguínea llegan a los órganos reproductores y que en el momento de la fertilización son transmitidos al embrión, teoría que se conocía como pangénesis y que dio origen al concepto del homúnculo explicado como un humano diminuto que estaba formado perfectamente. El homúnculo requería estar dentro de la mujer para iniciar el desarrollo del embrión, se consideraba que el útero era el suelo nutritivo donde la semilla (embrión) se planta para que crezca (**Figura 1.13**). Sin embargo, Aristóteles (384-322 a. C.) creía que tanto el hombre como la mujer contribuían a las características observables en los individuos (fenotipo), porque la descendencia en varias ocasiones tiene rasgos más parecidos a sus ancestros como bisabuelos o tíos, que a sus propios padres¹. Los avances en la identificación de los procesos de la herencia

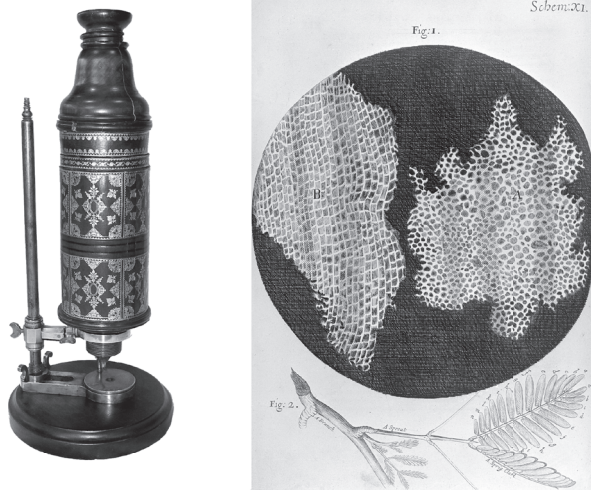
avanzaron con experimentos de ensayo y error, sobre todo en cultivos de plantas y cría de animales, pero en los siglos XVII y XVIII los descubrimientos en el campo de la biología fueron de gran utilidad para el posterior descubrimiento del ADN².

Figura 1.13. Representación del homúnculo según Nicolas Hartsoeker. Modificado de Scott G.³



En el siglo XV se genera una revolución científica con la invención del microscopio compuesto, porque con esta herramienta se pueden observar características de los seres vivos nunca antes vistas por el ojo humano y permitió explorar las características más ocultas que existen en los niveles más pequeños de la célula. En 1665, el naturalista inglés Robert Hooke observaba delgadas láminas de corcho para identificar el origen de la baja densidad de este material. Cuando Hooke observaba la lámina bajo el microscopio, identificó pequeñas celdas organizadas espacialmente, sin embargo, Hooke no pudo explicar que lo que observaba eran células vegetales muertas con forma poligonal (**Figura 1.14**).

Figura 1.14. Microscopio utilizado por R. Hooke para observar las células de corcho.



Tomado de: <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/anatocom/Biologia/Celula/teoria.html>.

Posterior a esto, Antón Van Leeuwenhoek, quien era un fabricante de lentes holandés, fue probablemente quien observó organismos unicelulares y otros microorganismos. En 1677 descubre los espermatozoides humanos y de otros animales (a los que llamó animáculos), Leeuwenhoek creía que lo que observaba eran parásitos. Con la invención y combinación de lentes para microscopios se cambió la apreciación sobre la función de los espermatozoides y en 1824 Dumas y Prevost afirmaron que los espermatozoides eran agentes activos de la fecundación, con estos avances se cayeron varias teorías como la del homúnculo³.

Un evento trascendental fue el descubrimiento del núcleo de la célula, que es el compartimento donde se encuentra el ADN, realizado por Robert Brown en 1831, con este aporte Matthias Jakob Schleiden (botánico alemán, 1804-1881) y Friedrich Theodor Schwann (naturalista, 1810-1882) establecen en 1839 la teoría celular que propone que todos los animales y plantas están formados por células, las que constituyen la mínima unidad de vida.

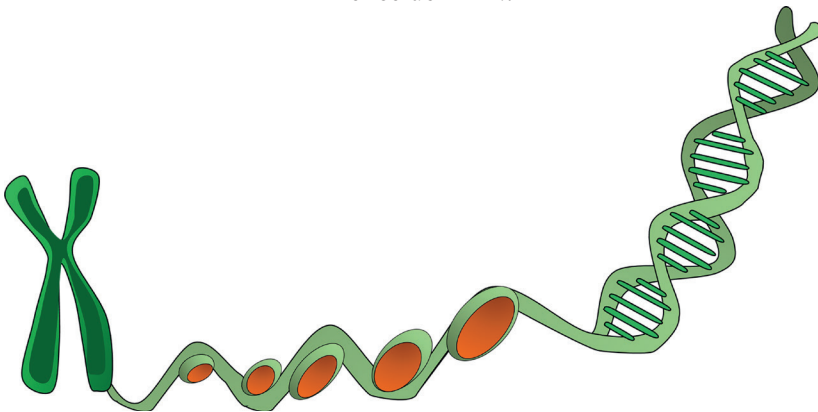
Por el año 1866 Gregor Mendel, que era un monje benedictino y quien mostraba curiosidad por la biología, descubre las leyes de la herencia en las arvejas, él realizó experimentos con variedades puras de arvejas identificando los rasgos físicos de la planta, llamado fenotipo, Mendel cruzó entre sí a varias generaciones y observaba siempre el mismo fenotipo. Cada experimento consistió en cruzar genéticamente entre sí dos de las variedades puras que difieren en sólo uno de las siete características fenotípicas seleccionadas, lo que se conoce como monohibridización. Las plantas híbridas resultantes pueden mostrar cierta combinación de rasgos que fueron seguidos en posteriores cruzamientos. Este principio establece que cada organismo diploide posee dos alelos por cada rasgo característico (fenotipo). Estos dos alelos se segregan (separan) durante la formación de los gametos (haploide), cada uno se distribuye a diferentes gametos en proporciones iguales, de esta manera Mendel postuló la ley de la segregación, donde observaba que las plantas contienen factores que determinan la herencia de cada rasgo de las mismas, y que cada planta porta un par de factores hereditarios por cada rasgo, respectivamente aportado por ambos progenitores. Además, se afirmó que cuando la planta posee dos factores diferentes, uno de ellos es dominante (su efecto fenotípico es visible) mientras que el otro es recesivo (su efecto no se manifiesta fenotípicamente). De esta manera concluye la existencia de factores y leyes de la variación de los caracteres individuales, los aportes de Mendel fueron muy importantes para avanzar en el descubrimiento del material hereditario y en los fundamentos de la genética clásica⁴.

Descubrimiento de la molécula del ADN

Meisher, en 1869, estudió la composición del núcleo de las células, para sus estudios utilizó glóbulos blancos y de estos aisló una sustancia a la cual llamó nucleína. En 1929, el Bioquímico Levene analiza el ácido nucleico de Miescher y describe una molécula de Desoxirribosa, una molécula de ácido ortofosfórico y cuatro

bases nitrogenadas heterocíclicas, las que llamará bases del Ácido Nucleico o Nucleótidos. Walter Stanborough Sutton (médico y genetista estadounidense, 1877-1916) y Theodor Heinrich Boveri (biólogo alemán, 1862-1915), independientemente, propusieron que las unidades de la herencia son los genes y que se encuentran localizados en los cromosomas, compuestos por ADN y proteínas llamadas histonas; esta propuesta fue controversial y en 1925 los estudios de Thomas Hunt Morgan (genetista estadounidense, 1866-1945) sobre la herencia y cruce de cromosomas parentales en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), reconocieron y fundamentaron la teoría cromosómica de la herencia o teoría de Sutton-Boveri. La teoría identifica los cromosomas con los factores (alelos) apareados requeridos por las Leyes de Mendel de la herencia. También establece que los cromosomas poseen una estructura lineal con los genes localizados en sitios específicos a lo largo de ellos (**Figura 1.15**)⁵.

Figura 1.15. Representación de un Cromosoma, histonas, doble hélice de ADN.



Fuente: elaboración propia.

En el año 1952, Wilkins y Franklin revelan que la estructura espacial de algunos cristales de ADN húmedos es repetitiva, reiterándose una estructura en el espacio¹. Linus Pauling se dedicaba al estudio de la estructura molecular especialmente de las proteínas y sus aportes permitieron avanzar en la elucidación

de la estructura del ADN. Finalmente, en 1953 Watson y Crick se basaron en los estudios anteriores y propusieron la estructura de la doble hélice del ADN⁵. Por este reporte se hicieron acreedores del premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1962, junto a Wilkins.

Composición y estructura del ADN

Uno de los grandes logros del siglo XX fue el descubrimiento del ADN y su función como el material en el cual se encuentra la información genética de los padres que se transmite a la descendencia. El ADN está organizado en unidades fundamentales que contienen la información genética, a estas unidades se les llama genes y son la base química de la herencia. Avery, MacLeod y McCarty, en 1944, demostraron este evento cuando estudiaron un rasgo específico de la cápsula de un neumococo y la transmitieron a otro tipo de neumococo con ADN purificado⁶. Teniendo en cuenta el dogma de la biología molecular, el ADN dirige la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ARN) (**Figura 1.16**) y éste regula la síntesis de las proteínas. Es fundamental conocer la estructura y función de los ácidos nucleicos para entender las bases genéticas de la formación y funcionamiento de los organismos y las enfermedades⁷.

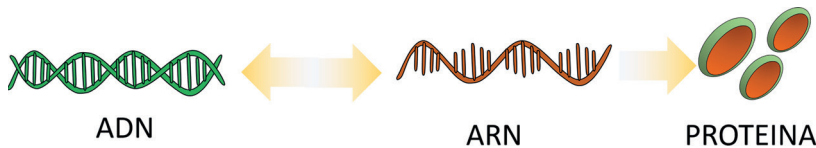
Diferentes estructuras para el ADN han sido propuestas. Pauling y Corey describieron un modelo que consistía en tres cadenas entrelazadas, con los fosfatos cerca del eje central y las bases en el exterior. Fraser sugería una estructura de tres cadenas donde los fosfatos se encuentran en el exterior y las bases en el interior de la estructura unidas por enlaces de hidrógeno. Por el contrario, Watson y Crick describieron dos cadenas helicoidales cada una enrollada alrededor del mismo eje, cada cadena posee grupos diéster de fosfato que unen residuos de β -D-desoxirribofuranosa con enlaces 3', 5' dejando las bases nitrogenadas libres. Las dos cadenas están relacionadas por una díada perpendicular al eje central. Ambas cadenas siguen a las hélices derechas, pero debido

a la diáda las secuencias de los átomos en las dos cadenas corren en direcciones opuestas. Las bases están en el interior de la hélice y los fosfatos en el exterior⁸.

Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

La cadena del ácido desoxirribonucleico (ADN) está formada por nucleótidos como unidad fundamental, que se caracterizan por tener dentro de su estructura un carbohidrato (pentosa) como la β -D-desoxirribosa o β -D-desoxirribofuranosa, una base nitrogenada púrica como la Adenina (A) y Guanina (G), y pirimidínicas como la Timina (T) y Citosina (C); además de tener un grupo fosfato. La unión de la base nitrogenada a la pentosa recibe el nombre de nucleósido, y se da mediante el carbono 1' de la pentosa y los nitrógenos de las posiciones 3 en las pirimidinas (T y C) o 9 en las purinas (A y G) mediante un enlace de tipo N-glucosídico. La unión de un grupo fosfato en la posición 5' de la pentosa constituye la estructura del nucleótido (**Figura 1.17**).

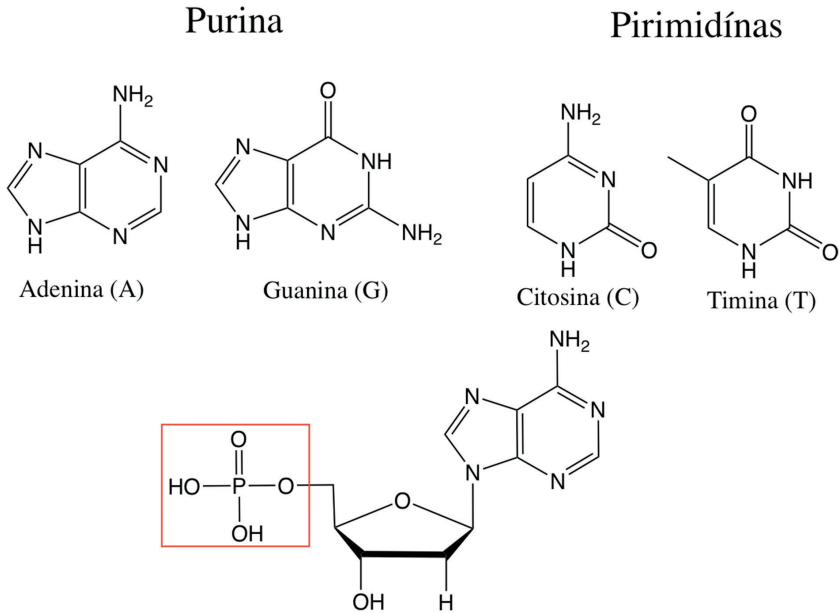
Figura 1.16. Dogma de la biología molecular.



Fuente: elaboración propia.

Los nucleótidos se unen entre sí por medio de un enlace fosfodiéster, donde participa el $-OH$ en la posición 5' del nucleótido y el $-OH$ en la posición 3' del otro, quedando las bases nitrogenadas como grupos laterales unidos al esqueleto. Los enlaces fosfodiéster poseen la misma orientación en toda la cadena, dándole a la esta una polaridad específica y extremos 5' y 3', y un sentido de izquierda-derecha desde el extremo 5'-3' ⁹ (**Figura 1.18**).

Figura 1.17. Estructura de bases nitrogenadas y el nucleótido.

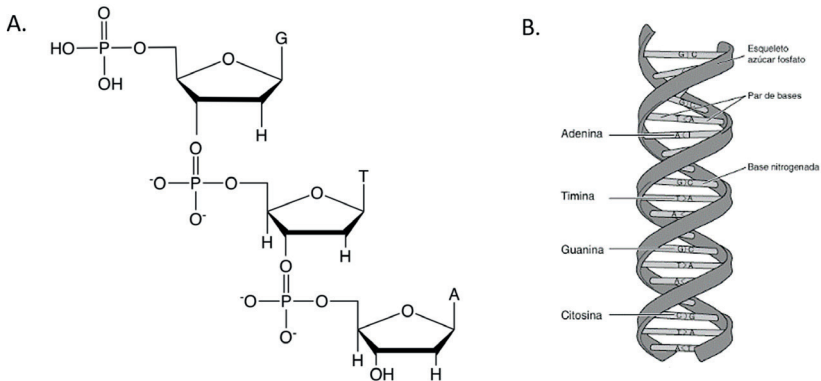


Fuente: elaboración propia.

ADN de doble hélice

La estructura de ADN propuesta por J. Watson y F. Crick es una doble hélice que se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias. Entre G y C se forman tres puentes de hidrógeno, por el contrario, entre A y T se forman dos. Haciendo que entre mayor sea la relación entre los pares de base G-C más difícil será la separación de la doble hebra. El ADN se caracteriza por estar formada por dos cadenas complementarias de polinucleótidos siendo esta la estructura primaria que se enrollan alrededor de un eje central formando una estructura secundaria de doble hélice (**Figura 1.18**).

Figura 1.18. A. Estructura primaria del ADN enlaces fosfodiéster B. Estructura secundaria del ADN de doble hélice.



A (fuente propia) B (Tomada de: <https://biologia.laguia2000.com/bioquimica/adn-modo-de-doble-hlice>).

La estructura descubierta por Watson y Crick se denomina ADN B, la cual representa una sal sódica del ADN en presencia de muchas moléculas de agua. Se ha encontrado que el ADN puede asumir diferentes conformaciones, debido a la flexibilidad del enlace N-glucosídico. Cuando el ADN pierde moléculas de agua (deshidrata), la molécula asume la forma A, siendo importante en las condiciones celulares debido a que los dúplex de ARN y ARN-ADN que se dan en el proceso de la transcripción se asemejan a la estructura del ADN A. La forma Z por su conformación en zigzag, se caracteriza por ser más angosta que la forma B, donde las bases se organizan con un patrón dimérico levógiro-escalonado, dando una apariencia en zigzag, aunque no es clara la importancia fisiológica de esta estructura se ha encontrado que se estabiliza por metilaciones y súper enrollamiento negativo. Las características estructurales de cada molécula de ADN se describen en la **Tabla 1.4**¹⁰.

Tabla 1.4. Propiedades estructurales del ADN.

Propiedad	ADN B	ADN A	ADN Z
Diámetro de la hélice (nm)	2.4	2.6	1.8
Pares de bases por vuelta de la hélice	10	11	12
Ascenso de la hélice por par de bases (Å)	3.3	2.3	3.8
Rotación de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro

Fuente: elaboración propia.

Técnicas para el aislamiento del ADN

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN basándose en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. Diferentes técnicas de aislamiento han sido desarrolladas con el fin de obtener ADN de buena calidad y cantidad. Los métodos tradicionales emplean solventes orgánicos para separar macromoléculas como las proteínas del ADN y, posteriormente, aislarlas por precipitación. Estos métodos de extracción pueden tomar varias horas y numerosos pasos, en general cuentan con las siguientes etapas: homogenización de la muestra, lisis celular, separación de macromoléculas (proteínas, lípidos, etc.), precipitación y redisolución del ADN. En la **Tabla 1.5** se observa la comparación de 5 técnicas de extracción tradicional del ADN donde se muestran los tiempos, concentración, rendimiento y pureza de cada uno de ellos (Comparación entre 5 métodos)¹¹.

Tabla 1.5. Comparación del tiempo de procesamiento, concentración, rendimiento y pureza de ADN, por diferentes métodos. Modificada de Dundass N et al¹¹.

Método de extracción	Tiempo	Material de Partida (mg)	Concentración de ADN (µg/µL)	Rendimiento (µg ADN/mg Material de Partida)	Pureza
Método de Calentamiento	30 min	1.88 (0.34)	0.57 (0.111)	15.81 (4.15)	0.79
Método de Fenol-cloroformo	19 horas	1.89 (0.36)	0.13 (0.39)	3.49 (0.92)	1.96
Método del Acetato de Potasio	4 horas	1.85 (0.20)	0.14 (0.027)	3.81 (0.77)	1.93
Método del Acetato de Potasio Modificado	4 horas	1.86 (0.32)	0.26 (0.028)	7.38 (1.52)	1.94
Método del CTAB	4 horas	1.85 (0.38)	0.16 (0.025)	4.67 (1.48)	1.90

En la actualidad existen en el mercado kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente, capaces de retener el ADN y separarlo del resto de las biomoléculas. Los kits se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten en un centro de hierro recubierto por resina^{12, 13}. Los kits comerciales disminuyen el tiempo de la extracción debido a que se reduce el número de pasos del procedimiento, garantizan una extracción de alta pureza, ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes¹³. La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Foradori C, Lagos L. La larga historia de una molécula: el ADN. *Rev Chil Pediatr.* 2003; 74(6):565-7.
2. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016; 107(1):1-8.
3. Scott F. Gilbert, *Biología del Desarrollo.* 7ª Ed. Editorial Médica Panamericana. 45-57. 2003
4. Rosenberg Eugene, *It's in your DNA.* 1 Ed. Academic Press.17-26. 2017
5. Acevedo-Díaz JA, García-Carmona A. Rosalind Franklin and the DNA molecular structure: A case of history of science to learn about the nature of science. *Revista Científica.* 2016; 25(2):162-75.
6. McCarty M. Discovering genes are made of DNA. *Nature.* 2003; 421(6921):406.
7. Wyatt G. The purine and pyrimidine composition of deoxyribose nucleic acids. *Biochem J.* 1951; 48(5):584.
8. Watson JD & Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 171, 737-738.
9. Feduchi CE, Romero MC, Yáñez CE, Blasco CI, García-Hoz JC. *Nucleótidos y ácidos nucleicos. Bioquímica: Conceptos esenciales.* 2ª Ed. Editorial Panamericana. Argentina. 93-98. 2015
10. McKee T, McKee JR. *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida.* 4ª Ed. Oxford University Press. 105-110. 2009

11. Dundass N, Leos NK, Mitui M, Revell P & Rogers BB. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *J Mol Diagn.* 2008; 10: 311-316.
12. Guinn G. Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. *Plant Physiol.* 1966; 41: 689-695.
13. Qiagen. BioSprint DNA Plant Handbook: for purification of total DNA from plants tissue using BioSprint workstation. Marzo de 2005 [consultado 11 de Julio de 2018] disponible en: <https://cutt.ly/Tf89qrj>

Células madre: generalidades

Augusto Zuluaga-Vélez, Heidy Catalina Navia, Juliana Rivera-Cano, Andrea Paola Melo, Lyda Cenobia Caballero, Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

Los organismos multicelulares están formados por cientos de diferentes células que cumplen funciones específicas y que garantizan el funcionamiento de cada órgano y de los organismos. En este sentido, para cada linaje o tipo celular, debe existir un progenitor o una célula de la cual provenga toda la información genética, que establece las funciones celulares, las características particulares y esenciales de cada célula.

En términos estrictos, cualquier célula que se divida y dé origen a otra, podría considerarse como una célula madre. Sin embargo, debido a que es un término ampliamente discutido en la literatura, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) ha definido que las células madre son células que aún no se han especializado, no realizan una función definida en un órgano, pueden diferenciarse hacia otras células con funciones específicas y tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente, es decir, pueden generar células hijas idénticas¹.

Las células madre son consideradas los componentes biológicos fundamentales para el crecimiento y desarrollo del feto, además juegan un papel indispensable en las especies adultas pues resultan en una fuente de reabastecimiento celular para todos los tipos de órganos, por lo que varias de estas células madre perduran hasta el final de la vida de los organismos.

Gracias a la capacidad de las células madre para diferenciarse hacia linajes celulares específicos, según las condiciones del micro ambiente en que se encuentren, estas células

se han utilizado para la regeneración de múltiples tejidos afectados en enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades cardíacas, enfermedades músculo esqueléticas, entre otras².

Debido a la gran importancia que presentan las células madre en el avance y la comprensión de los fenómenos biológicos y en su potencial como agentes terapéuticos en la práctica médica, en este capítulo se discutirán los fundamentos y principales aplicaciones de las células madre, se establecerán las diferentes clases que existen, de acuerdo a su lugar de origen, capacidad de división y/o diferenciación. Además, se presentarán las técnicas comúnmente utilizadas para caracterizar e identificar ciertas características de las células madre.

Células madre según su potencia

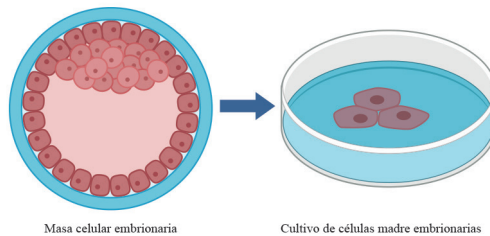
La potencia de una célula está definida como su capacidad de diferenciarse en varios tipos de células y, según este criterio, se pueden clasificar las células madre en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes².

Las células madre totipotentes son capaces de dividirse y generan todos los tipos de células de un organismo. El ejemplo más claro de célula madre totipotente es el cigoto que se forma de la unión del espermatozoide y el óvulo. La investigación en estas células se encuentra regulada por aspectos bioéticos, por lo cual su manipulación se centra casi exclusivamente en procesos como la fertilización *in vitro* que se utiliza frecuentemente en las clínicas de fertilidad.

Las células madre pluripotentes son capaces de diferenciarse en cualquier célula de las capas germinales llamadas endodermo, mesodermo y ectodermo. Dentro de este grupo se encuentran las células madre embrionarias (ESC)³ (**Figura 1.19**) y las células madre pluripotentes inducidas (iPS), que son células adultas a las que se les induce esta capacidad de diferenciación a

través de manipulaciones en el laboratorio⁴. Este último tipo de células ha cobrado interés pues sirven como herramienta para el desarrollo de fármacos, modelamiento de enfermedades y terapia para trasplantes, además la producción de iPS no está asociada a dilemas bioéticos, por lo que su posible manipulación no genera controversia.

Figura 1.19. Células madre aisladas a partir de la masa celular embrionaria.



Fuente: elaboración propia.

Las células madre multipotentes se encuentran en los tejidos de los mamíferos adultos y pueden dar lugar a otros tipos de células de su propia capa embrionaria, pero tienen una capacidad limitada para diferenciarse en comparación con las totipotentes y pluripotentes. Dentro de este grupo, se destacan las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas⁵, las cuales tienen alto impacto por su prometedor uso terapéutico.

Las células madre unipotentes son células progenitoras con una limitada capacidad de diferenciación pues sólo pueden generar un linaje celular específico, aunque gozan de características fundamentales como la autorrenovación y alta proliferación. Estas células son importantes pues son fuente de células específicas para algunos tejidos, lo que permite renovar los componentes funcionales y estructurales de los órganos. Dentro de esta categoría de células se encuentran las células madre epiteliales y las células madre musculares⁶.

Células madre según su origen

Las células madre también se pueden clasificar, según el tipo de tejido donde se localicen, en células madre embrionarias (ESCs) o células madres adultas (ASCs)². Las células madre embrionarias (ESCs), como su nombre lo indica, son células obtenidas de un ser vivo desde la fecundación misma hasta cierto momento antes del nacimiento del organismo. Para el caso de los humanos, se considera embrión al producto de la concepción hasta finales del tercer mes del embarazo. Este tipo de células se extrae generalmente de la masa celular interna que se encuentra en el blastocisto, el cual está definido como un embrión entre seis y siete días después de que el espermatozoide ha fecundado al óvulo. Por tanto, las células que están dentro del blastocito, se cultivan en condiciones específicas en el laboratorio y se diferencian en células más especializadas que formarán células de origen germinal y células de diferentes tejidos, como músculo, piel, tejido nervioso, sistema esquelético y tejido conectivo⁷. Este tipo de células presentan múltiples ventajas, como su capacidad de multiplicarse y de generar gran diversidad de células, aunque su uso clínico no es muy común debido a que se ha informado que pueden inducir la formación de ciertos tumores como teratomas. Además, una terapia con estas células implica necesariamente la manipulación de un embrión, lo cual tiene grandes implicaciones bioéticas^{3,8-11}.

Por otra parte, las células madre adultas (ASCs) se pueden obtener de distintos tejidos del cuerpo de un individuo completamente desarrollado. Estas células cumplen funciones dentro de la región donde se localizan, como mantener, remodelar y regenerar el tejido. Existen distintos tipos de células madre adultas; no obstante, las más comunes para uso en estudios biológicos y prácticas clínicas, por su capacidad de proliferar y de diferenciarse, son las células madre mesenquimales (MSC), las células madre hematopoyéticas (HSC) y las células madre pluripotenciales inducidas (iPS)^{12,13,14}.

Células madre Hematopoyéticas (HSC)

Las células madre hematopoyéticas (HSC) se pueden encontrar en tejidos como la médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica¹⁵. Este tipo de células se caracteriza por poseer en la superficie de su membrana celular una glicoproteína llamada CD34 o antígeno celular de progenitores hematopoyéticos, que sirve para promover la adhesión célula a célula y la unión de este tipo de células a la matriz extracelular de la médula ósea.

Las células madre hematopoyéticas (HSC), también llamadas precursores hematopoyéticos son fundamentales en organismos complejos como los mamíferos, pues poseen la capacidad de dividirse y especializarse en todos los linajes sanguíneos, es decir, estas células tienen la capacidad de generar los eritrocitos o glóbulos rojos que transportan el oxígeno a todo nuestro cuerpo y pueden también diferenciarse a los leucocitos o glóbulos blancos, que son la línea de defensa celular frente a agentes extraños como sustancias químicas, microorganismos y moléculas tóxicas¹⁴. Los precursores hematopoyéticos poseen un alto nivel de proliferación, autorrenovación y estabilidad, por lo que en clínica se realizan trasplantes con este tipo de células madre cuando se desea sustituir a una población celular sanguínea defectuosa y/o insuficiente en el paciente, al igual que cuando se combate algún tipo de cáncer en células sanguíneas con quimioterapias a dosis elevadas.

Para extraer células madre hematopoyéticas de la sangre periférica, es necesario movilizarlas desde la médula ósea, pues este es su nicho o ambiente natural. Para ello, se suministran sustancias como el factor estimulante de colonias de los granulocitos (G-CSF), el cual promueve la migración de las células, desde la médula ósea hasta la sangre periférica, para después ser recolectadas a través de una aféresis¹⁶. La aféresis es una técnica médica en la que la sangre del donante es separada para obtener una fracción deseada (células madre hematopoyéticas) y los

otros componentes o remanentes son retornados al donante vía intravenosa en el mismo procedimiento.

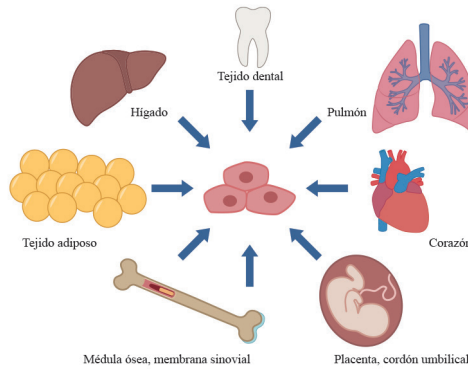
En los bancos de células madre hematopoyéticas, éstas son almacenadas por tiempos prolongados hasta el momento en que el paciente esté preparado para recibir el trasplante. Por tanto, se utilizan tanques que operan a temperaturas muy bajas con el fin de reducir el metabolismo celular. Sin embargo, como se utilizan temperaturas cercanas a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, se corre el riesgo de que el agua encontrada al interior de la célula se congele, forme cristales que rompan la membrana y haya muerte celular. Para evitar esto, se aplican soluciones que contienen sustancias crioprotectoras como el dimetilsulfóxido (DMSO)¹⁷. Estas actúan desplazando el agua contenida en la célula para protegerla frente a la congelación.

Células madre Mesenquimales (MSC)

Este tipo de células fueron inicialmente aisladas de la médula ósea, aunque estudios posteriores han demostrado que se pueden encontrar en otras partes del cuerpo, como el tejido adiposo^{18,19}, la pulpa dental²⁰, la placenta²¹, el cordón umbilical^{22,23}, la sangre del cordón umbilical²³, el líquido amniótico²⁴, la membrana sinovial²⁵, el corazón⁷ y el pulmón²⁶ (**Figura 1.20**).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) recomienda unos criterios mínimos que deben tener las células para ser consideradas como células madre mesenquimales. Estos criterios incluyen que las células en cultivo deben presentar una morfología tipo fibroblasto, deben ser adherentes al plástico en un cultivo de laboratorio y tener la capacidad de diferenciarse en linajes celulares propios del tejido adiposo, cartílago y hueso. Además, deben expresar varias proteínas en su superficie como CD73, CD90, CD105, Stro-1 y SSEA-4, y no expresar otras como CD45, CD34, CD14 (CD11b) CD19 (o CD79a) y HLA - DR^{27,28,29}.

Figura 1.20. Típicos tejidos de los cuales son aisladas células madre mesenquimales.



Fuente: elaboración propia.

Actualmente, estas células son muy utilizadas en medicina regenerativa, ya que suelen ser altamente proliferativas en cultivo pueden ser implantadas entre distintos individuos sin riesgo de rechazo, secretan biomoléculas que presentan actividad anti-apoptótica y anti-inflamatoria³⁰⁻³⁴. La mayoría de las células que se emplean para este tipo de ensayos, son extraídas a partir de la médula ósea (BM-MS), del tejido adiposo (AT-MSCs o ADSCs) y de tejidos asociados al nacimiento como el cordón umbilical (UC-MSc)^{18,35,29,12}, con el objetivo de cultivarlas para multiplicar el número de células viables y poder, luego, diferenciarlas a los linajes celulares deseados.

Células madre Mesenquimales de Médula Ósea (BM-MSc)

Las células madre mesenquimales, derivadas de médula ósea, suelen extraerse a través de un aspirado de médula ósea de la cresta ilíaca. Este procedimiento suele ser invasivo y doloroso para el paciente, aunque también se emplea habitualmente en clínica para el diagnóstico de cánceres hematológicos. Luego del aspirado de médula ósea, las células madre mesenquimales se separan a través de un gradiente de densidad por centrifugación y posteriormente se siembran en platos de cultivo de poliestireno

para su expansión²⁹. Se ha reportado que este conjunto de procedimientos, llamado procesamiento celular, llega a tener una eficiencia mayor del 70% y va acompañado del uso de enzimas que disgregan el tejido y permiten separar a la mayoría de las células.

Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea tienden a formar una capa que se visualiza por medio de un microscopio invertido luego de cinco o siete días de cultivo. Su característica más atractiva, para la medicina regenerativa y su implementación en terapia celular, es que posee la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos, en otras palabras, en células del tejido adiposo, cartílago y hueso, respectivamente.

Células madre de Tejido Adiposo (ADSC)

Estas células suelen extraerse a partir del tejido adiposo de varias partes del cuerpo, especialmente de la región abdominal. El tejido adiposo está compuesto de una gran variedad de poblaciones celulares como células endoteliales, células de músculo liso, pericitos, leucocitos, mastocitos, pre-adipocitos y células madre mesenquimales, que tienen la capacidad de ser multipotentes¹⁸, en otras palabras, diferenciarse hacia otros linajes celulares como adipocitos, condrocitos, osteoblastos y cardiomiocitos^{36,18}.

Las células madre de tejido adiposo han cobrado gran interés gracias a que pueden ser extraídas a partir de procedimientos no invasivos como la liposucción³⁷. Una vez se ha realizado este procedimiento, se ejecuta una digestión enzimática para disgregar el tejido y obtener la fracción vascular estromal (SFV), a partir de la cual se separan las células madre mesenquimales para su posterior cultivo, expansión e implantación. Otra característica que hace del tejido adiposo una fuente deseada para extraer células madre, es el número de células obtenidas en el laboratorio: $2,5 \times 10^6$ células por cada gramo de tejido, una cantidad 10% superior cuando se compara con otros tipos de tejido como la médula ósea³⁸.

Células madre de tejidos asociados al nacimiento

En muchos tejidos asociados al nacimiento se han podido extraer y aislar células madre mesenquimales. Los tejidos más conocidos son la placenta, el líquido amniótico y el cordón umbilical^{23,39}. El tejido de cordón umbilical también posee otras clases de células como, células madre hematopoyéticas, precursores endoteliales y células formadoras de colonias endoteliales. Este tejido se recolecta después del parto, por lo que es de obtención inmediata y no resulta ser un procedimiento invasivo. La eficiencia de este procedimiento de extracción suele ser menor respecto a otros tejidos como AT-MSc y BM-MSc. Además, el crecimiento de estas células en cultivo también es más lento, sin embargo, debido a que se pueden diferenciar en condrocitos y osteoblastos, resultan ser células interesantes para terapias en medicina regenerativa^{22,36}.

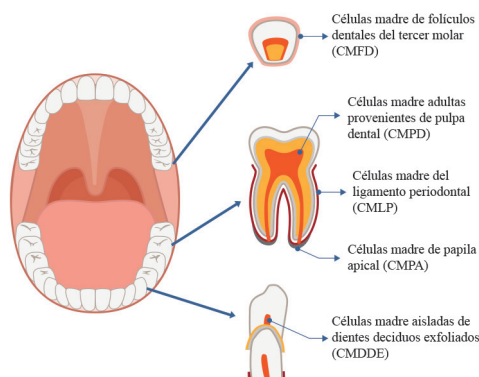
Células madre de origen dental

Los dientes humanos son órganos altamente especializados, cuyos elementos constitutivos incluyen una corona que se desplaza hacia la encía, una raíz anclada al hueso y un cuello que representa la transición entre la corona y la raíz. La porción interna de los dientes está compuesta por la pulpa dental, un tejido suave, sensible a cambios de temperatura y con vasos sanguíneos⁴⁰.

En la cavidad oral existen células madre que normalmente participan en la regeneración de tejidos orales, luego de una lesión, y sirven de reservorio celular para los tejidos periféricos. De la cavidad oral cabe mencionar a las células madre mesenquimales de pulpa dental, células madre aisladas de dientes deciduos exfoliados, células madre del ligamento periodontal, células madre de folículos dentales del tercer molar y células madre de papila apical (**Figura 1.21**).

Las células madre mesenquimales de pulpa dental (CMPD) poseen una capacidad de diferenciación multipotencial similar a la de las células madre mesenquimales de médula ósea, por lo que tienen gran potencial de uso en ingeniería de tejidos y regeneración tisular. Además de esto, las células madre dentales son atractivas por su accesibilidad, plasticidad, alta capacidad proliferativa y obtención bajo procedimientos poco riesgosos. Se ha encontrado que residen en un microambiente específico perivascular (alrededor de un vaso sanguíneo), donde están sin división celular y mantienen su capacidad de autorrenovación y *status* indiferenciado⁴¹.

Figura 1.21. Fuentes de células madre de origen dental, adaptado de Rivera- Cano⁴².



Células madre Pluripotenciales Inducidas (iPS)

Las células madre embrionarias presentan la mayor capacidad de diferenciarse hacia una gran variedad de tejidos, sin embargo, su uso está limitado por aspectos bioéticos y morales, ya que no es aceptable el uso de células madre embrionarias a expensas de la destrucción de un embrión humano⁴³. Por lo tanto, se ha propuesto la generación de otro tipo de células madre como las células madre pluripotenciales inducidas (iPS), que resultan de la reprogramación de células somáticas (células no sexuales), considerando que las células de cualquier tejido por medio de

unos factores específicos, pueden regresar hasta estados primitivos de diferenciación y adquirir la capacidad de convertirse en otros linajes celulares⁴⁴.

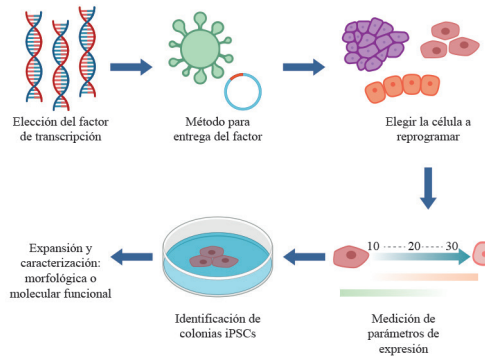
La generación de células madre pluripotentes inducidas (**Figura 1.22**) fue reportada por primera vez en la revista *Cell* por Shinya Yamanaka y colaboradores en el año 2006, quienes lograron, a través de cuatro proteínas llamadas factores de reprogramación, demostrar que una célula somática adulta animal puede retornar hasta un estado pluripotente similar al embrionario, por lo que las llamaron “*embryonic like cells*”⁴⁵. Un año más tarde, se logró la reprogramación directa de células humanas tipo fibroblastos a células iPS humanas, obteniendo características similares a las células madre embrionarias humanas (ES), tales como morfología, nivel de proliferación, moléculas de superficie, expresión de genes y capacidad de diferenciación en linajes celulares de las tres capas germinales⁴⁴.

Los factores que hacen posible el proceso de reprogramación son llamados los factores de *Yamanaka* (Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4), los cuales fueron necesarios para reprogramar fibroblastos de ratón que normalmente se encuentran en piel y tejido conectivo, a células madre en estado embrionario; ensayos que fueron ampliados y confirmados de manera simultánea por varias investigaciones. También se ha demostrado que a partir de estas células iPSCs se pueden producir neuronas, células de retina, células cardíacas, células sanguíneas y células productoras de insulina⁴⁶, lo cual ha validado su pluripotencial.

Para introducir cada factor de reprogramación dentro de la célula, es necesario el uso de un “vehículo” que permita ubicarlo en el compartimiento celular deseado; para esta finalidad han sido utilizados virus, plásmidos, proteínas recombinantes, ARN no codificantes o moléculas pequeñas como el ácido valproico, un inhibidor de las deacetilasas de las histonas. Una vez se tiene definido el método para transportar el factor o gen, es necesario

elegir la célula a reprogramar, dentro de las que se encuentran los fibroblastos, las células del estómago, células hepáticas, células pancreáticas, los linfocitos, progenitores neuronales y queratinocitos humanos.

Figura 1.22. Generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS), adaptada de Goldthwaite⁴⁷.



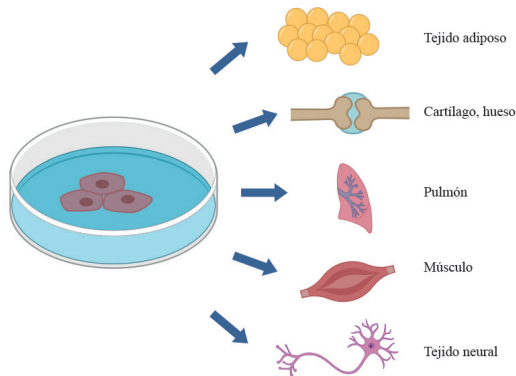
Estos avances continúan informando y simplificando el proceso de reprogramación, avanzando así en el campo de la generación de células madre específicas para cada paciente y centrando su utilidad potencial en el desarrollo de fármacos, el estudio de enfermedades y medicamentos para trasplante⁴³.

Ensayos de diferenciación celular empleando células madre

Los tejidos como el neural, vascular, hueso y cartílago tienen una alta demanda clínica por el gran número de enfermedades degenerativas que los afectan, sus limitadas capacidades de regeneración y las dificultades en la obtención de grandes volúmenes de poblaciones celulares especializadas. Es por esto que, en la medicina regenerativa, se ha implementado con gran fuerza el uso de células madre que tengan la capacidad de diferenciarse hacia ciertos linajes celulares deseados (**Figura 1.23**).

En general, el proceso de diferenciación celular se realiza por medio de un cultivo *in vitro* de células madre mesenquimales, células madre embrionarias o células madre pluripotenciales inducidas junto a factores de crecimiento específicos para cada linaje celular. Por ejemplo, estas clases de células madre en presencia de dexametasona, β -glicerol fosfato y ácido ascórbico, expresan fosfatasa alcalina, acumulación de calcio y una morfología consistente con la diferenciación osteogénica propia de la formación de tejido óseo⁴⁸. Este potencial osteogénico de las células madre puede llegar a ser conservado en el tiempo y posterior a una multiplicación celular, lo cual facilita procesos como el injerto de células en fracturas⁴⁹.

Figura 1.23. Linajes celulares que pueden obtenerse a través de diferenciación de células madre.



Fuente: elaboración propia.

La diferenciación condrogénica (células propias del cartilago) también es posible con las células madre, luego de ser cultivadas durante 28 días en un medio que contiene dexametasona y TGF- β 3, para permitir la producción y secreción de moléculas propias de la matriz extracelular del cartilago hialino, tales como colágeno tipo II, agregano y glicosaminoglicanos.

Se ha demostrado que otros factores como esfuerzos mecánicos compresivos intermitentes y proteínas como TGF- β 1, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5, IGF-1, FGF-2 y FGF-

18, también promueven la diferenciación condrogénica, con resultados similares en modelos celulares y animales⁵⁰.

La diferenciación de células madre a linaje adipogénico, aunque es poco requerido en medicina regenerativa, puede ser inducido por la adición de factores como dexametasona, insulina, indometacina y 1-metil-3-isobutilxantina⁵¹. Dichas células expresan marcadores específicos de adipocitos tales como: receptor γ^2 , lipoproteína y ácidos grasos unidos a la proteína aP2. Estos adipocitos se caracterizan por acumular vacuolas ricas en lípidos, que al final se unen para formar una sola estructura.

Las células madre también tienen la capacidad de diferenciarse a otros tejidos como los miocitos o células del tejido muscular. Dichas células madre son cultivadas con 5-azacitidina, para propiciar la generación de miotubos, característica típica del linaje miocítico⁵².

Para poder establecer si las células madre se han acoplado de forma adecuada en un tejido, si los ensayo en el laboratorio han permitido la adecuada diferenciación celular hacia un linaje deseado o si estas conservan un linaje determinado luego de un tiempo establecido, la investigación biomédica se ha basado en el uso de varias técnicas inmunológicas, citogenéticas y moleculares. De este modo, se hace indispensable la detección de marcadores específicos de los linajes de las células diferenciadas, mediante técnicas como inmunofluorescencia (IFC), inmunocitoquímica (ICC) y citometría de flujo.

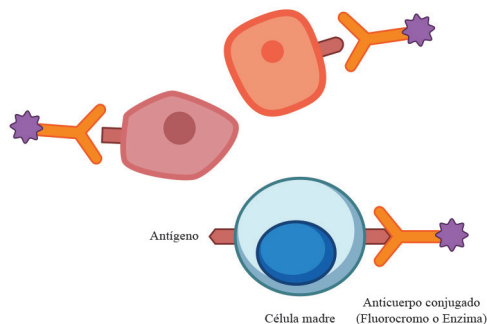
Los marcadores moleculares usualmente son proteínas o glicoproteínas, expresadas de acuerdo al tipo celular y, por tanto, se usan para identificar el tipo de célula. La identificación, caracterización y categorización de estas moléculas proporciona herramientas útiles en la ingeniería de tejidos. Los biomarcadores que se estudian en células son llamados antígenos tipo glicanos y no glicanos^{53,54}.

Antígenos tipo glicanos: las células expresan un tipo de carbohidratos en la superficie celular como oligosacáridos y glicoproteínas, los cuales se pueden identificar por medio de estrategias inmunológicas insertando anticuerpos que identifiquen el tipo de glicano de un linaje en particular.

Antígenos no glicanos: son marcadores de diferenciación celular denominados “*Cluster de diferenciación*” (CD) asociados a las células madre, por ejemplo, el CD9 es un marcador presente en células madre de ratón y humano. Los marcadores CD30, CD50, CD90, CD200 y CD326 han sido asociados a pluripotencia^{55,56}.

Las técnicas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia usan anticuerpos para detectar antígenos en las células madre o en las células luego de la inducción de una diferenciación celular. Son técnicas de gran especificidad y alta afinidad para reconocer moléculas en la superficie celular o en el interior de la misma. Se basan en identificar la unión de la molécula de interés con un anticuerpo que la reconoce específicamente, dicho anticuerpo está marcado mediante enlaces químicos con fluorocromos (inmunofluorescencia) o enzimas (inmunocitoquímica), como se muestra en la **Figura 1.24**.

Figura 1.24. Interacción entre un anticuerpo y un antígeno expresado por una célula madre.



Fuente: elaboración propia.

Para llevar a cabo este tipo de técnicas, se deben tener en cuenta conceptos básicos como:

Antígeno: son sustancias, moléculas, partículas extrañas capaces de producir una reacción inmune en un individuo. Específicamente, la parte del antígeno que en sí es reconocida por el sistema inmune se llama epítoto o epítoto.

Anticuerpo: los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) hacen parte del sistema inmune, tienen la capacidad de reconocer antígenos, moléculas o partículas extrañas específicas. Estas glicoproteínas poseen una gran diversidad y heterogeneidad. Las características más relevantes son la alta precisión y sensibilidad en la identificación a nivel proteico, tanto a nivel celular o subcelular. En general, los anticuerpos son producidos por células B activadas (o células plasmáticas) como parte de una respuesta adaptativa a una infección. Los anticuerpos circulan en la sangre, en las mucosas o pueden estar unidos a la superficie de los linfocitos, y sirven para interactuar específicamente con antígenos extraños⁵⁷.

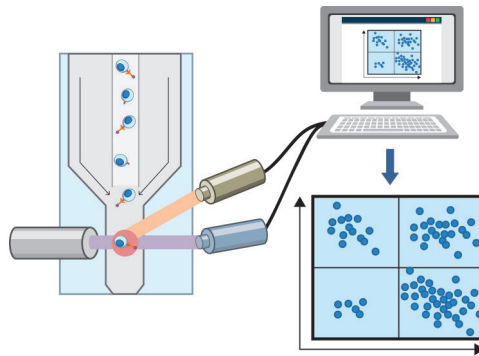
Complejo antígeno-anticuerpo: es la unión específica entre un anticuerpo y su respectivo antígeno. Dicha unión se debe a fuerzas no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

Citometría de flujo para determinar el fenotipo de la célula madre

El fenotipo de cada una de las células madre mencionadas en este capítulo, se puede establecer a través de una técnica cuantitativa llamada citometría de flujo. Esta técnica permite establecer, con precisión, si una población celular expresa cierta proteína o marcador de interés en su membrana citoplasmática o al interior de la célula⁶⁰. Lo anterior, debido a que el citómetro de flujo es un instrumento que analiza célula a célula por separado en

un capilar, de forma que cada una pasa a través de uno o más haces de luz, con el fin de determinar complejidad, tamaño celular y detectar cuantitativamente moléculas fluorescentes. En un gráfico llamado “*dot plot*” se representan en parejas estos parámetros y se establecen, por tanto, las características propias de cada linaje celular^{61,62} (**Figura 1.25**).

Figura 1.25. Esquema de funcionamiento de un citómetro de flujo.



Fuente: elaboración propia.

La fluorescencia es un fenómeno en el cual una sustancia, llamada fluorocromo, absorbe energía a una longitud de onda específica y la volverá a emitir a una longitud de onda mayor. Este concepto hace que las moléculas fluorescentes sean útiles en citometría de flujo, pues se asocian a anticuerpos que van a reconocer una proteína que se quiere detectar en la célula. De este modo, si el equipo detecta la fluorescencia es porque el anticuerpo se unió a una región de la proteína de interés (antígeno), lo que implica que la población celular expresa dicha molécula.

Para caracterizar poblaciones celulares en citometría de flujo, se utilizan anticuerpos fluoromarcados que reconocen los grupos de diferenciación celular o CD (*cluster of differentiation*, en inglés), moléculas características de cada linaje celular, pues están asociados con las diferentes etapas de diferenciación celular. Así, poblaciones como células madre mesenquimales, células

madre hematopoyéticas y células madre embrionarias, presentan grupos de diferenciación característicos que deben estar siempre presentes.

Conclusiones y perspectivas en Risaralda

La comprensión del funcionamiento de las células madre y su potencial terapéutico ha evolucionado sustancialmente durante las últimas décadas. En este capítulo, se detallan los elementos más interesantes de las células madre, los tipos que existen, sus principales aplicaciones y las técnicas del laboratorio que se emplean para caracterizarlas. Actualmente, las células madre se consideran como células esenciales para la regulación tisular y la preservación de la integridad de órganos y tejidos. Estas propiedades, junto con su capacidad de diferenciación en múltiples linajes, han facilitado en gran medida el papel de estas células como agentes terapéuticos. Sin embargo, uno de los principales obstáculos que enfrentan las células madre usadas en terapia, es establecer con precisión su capacidad de diferenciación antes y después del trasplante, debido a que reproducir el microambiente celular en el que se encuentran es bastante complejo e implica conocer las múltiples rutas metabólicas que las regulan.

En la Universidad Tecnológica de Pereira, con recursos de la Universidad y del Sistema General de Regalías de Colombia, se ha estado trabajando en el uso de la fibroina como un andamio sobre el cual se puedan crecer y diferenciar células madre de diferentes orígenes, hacia tejidos como cartílago y hueso, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades que afectan a estos dos tipos de tejido. Hasta el momento, se han generado y caracterizado fisicoquímicamente hidrogeles de fibroina de seda⁶³ que han permitido el crecimiento y proliferación de células normales (como HEK-293), así como células madre mesenquimales y derivadas de tejido adiposo. Se están realizando ensayos para determinar si los andamios de fibroina permiten la diferenciación de BM-MSC y ADSC hacia condrocitos o hacia tejido óseo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part I : stem cell source. *J Prosthodont Res.* 2012; 56(3):151–65.
2. Jameson L, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. *Harrison Principios de medicina interna.* 20ª Ed. McGraw-Hill Interamericana, Ciudad de México. Vol 1. 2018.
3. Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol.* 2002; 197:424–29.
4. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science.* 2007; 318:1917–20.
5. Payushina O. V. Localization and functions of mesenchymal stromal cells in vivo. *Biol Bull Rev.* 2016; 6:1–10.
6. Slack JM. Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science.* 2000; 287(5457):1431-3.
7. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004; 95(9):911-21.
8. Briggs M. Ethics of embryo manipulation. *BMJ.* 1992; 304(6839): 1446.
9. Escribá MJ, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A, Simón C. New techniques on embryo manipulation. *J Reprod Immunol.* 2002; 55(1-2):149-61.
10. International Society For Stem Cell Research. [Internet]. [2 de Julio de 2018]. Disponible en: <https://cutt.ly/Xf89Eoq>

11. Arias M & Felmer R. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch Med Vet.* 2009; 41:185–95.
12. Bianco P, Robey PG & Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell.* 2008; 2:313–19.
13. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(5):381–4.
14. Reina CM, Lara AR, Clavijo SR. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Revista Ciencias de la Salud.* 2007; 5:67–89.
15. Clark AD, Jorgensen HG, Mountford J, Holyoake TL. Isolation and therapeutic potential of human haemopoietic stem cells. *Cytotechnology,* 2003; 41(2-3): 111–131.
16. Korkmaz S, Altuntas F. What is the role of biosimilar G-CSF agents in hematopoietic stem cell mobilization at present? *Transfus Apher Sci.* 2017; 56(6):795-9.
17. Szmant HH. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 243:20-3.
18. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45(2):115–20.
19. Raposio E, Bonomini S, Calderazzi F. Isolation of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016; 102(7):909-12.

20. Kawashima N, Noda S, Yamamoto M, Okiji T. Properties of Dental Pulp–derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions. *J Endod.* 2017; 43:S31–S34.
21. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells.* 2004; 22(5):649-58.
22. Nishikawa E, Matsumoto T, Isige M, Tsuji T, Mugisima H, Takahashi S. Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord. *Regen Ther.* 2016; 4:48-61.
23. Lim J, Razi ZRM, Law J, Nawi AM, Idrus RBH, Ng MH. MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord. *Cytotherapy.* 2016; ;18(12):1493-502.
24. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004; 19(6):1450-6.
25. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(8):1928-42.
26. Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, et al. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med.* 2011; 364:1795–806.
27. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy.* 2013; 15:1054–61.

28. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315–7.
29. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2016; 1370:109–118.
30. Valencia J, Blanco B, Yáñez R, Vázquez M, Herrero-Sanchez C, Fernández-García M, et al. Comparative analysis of the immunomodulatory capacities of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Cytotherapy*. 2016; 18(10):1297-311.
31. Blanco B, Herrero-Sánchez M, Rodríguez-Serrano C, García-Martínez ML, Blanco JF, Muntión S, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on NK cells: implications in the transplantation setting. *Eur J Haematol*. 2016; 97(6):528-537.
32. Szöke K, Reinisch A, Østrup E, Reinholt FP, Brinchmann, JE. Autologous cell sources in therapeutic vasculogenesis: In vitro and in vivo comparison of endothelial colony-forming cells from peripheral blood and endothelial cells isolated from adipose tissue. *Cytotherapy*. 2016; 18:242–252.
33. Fayyad-Kazan H, Faour WH, Badran B, Lagneaux L, Najjar M. The immunomodulatory properties of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are defined according to multiple immunobiological criteria. *Inflamm Res*. 2016; 65(6):501-10.
34. Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells*. 2009; 2(1):59-68.

35. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006; 91(8):1017-26.
36. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006; 24:1294–301.
37. Chen YW, Wang JR, Liao X, Li SH, Xiao LL, Cheng B, et al. Effect of suction pressures on cell yield and functionality of the adipose-derived stromal vascular fraction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2017; 70(2):257-66.
38. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg*. 2017; 20:87–91.
39. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 103:1669–75.
40. Yamamoto A, Sakai K, Matsubara K, Kano F, Ueda M. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2014; 78:16–20.
41. Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental Pulp Stem Cell (DPSC) Isolation, Characterization, and Differentiation. *Stem Cells and Tissue Repair*. 1st Ed. Humana Press Inc. Totowa, NY. Vol. 1210. 91–115. 2014.
42. Rivera J. Diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental en células de genotipo neuronal sobre películas de fibroína. Tesis de Maestría en Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Tecnológica de Pereira. 2017.

43. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:595–605.
44. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007; 131(5):861-72.
45. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006; 126:663–76.
46. Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:568–74.
47. Goldthwaite CA. The Promise of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) [Internet]. [20 Julio de 2018]. Disponible en: <https://cutt.ly/Hf87EoX>
48. Huang Z, Ren PG, Ma T, Smith RL, Goodman SB. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*. 2010; 51:305–10.
49. Trippel SB. Growth Factor Regulation of Osteogenesis. *Bone Regeneration and Repair*. 1st Ed. Humana Press Inc. Totowa, NJ. Vol. 1. 113-132. 2005.
50. Danišovič L, Varga I, Polák S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 2012; 44(2):69-73.
51. Garten A, Schuster S, Kiess W. The Insulin-Like Growth Factors in Adipogenesis and Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012; 41:283–95.

52. Beier JP, Bitto FF, Lange C, Klumpp D, Arkudas A, Bleiziffer O, et al. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with primary myoblasts. *Cell Biol Int*. 2011; 35:397–406.
53. Linero IM, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*. 2014; 34(1):67–78.
54. Kalra K, Tomar P. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *Am J Phytomedicine Clin Ther*. 2014; 2:919–930.
55. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012; 17:6196–236.
56. Nagai A, Hattori T, Hirose M, Ogura A, Nozaki K, Aizawa M, et al. Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014; 34:214–20.
57. Ivell R, Teerds K, Hoffman GE. Proper application of antibodies for immunohistochemical detection: Antibody crimes and how to prevent them. *Endocrinology*. 2014; 155:676–87.
58. Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzad R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig*. 2019; 6: 19.
59. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014; 2014(10).
60. Edwards BS, Sklar LA. Flow Cytometry: Impact On Early Drug Discovery. *J Biomol Screen*. 2015; 20:689–707.
61. Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. Data analysis in flow cytometry: The future just started. *Cytometry A*. 2010; 77(7):705–13.

62. Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A*. 2006; 69(9):1037-42.

63. Zuluaga-Vélez A, Cómbita-Merchán DF, Buitrago-Sierra R, Santa JF, Aguilar-Fernández E, Sepúlveda-Arias JC. Silk fibroin hydrogels from the Colombian silkworm *Bombyx mori* L: Evaluation of physicochemical properties. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213303.

2

**CAPÍTULO
DOS**

HERRAMIENTAS CLAVE EN LA BIOTECNOLOGÍA

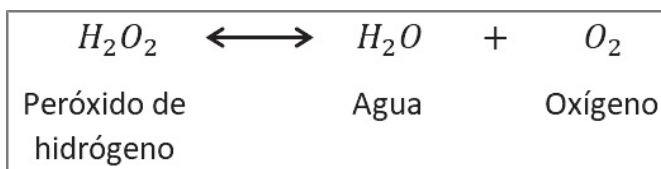
Inmovilizaci3n enzim3tica y sus aplicaciones

Fredy Alexander Tabares-Villa, Lina Marcela Pedraza-Ortiz, Diego Fernando C3mbita-Merch3n, Juan Carlos Sep3lvada-Arias. Grupo Infecci3n e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnol3gica de Pereira, Colombia.

Introducci3n

Las enzimas, como ya se describi3 anteriormente, son prote3nas, pero tienen unas caracter3sticas tan especiales que hacen que las clasifiquemos y estudiemos de manera separada. La primera y m3s importante de tales caracter3sticas es que las enzimas se comportan como *catalizadores*, es decir, son sustancias capaces de aumentar enormemente la velocidad de las reacciones qu3micas sin consumirse durante el proceso. Por ejemplo, la enzima catalasa hace que la reacci3n de descomposici3n del per3xido de hidr3geno en soluci3n –soluci3n que se conoce com3nmente como agua oxigenada– se lleve a cabo 10 millones de veces m3s r3pido (**Figura 2.1**). Esto equivale a decir que, si la descomposici3n del per3xido de hidr3geno normalmente toma un a3o, cuando la reacci3n se lleva a cabo en presencia de la catalasa se necesitar3an apenas 3,11 segundos para que la reacci3n ocurriese.

Figura 2.1. Descomposici3n del per3xido por la enzima catalasa.



Fuente: elaboraci3n propia.

Por otra parte, también podríamos hacer que la reacción avanzara más rápidamente si calentáramos la solución de agua oxigenada, pero esto requiere consumir energía. Aquí encontramos otra característica de las enzimas: disminuyen la energía necesaria para que las reacciones se lleven a cabo a velocidades razonables desde un punto de vista práctico.

Digamos ahora que la solución de peróxido de hidrógeno también contiene azúcar, ¿qué le pasaría al azúcar si adicionáramos la catalasa? ¿la descompondría también? La respuesta es NO, la catalasa es altamente específica al peróxido de hidrógeno y no tiene la capacidad de descomponer otras sustancias. Esta es otra importante característica de las enzimas: su elevada selectividad y especificidad, lo que significa que solo hacen reaccionar ciertas sustancias, sus sustratos, para producir solo ciertos productos.

Recordemos que, dado que las enzimas son catalizadores, no se modifican en el transcurso de la reacción. Supongamos ahora que al final de la reacción queremos recuperar la catalasa de la solución para poder usarla de nuevo. Para hacer esto, se requiere de numerosos y difíciles pasos de separación que consumirían otras sustancias y más energía. En tal caso, se puede pensar en hacer que la catalasa se ubique convenientemente en una fase diferente a la de la solución. Lo más obvio es obligarla a ubicarse en la superficie de una partícula sólida, de esta manera al final de la reacción basta con filtrar o centrifugar la solución, recuperar el sólido impregnado con la catalasa y reutilizar la catalasa adherida al sólido en la siguiente reacción. Cuando se emplean este tipo de materiales, se dice que la enzima está *inmovilizada* en la superficie del soporte sólido. Además de facilitar la recuperación de la enzima, frecuentemente la inmovilización permite aumentar la estabilidad de la misma, evitando que se degrade al verse sometida a temperaturas elevadas o a cambios marcados en el pH de la solución que la rodea, permitiendo que conserve su alta selectividad y especificidad, a pesar de encontrarse inmovilizada.

En este capítulo, se estudiarán los procesos de inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos y algunas aplicaciones que en la actualidad emplean enzimas inmovilizadas.

Principales métodos de inmovilización de enzimas

Existen cuatro metodologías generales para la inmovilización de enzimas. La primera es de tipo **atrapamiento**, como su nombre lo indica atrapa la enzima en una red polimérica que impide la salida de la enzima, pero permite el flujo de moléculas de sustrato. Este tipo de inmovilización no comprende ningún enlace entre la enzima y el soporte. La segunda es la **adsorción**, involucra la interacción entre la enzima y el soporte a través de fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. La tercera es la **unión covalente**, consistente en la interacción del soporte y la enzima a través de un enlace químico. Por último, la **reticulación** o **entrecruzamiento**, involucra la unión de enzimas a través de otras moléculas para formar un complejo de enzimas unidas, el cual es lo suficientemente grande para separarse de la solución como partículas de tamaño apreciable. En este caso, no se utiliza un soporte para inmovilizar las enzimas, sino que, más bien, la enzima reticulada es su propio soporte¹.

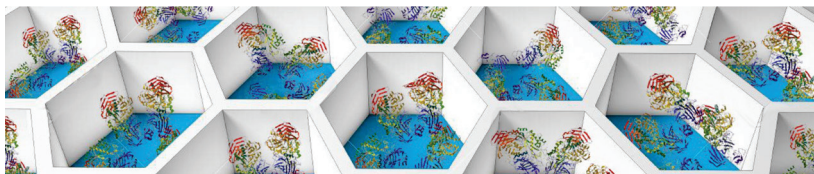
Métodos físicos de inmovilización de enzimas

Atrapamiento

Este proceso de inmovilización está basado en el uso de soportes porosos, normalmente, soportes poliméricos. Las enzimas quedarán retenidas al interior de los poros (**Figura 2.2**), aunque no estarán directamente unidas al soporte poroso. El proceso de inmovilización por este método ocurre mediante la adición de la enzima a una solución que contiene el polímero dispersado. Sobre esta solución se adiciona una sustancia que ocasiona que las moléculas del polímero se unan entre ellas, generando una red tridimensional que atrapa en su interior a la enzima, mientras

genera una estructura porosa que permite el intercambio de los sustratos entre la solución y el interior del polímero².

Figura 2.2. Enzima inmovilizada mediante la técnica de atrapamiento en un poro.



Fuente: elaboración propia

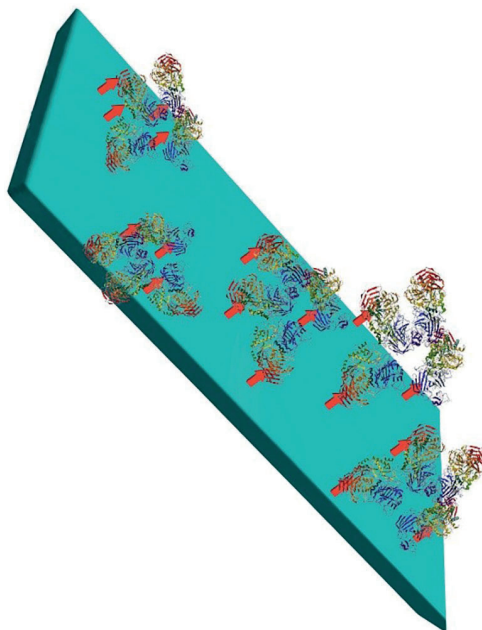
El atrapamiento de la enzima se puede realizar en soportes fibrosos o geles, por ejemplo, el colágeno, un tipo de proteína producida por los fibroblastos, que se encuentran en la piel y los huesos, y que forma estructuras fibrosas. Otro polímero muy utilizado para el atrapamiento de enzimas es el alginato de calcio, un carbohidrato proveniente de las algas marinas pardas².

Adsorción

La adsorción hace uso de las interacciones físicas generales entre el soporte y la enzima (**Figura 2.3**) que incluyen fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrógeno, todas ellas interacciones débiles entre moléculas que no modifican la estructura original de la enzima, por lo que conserva todas sus propiedades intactas^{3,4}.

Se puede utilizar con éxito una amplia gama de compuestos como soportes o portadores enzimáticos. Algunos son soportes de origen orgánico y otros de origen inorgánico. Los soportes inorgánicos más comunes son los óxidos de silicio, el dióxido de titanio, la hidroxiapatita, el carbón activado, el vidrio poroso y las arcillas. Los soportes de naturaleza orgánica incluyen compuestos sintéticos como poliamidas, poliésteres, ácido poliláctico y otros polímeros. Y compuestos derivados de fuentes naturales como el almidón, el gluten y diversos tipos de proteínas².

Figura 2.3. Adsorción de una enzima a un soporte sólido.



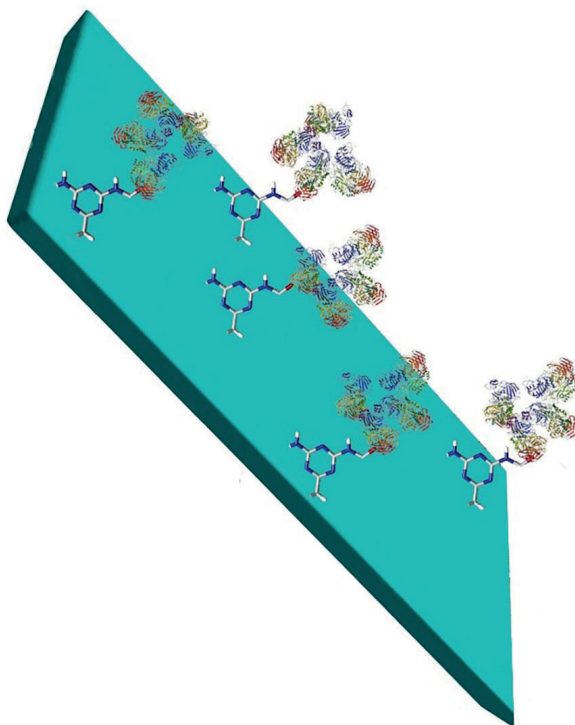
Fuente: elaboración propia.

Unión covalente

La unión covalente es una de las técnicas de inmovilización de enzimas más utilizadas. Implica la unión de la enzima al soporte mediante la formación de enlaces químicos –enlaces covalentes–, generando una interacción enzima-soporte mucho más fuerte que la que se genera en la adsorción (**Figura 2.4**). Esta unión se puede llevar a cabo mediante la activación de ciertos grupos funcionales de la superficie de los soportes. Estos grupos reaccionarán con la enzima y darán origen a un enlace covalente entre ellos⁵.

Además de proporcionar una mayor adherencia de la enzima, esta metodología de inmovilización presenta muchas otras ventajas, entre ellas se encuentran la protección de la enzima, para que esta no se desactive por efecto de un aumento de temperatura o por la adición de compuestos ácidos o básicos.

Figura 2.4. Inmovilización enzimática mediante unión covalente.

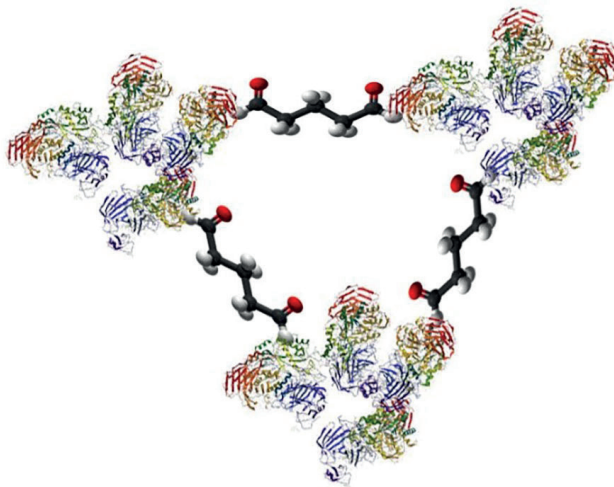


Fuente: elaboración propia.

Reticulación

En sentido estricto, la reticulación o entrecruzamiento no es un método de inmovilización, ya que no existe un soporte definido. La reticulación comprende un proceso de insolubilización de la enzima, a través de la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de la enzima, por medio de reactivos bifuncionales o multifuncionales, generando una red tridimensional insoluble que retiene la actividad de la enzima (**Figura 2.5**). Un reactivo de reticulación muy utilizado es el glutaraldehído. Las enzimas reticuladas presentan una mayor resistencia a la desactivación por altas temperaturas y al ataque de enzimas llamadas proteasas, las cuales pueden degradarlas².

Figura 2.5. Fenómeno de reticulación de una enzima.



Fuente: elaboración propia.

Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

Síntesis química a nivel industrial

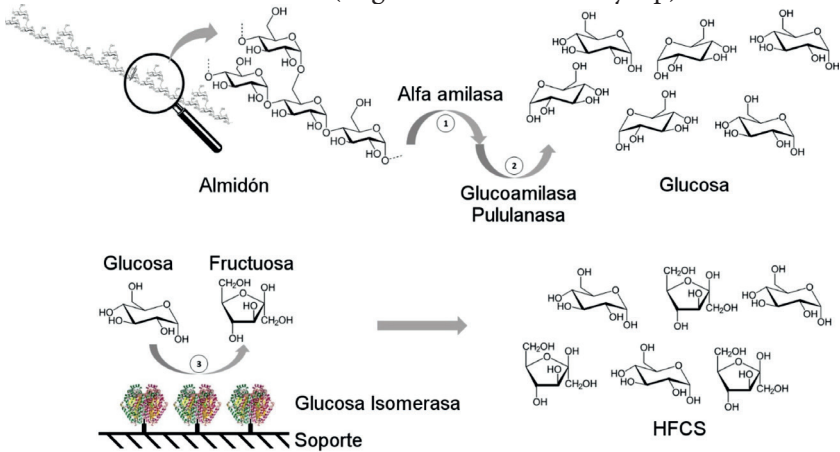
A pesar de las ventajas que supone el poder recuperar fácilmente la enzima después de que ella ha cumplido con su tarea de facilitar una reacción química, los procesos que emplean enzimas inmovilizadas no han alcanzado una aplicación industrial amplia. En este apartado, se estudiarán algunas de las aplicaciones industriales actuales de las enzimas inmovilizadas.

El primer proceso que hizo uso de las enzimas inmovilizadas fue el de la hidrólisis de la sacarosa para producir glucosa y fructosa, empleando la enzima invertasa inmovilizada sobre carbón activado o hidróxido de aluminio. Aunque este proceso nunca llegó a desarrollarse a escala industrial, un proceso similar a este constituye en la actualidad el mejor ejemplo de aplicación, no solo de las enzimas inmovilizadas, sino también de los procesos enzimáticos en general. Estamos hablando del

proceso para la obtención del jarabe de maíz alto en fructuosa, conocido como HFCS (*High Fructose Corn Syrup*), el cual es una mezcla a partes iguales de fructuosa y glucosa, dos tipos diferentes de azúcares. Este producto se emplea a gran escala en la fabricación de bebidas, pasteles, enlatados y confitería, ya que disminuye los costos de producción debido a que tiene un poder endulzante superior al de la sacarosa y al de la glucosa.

El proceso de producción del HFCS se basa completamente en el uso de enzimas. Para empezar, se trata el almidón procedente del maíz, o de otras fuentes como la tapioca, el trigo o el arroz, con la enzima *alfa amilasa*. El almidón es un polímero que las plantas producen como medio de almacenamiento de energía y se compone de largas cadenas de moléculas de glucosa, a veces en cantidades tan grandes como 200.000 moléculas de glucosa unidas una tras otra. Por ello, al almidón se le clasifica como un polisacárido. Al tratarlo con *alfa amilasa*, el almidón se rompe en unidades más pequeñas, de tres a diez moléculas de glucosa unidas, que se llaman oligosacáridos. Esta mezcla de oligosacáridos se hace reaccionar nuevamente con otras dos enzimas, la *glucoamilasa* y la *pululanasa*, las cuales se encargan de desdoblar los oligosacáridos en las moléculas de glucosa que los componen. Hasta este punto del proceso todas las enzimas empleadas, al igual que sus respectivos sustratos, se encuentran en solución, y es en la última etapa del proceso en donde se hace uso de una enzima inmovilizada. En dicha etapa, la solución de glucosa se hace reaccionar con la enzima *glucosa isomerasa*, inmovilizada en la superficie de diferentes sólidos como el dióxido de silicio, el dióxido de titanio o el óxido de aluminio, para producir el HFCS, transformando parte de la glucosa en fructuosa, su isómero. Una representación esquemática de este proceso de producción se muestra en la **Figura 2.6**⁶.

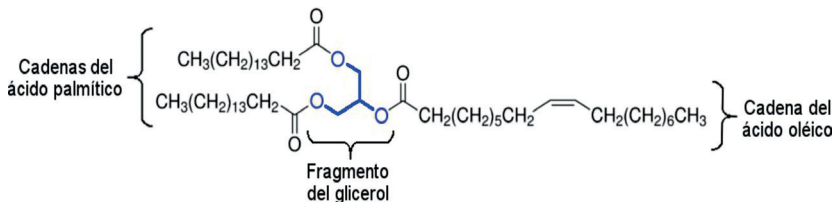
Figura 2.6. Obtención del jarabe de maíz alto en fructuosa, conocido como HFCS (High Fructose Corn Syrup).



Fuente: elaboración propia.

Otro campo de aplicación industrial de las enzimas inmovilizadas, se encuentra en la producción de los lípidos estructurados. Vale la pena recordar que los lípidos (grasas y aceites), técnicamente conocidos como *triglicéridos*, son moléculas derivadas del glicerol, en donde todos los grupos $-OH$ de esta molécula se reemplazan con ácidos grasos de la misma o diferente longitud de cadena. Por ejemplo, el aceite de palma (**Figura 2.7**) está constituido principalmente por 1,3-dipalmitoil-2-oleoil glicerol, lo que significa que los carbonos 1 y 3 del glicerol se esterifican con ácido palmítico (cadena de 16 carbonos) y que el carbono 2 se esterifica con ácido oleico (cadena de 18 carbonos con una insaturación –un doble enlace– en el carbono 9):

Figura 2.7. Estructura del aceite de palma.



Fuente: elaboración propia.

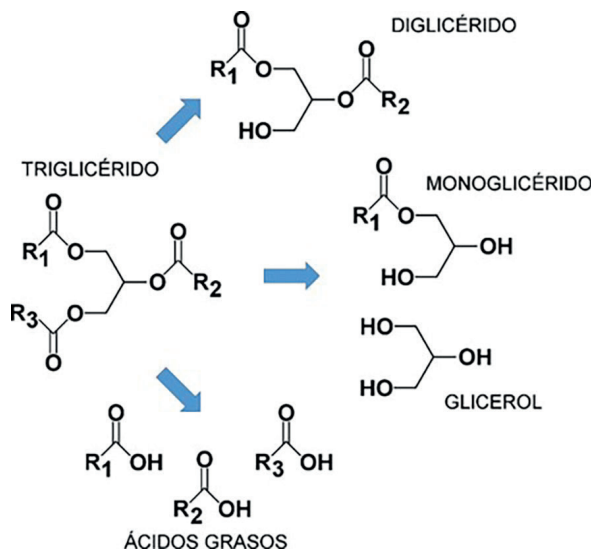
Entonces, los lípidos estructurados son aquellos triglicéridos que se modifican para cambiar la composición o la posición de los ácidos grasos que los conforman. El hecho de modificar la composición o la posición de los ácidos grasos tiene importantes consecuencias en las propiedades de los triglicéridos obtenidos, lo cual determinará las aplicaciones que pueden dárseles y, por lo tanto, su valor.

El proceso tradicional de modificación de las propiedades de los triglicéridos se denomina *interesterificación química*, y consiste en intercambiar las cadenas de ácidos grasos de un triglicérido hacia otro. Este proceso se lleva a cabo a altas temperaturas y presiones, lo que puede degradar los triglicéridos, y hace necesaria la purificación del producto terminado para remover las impurezas. Adicionalmente, este proceso no es selectivo y el intercambio de las cadenas de ácido grasos es aleatorio, lo cual es una desventaja si se quiere obtener productos de una composición/configuración determinada.

Los inconvenientes relacionados con la baja selectividad de los procesos químicos tradicionales pueden eliminarse con el empleo de procesos enzimáticos. Las *lipasas* son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su función metabólica es la de hidrolizar los triglicéridos para obtener diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol (**Figura 2.8**). Sin embargo, cuando los niveles de agua son muy bajos, las lipasas tienen la capacidad de efectuar la reacción de interesterificación de manera muy selectiva. Un ejemplo de la aplicación de las lipasas para la obtención de lípidos estructurados, es el de la fabricación de un sustituto de la manteca de cacao que se fabrica a partir del aceite de palma y de la triestearina⁷. Este proceso también puede llevarse a cabo reemplazando la triestearina por el estearato de etilo, el éster metílico del ácido esteárico, empleando una lipasa obtenida del hongo *Rhizopus niveus* inmovilizada en tierra de diatomeas. Para fabricar este sustituto de la manteca de cacao, la mezcla del aceite de palma y del estearato de etilo se

hace pasar de manera continua a través de un reactor de forma cilíndrica, el cual aloja en su interior a la lipasa inmovilizada en un soporte adecuado.

Figura 2.8. Hidrólisis de triglicéridos por acción de una lipasa.



Fuente: elaboración propia.

La fabricación de un sustituto de la grasa de la leche humana es otro ejemplo de proceso enzimático de obtención de lípidos estructurados. Aunque la leche humana continúa siendo el alimento más adecuado para un bebé, a veces es necesario emplear formulaciones de leche que contengan las grasas necesarias para satisfacer los requerimientos energéticos de los bebés en crecimiento. Además de la composición correcta de ácidos grasos, estas grasas también deben tener la misma distribución de ácidos grasos sobre el fragmento del glicerol. A diferencia de los aceites vegetales, los triglicéridos presentes en la grasa de la leche humana contienen ácido palmítico –el ácido graso saturado de 16 carbonos– casi que exclusivamente en la segunda posición (**Figura 2.9**). De hecho, el 1,3-dioleoil-2-palmitoil glicerol es el triglicérido mayoritario.

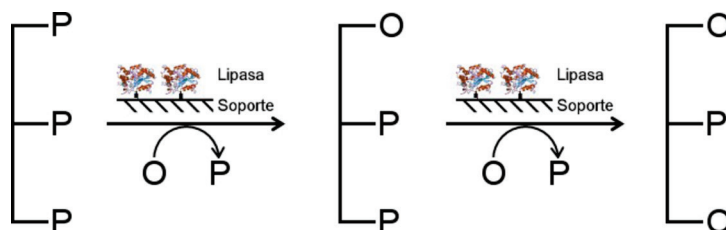
Figura 2.9. Triglicérido mayoritario de grasa de la leche humana (1,3-dioleoil-2-palmitoil glicerol).



Fuente: elaboración propia.

Betapol® es la marca de un producto desarrollado para servir como sustituto de la grasa de la leche humana. Este producto está basado en aceites vegetales y se obtiene a partir de la reacción entre la tripalmitina y el ácido oleico, en presencia de una lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada en una resina de intercambio iónico (**Figura 2.10**). La producción de Betapol® a escala industrial se lleva a cabo en un proceso en dos etapas. En la primera de ellas se hace reaccionar la tripalmitina con ayuda de la lipasa inmovilizada, en la segunda, el producto se envía a una etapa de purificación por destilación⁸.

Figura 2.10. Producción del Betapol®.



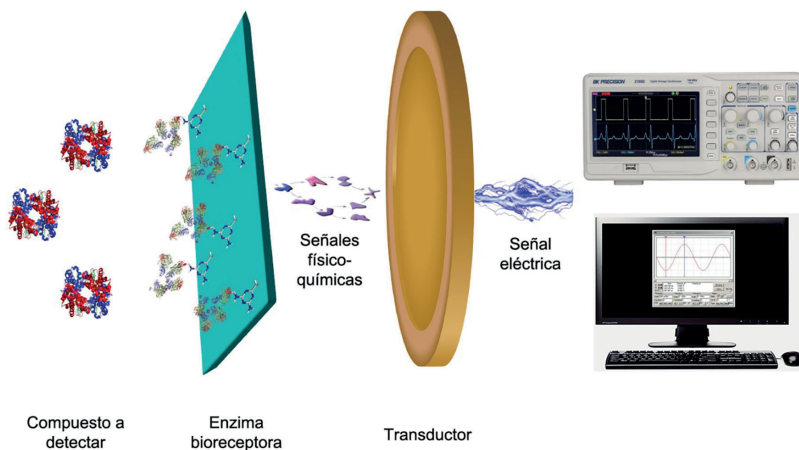
Fuente: elaboración propia.

Fabricación de biosensores

La inmovilización de enzimas se emplea para la fabricación de biosensores, los cuales son dispositivos que se usan para detectar la presencia de un compuesto biológico, llamado analito,

en pequeñas concentraciones y con una alta confiabilidad. Este analito puede ser una biomolécula o una estructura biológica como una célula o un microorganismo⁹. El biosensor consta principalmente de tres partes: (i) un componente que reconoce el analito y que puede ser una enzima, una proteína o un microorganismo, inmovilizado en un soporte, por ejemplo, nanopartículas de oro o magnetita; (ii) un dispositivo que captura la señal de reconocimiento del analito y la convierte en una señal eléctrica; y (iii) un procesador de señales o un computador que permite leer la señal generada y registrar la presencia del analito¹⁰, **Figura 2.11**.

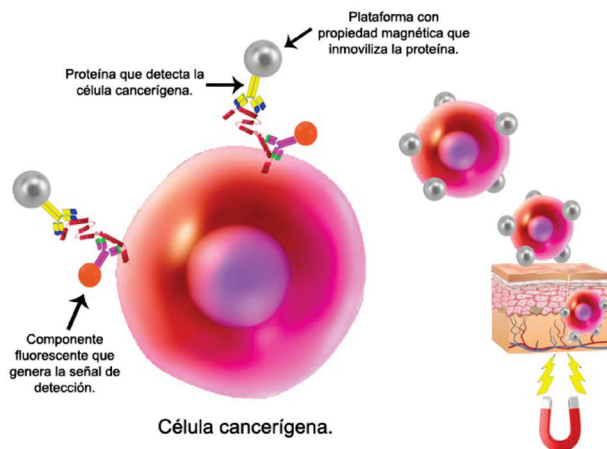
Figura 2.11. Esquema general de un biosensor.



Fuente: elaboración propia.

Entre los ejemplos de biosensores, se pueden encontrar aquellos que tienen la capacidad de identificar la presencia de células cancerosas en el organismo. Estos biosensores tienen inmovilizadas unas proteínas llamadas anticuerpos, las cuales reconocen componentes específicos de las membranas celulares de tipo cancerígeno –el analito–, permitiendo la detección y el diagnóstico en forma temprana del cáncer (**Figura 2.12**), lo que aumenta las posibilidades de éxito en el tratamiento¹¹.

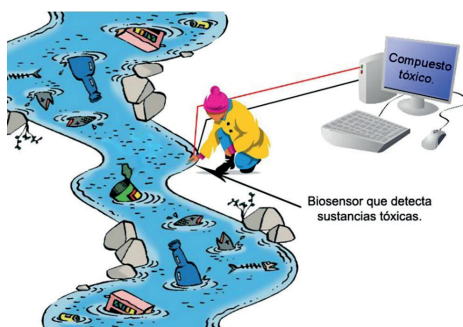
Figura 2.12. Biosensor para la identificación de células cancerosas.



Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, se han fabricado biosensores electroquímicos para la detección de compuestos tóxicos, tales como pesticidas y metales pesados (**Figura 2.13**). Esta aplicación se ha desarrollado con la idea de evitar la exposición de las personas a tales compuestos, en aquellos ambientes en donde se fabrican o se hace necesaria su utilización de manera controlada, pero también para diagnosticar el estado de contaminación del medio natural ocasionado por la liberación indiscriminada de compuestos peligrosos al medio ambiente por cuenta de los diferentes sectores industriales¹².

Figura 2.13. Biosensor electroquímico para la detección de compuestos tóxicos.

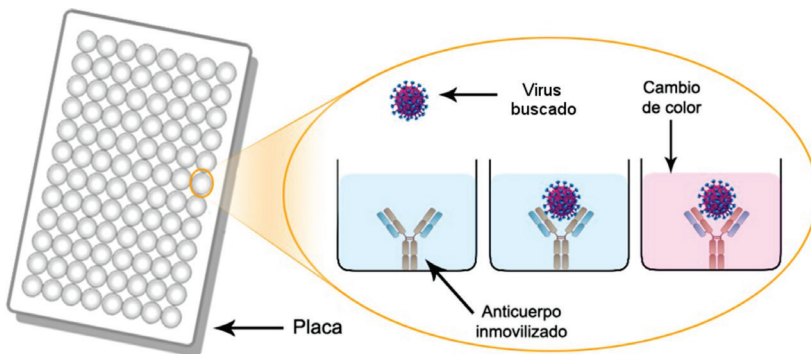


Fuente: elaboración propia.

Técnicas de detección por ELISA

ELISA es el acrónimo, en inglés, de “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”. En esta técnica se emplean anticuerpos unidos a enzimas e inmovilizados en un soporte llamado placa, para detectar la presencia de un virus, una bacteria o una molécula –el analito, que en este caso se denomina el antígeno–, en muestras de sangre o de cualquier otro fluido corporal. El anticuerpo tiene la capacidad de unirse únicamente al virus, bacteria o molécula para el que ha sido diseñado y cuando se presenta esta unión el anticuerpo cambia de color, lo que permite determinar la presencia o ausencia del microorganismo en cuestión (Figura 2.14). Por otra parte, los test de ELISA también permiten detectar otros tipos de analitos como, por ejemplo, diferentes tipos de proteínas. Esta capacidad se aprovecha para detectar, no solo moléculas, sino para el diagnóstico de enfermedades como las autoinmunes o aquellas producidas por agentes infecciosos, entre otras.

Figura 2.14. Inmovilización de proteínas - anticuerpos para técnicas de detección por ELISA.



Fuente: elaboración propia.

Las anteriores son solo algunas de las muchas aplicaciones de las enzimas inmovilizadas. Adicionalmente, existe una gran cantidad de trabajos de investigación que emplean este tipo de

procesos para la obtención de nuevos productos químicos o para el mejoramiento de los procesos de síntesis existentes. Nuestro país no es ajeno a la importancia de la investigación en esta rama de la ciencia. De acuerdo con una recopilación efectuada en la Universidad Tecnológica de Pereira, 136 grupos del Programa Nacional de Ciencia y Tecnología utilizan o han utilizado procesos biocatalíticos en sus líneas de investigación, y las enzimas son los biocatalizadores más utilizados en tales investigaciones¹³. De hecho, en esta misma Universidad se están llevando a cabo investigaciones relacionadas con la inmovilización de la enzima serratiopeptidasa, una enzima aislada de la bacteria *Serratia marscecens*, sobre nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Este tipo de sistemas inmovilizados pueden emplearse para disolver de manera selectiva coágulos formados en el sistema circulatorio, al dirigir la enzima inmovilizada, con ayuda de un imán, al lugar del cuerpo en donde se encuentra la obstrucción. Gracias a la capacidad de la serratiopeptidasa para degradar proteínas, el coagulo puede disolverse sin que afecte otras zonas del cuerpo. Se espera que esta enzima soportada encuentre otras aplicaciones en donde se requiera la degradación de proteínas, como en la industria de alimentos, el procesamiento de cueros o el tratamiento de aguas residuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cao L, Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org Lett.* 2000; 2(10):1361-1364.
2. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2013; 3:1-9.
3. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption.* 2014; 20:801-821.
4. Messing RA. [11] Adsorption and inorganic bridge formations. *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc. Vol 44. 148-169. 1976.
5. Arroyo M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica.* 1998; 39(2):111-127.
6. DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev.* 2013; 42(15): 6437-74.
7. Sheldon RA. Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. *Enzymatic Reactions in Organic Media.* Springer, Dordrecht. 1996, 266-307.
8. Akoh CC, Xu X. Production of Betapol and Other Specialty Fats. *Lipid Biotechnology.* Lipid Biotechnol. Marcel Dekker, New York. 2002; 461-478.
9. Nature Research – Biosensors [Internet]. [Consultado 29 Noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/subjects/biosensors>

10. Schuster B. S-Layer Protein-Based Biosensors. *Biosensors (Basel)*. 2018; 8(2):40.
11. Myung J, Khyati A, Chen J, Robert E, Hong S. Differential Detection of tumor Cells using a combination of cell rolling, multivalente binding and multiple antibodies. *Anal Chem*. 2014; 86(12):6088-6094.
12. Hernandez-Vargas G, Sosa-Hernández JE, Saldarriaga-Hernández S, Villalba-Rodriguez AM, Parra-Saldivar R, Iqbal HMM. Electrochemical Biosensors: A Solution to pollution detection with reference to environmental contaminants. *Biosensors (Basel)*. 2018; 8 (2):29.
13. Duque-Castaño DC, Ruiz-Piedrahita EM. Estado actual de las biotransformaciones con miras a la apertura de una línea de investigación en el laboratorio de fitoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira [Trabajo final de grado]. Universidad Tecnológica de Pereira, 2016.

Producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico

Juan David Anacona-Montilla, Diana María Gil-Villa, Lida Inés Mancilla-Estacio, Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

Los seres vivos están formados por una serie de compuestos químicos inorgánicos y orgánicos, denominados biomoléculas, como son el agua, los carbohidratos, las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales, además de conformar la estructura de los seres vivos, permiten gracias a sus propiedades químicas y físicas realizar todas las funciones vitales. Aunque todos son necesarios, las proteínas se consideran fundamentales, ya que participan en una gran diversidad de funciones, como son: formar la estructura celular, regular las funciones metabólicas, fisiológicas y responder a los estímulos ambientales. Estas moléculas están conformadas por unidades básicas, denominadas aminoácidos, que se unen formando cadenas lineales tridimensionales.

Existen 20 tipos de aminoácidos que, al unirse por enlaces, denominados peptídicos, establecen la secuencia primaria de la proteína, definiendo su forma y propiedades físico-químicas. Un ser vivo contiene cientos de miles de proteínas diferentes, responsables de mantener la vida de la célula. Las secuencias de las proteínas que forman un organismo vivo están regidas a su vez por los genes, que hacen parte del genoma del organismo. Un gen es la unidad básica de la herencia y se conforma de una cadena de miles de unidades básicas, conocidas como nucleótidos, que se distinguen en su base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina y Timina). Al igual que las proteínas, se identifica por la secuencia de aminoácidos, los genes se distinguen por la secuencia de nucleótidos.

La información de un gen es interpretada en una cadena de aminoácidos a través de dos procesos complejos, denominados transcripción y traducción, en el interior celular. La secuencia de nucleótidos de los genes determina la secuencia de aminoácidos de la proteína. Por lo tanto, las proteínas que le dan a una célula todas sus características están codificadas en los genes que una célula posee y, junto con otras secuencias de nucleótidos que regulan estos procesos, conforman el material genético celular. Un ser vivo contiene en su genoma toda la información que requiere para realizar sus procesos vitales y esta información se transfiere de una célula a otra, permitiendo conservar las características del individuo.

Existen algunas enfermedades en los seres humanos que se caracterizan por la falta de algunas proteínas o la producción inadecuada de ellas, debido a defectos o alteraciones en los genes o en los órganos encargados de su producción. Lograr administrar las proteínas que se producen en cantidades anormales, se ha convertido en parte de la terapia de muchas enfermedades frecuentes en el mundo. Desde hace algunas décadas, es posible la obtención de proteínas humanas, sin embargo, el proceso es costoso debido a su bajo rendimiento y en algunos casos con poca seguridad, pues puede contaminarse con agentes infecciosos. La ingeniería genética ha generado las herramientas para emplear diversos organismos, como bacterias, en la producción de proteínas humanas de importancia médica o industrial de una manera más eficiente, segura y a menor costo. La importancia de esta tecnología radica en la posibilidad de realizar la inserción de genes humanos en el ADN de bacterias u otros organismos, logrando obtener grandes cantidades de proteínas humanas con fines terapéuticos. Este capítulo pretende dar una idea general del proceso de obtención de las proteínas de interés farmacológico empleando las técnicas de la biotecnología.

Contexto histórico

Antes de conocer el proceso de elaboración de las proteínas recombinantes, es importante saber que, para producir la primera proteína usando la ingeniería genética, debieron ocurrir una serie de acontecimientos que permitieron obtener los conocimientos necesarios para la producción de proteínas de interés farmacológico. Uno de los eventos que permitió el desarrollo de la biotecnología fue la comprensión de la estructura del material genético y de los procesos que realiza una célula con los ácidos nucleicos para expresar la información allí contenida.

En 1871 se publicó el descubrimiento de la “nucleína” realizado por Friedrich Miescher, hoy conocida como ácido desoxirribonucleico (ADN), este médico y biólogo aisló la molécula del ADN de núcleos de glóbulos blancos, usando una solución alcalina y luego acidificándolos, lo que le permitió observar un precipitado compuesto por fósforo y nitrógeno. Sin embargo, sólo hasta 1888 se dió a conocer su composición química por Albrecht Kossel, quién continuó los experimentos de Miescher y definió que al ADN estaba compuesto por las bases nitrogenadas, adenina, citosina, guanina y timina, estos descubrimientos llevaron a investigar cómo el ADN se transmite de una generación a otra y determina, a su vez, los caracteres de un individuo. El conocimiento de este hecho sólo fue posible en 1944, gracias a los experimentos realizados por Avery, Macleod y McCarty en bacterias, y en 1952 por Alfred Hershey y Martha Chase quienes trabajaron con bacteriófagos.

En el año 1953, se realizó la determinación de la estructura de la doble cadena de ADN por los científicos James Watson y Francis Crick, basados en los patrones de difracción de Rayos X obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins. Este hallazgo facilitó la comprensión de los procesos de replicación y transcripción de la información genética. La identificación de los mecanismos para la formación de una proteína fue posible

gracias a la elucidación de la estructura de los ribosomas en el año 2000 y de la correcta determinación del código genético. Las instrucciones para la interpretación de la información genética, se logró en el año 1961 por Marshall Nirenberg y Heinrich J. Matthaei. Los estudios del ADN en diferentes organismos procariotes y eucariotes permitieron conocer que tanto los organismos simples como los complejos presentan un código genético similar, que puede interpretar la secuencia de un gen como la misma proteína por las células de otros organismos¹. (En el Capítulo 1 se hace una descripción sobre el descubrimiento del ADN).

Sin lugar a duda, un acontecimiento de gran impacto para la producción de proteínas recombinantes fue la capacidad de modificar el material genético de los organismos, de tal manera que se logró introducir un gen procedente de otro organismo y de manera sorprendente expresar la proteína codificada en ese gen exógeno. Esta manipulación del genoma de los seres vivos, denominada Ingeniería Genética o Tecnología del ADN recombinante, se inició gracias al aislamiento de las enzimas de restricción. Estas enzimas son proteínas producidas naturalmente en bacterias y virus que poseen la capacidad de modificar la estructura de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), permitiendo de esta manera cambiar de manera controlada el genoma de los organismos. Las enzimas de restricción, que facilitan la rotura de las moléculas de ADN en secuencias específicas (aporte de los investigadores Arber, Nathans y Smith en 1970) y las enzimas ligasas (aisladas y purificadas por los laboratorios de Gellert, Lehman, Richardson, y Hurwitz, en el año 1967), que permiten unir los extremos de dos fragmentos de ADN, son algunas de las enzimas que favorecieron el desarrollo de la Ingeniería Genética y con ella la producción de proteínas recombinantes¹.

Uno de los avances más representativos en la producción de proteínas recombinantes de uso farmacológico fue la producción de insulina humana en la bacteria *Escherichia coli*. La insulina es una hormona producida en el páncreas, que está encargada de regular la concentración de glucosa en la sangre; en algunas

personas, debido a la escasa o nula producción de insulina, la concentración de glucosa puede alcanzar niveles extremadamente altos y causar diferentes complicaciones en el funcionamiento del organismo. Sin embargo, esta deficiencia puede ser regulada mediante la administración exógena de insulina. Aunque desde 1923 estuvo disponible comercialmente la hormona insulina, gracias a su aislamiento de animales como cerdos y vacas, sus efectos secundarios dieron lugar a la necesidad de reemplazarla, lo cual se da en el año 1982^{1,2}, cuando la insulina humana recombinante fue aprobada para su uso en humanos.

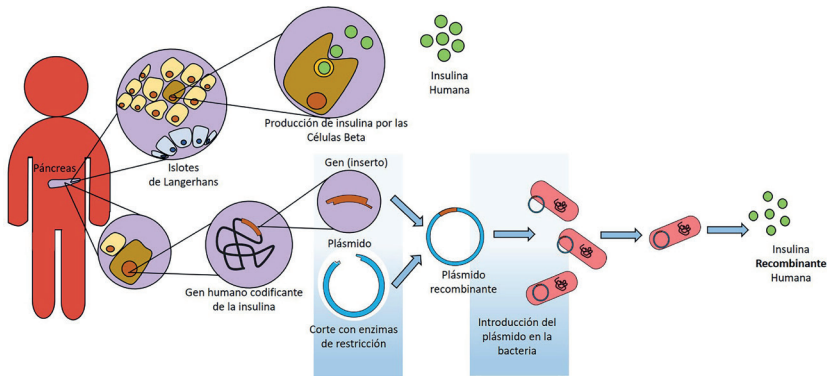
Debido a la ausencia de mecanismos de modificación post-traduccionales, las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* no pueden ser glicosiladas, lo que modifica notablemente sus propiedades, llegando a ocasionar efectos secundarios no deseados. Con el fin de disminuir los efectos secundarios generados por el uso de proteínas recombinantes producidas en *E. coli*, se han desarrollado, en las últimas décadas, cepas modificadas genéticamente en las cuales pueden obtenerse proteínas complejas, con modificaciones postraduccionales propias de células eucariotas³.

Definición de proteínas y proteínas recombinantes

Una proteína es una biomolécula constituida por unidades básicas, denominadas aminoácidos, que se unen entre sí a través de enlaces químicos (peptídicos), dando formas diversas y complejas a las proteínas. Estas biomoléculas cumplen una gran cantidad de funciones en los seres vivos, dentro de las cuales encontramos: conformación de la estructura celular y de los tejidos, aceleración de las reacciones químicas, movimiento, defensa, entre otras. Por esta razón, la deficiencia de cualquier proteína debida a factores externos o internos puede traducirse en serios problemas de salud. Razón por la cual uno de los objetivos principales de la biotecnología y la biología molecular es la producción de proteínas que puedan suplir dichas necesidades médicas.

Las proteínas recombinantes son **proteínas producidas en organismos en los que naturalmente no se sintetizan**. Por ejemplo, la insulina, una proteína sintetizada en los mamíferos, incluyendo los seres humanos, se ha logrado producir exitosamente a gran escala en bacterias y levaduras (**Figura 2.15**). Esta metodología, conocida como tecnología de ADN recombinante, ha logrado producir una gran cantidad de proteínas y con ello salvar miles de vidas⁴.

Figura 2.15. Síntesis de insulina humana y producción de insulina humana recombinante.



Fuente: elaboración propia.

El objetivo que persigue la ingeniería genética en la actualidad, con respecto a la producción de proteínas recombinantes, es lograr sintetizar moléculas de forma menos costosa y que, a su vez, sean más seguras, evitando la aparición de efectos secundarios al ser utilizadas como medicamentos⁴. La tecnología de ADN recombinante ha permitido la síntesis de una gran variedad de proteínas, dentro de las cuales encontramos enzimas, factores de crecimiento, hormonas y otras moléculas importantes para la vida. La producción de estas proteínas se ha basado en tres grandes estrategias: síntesis química, expresión *in vivo* y producción en sistemas libres de células o *in vitro*^{5,6}.

La **síntesis química de proteínas** es una estrategia en la que los fragmentos de una proteína (péptidos) son ensamblados en condiciones controladas. La desventaja de esta estrategia, es la dificultad para la producción de los péptidos o bloques que formarán las proteínas sintéticas. En los **sistemas de expresión *in vivo*** se utilizan diferentes organismos (bacterias, hongos, plantas, mamíferos, entre otros) para que produzcan la proteína de interés, es decir, se utiliza al organismo como una fábrica biológica. El **sistema *in vitro*** reúne en el laboratorio los componentes utilizados por la célula, para producir una proteína en condiciones naturales (traducción), de tal manera que la molécula es sintetizada en un ambiente que semeja al de la célula y que contiene los elementos básicos para la producción de la proteína^{5,7}.

La producción de proteínas recombinantes no es fácil, requiere el análisis de diferentes factores que influyen en el resultado final, siendo importante evaluar los métodos de transformación, el control de la expresión genética, la expresión en diversas plataformas, la selección de la proteína expresada, su acumulación, mantenimiento y estabilidad en el sistema de expresión y fuera de este.

Producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes se realiza siguiendo cinco grandes etapas (**Figura 2.16**):

1.1.1 Obtención del gen de interés.

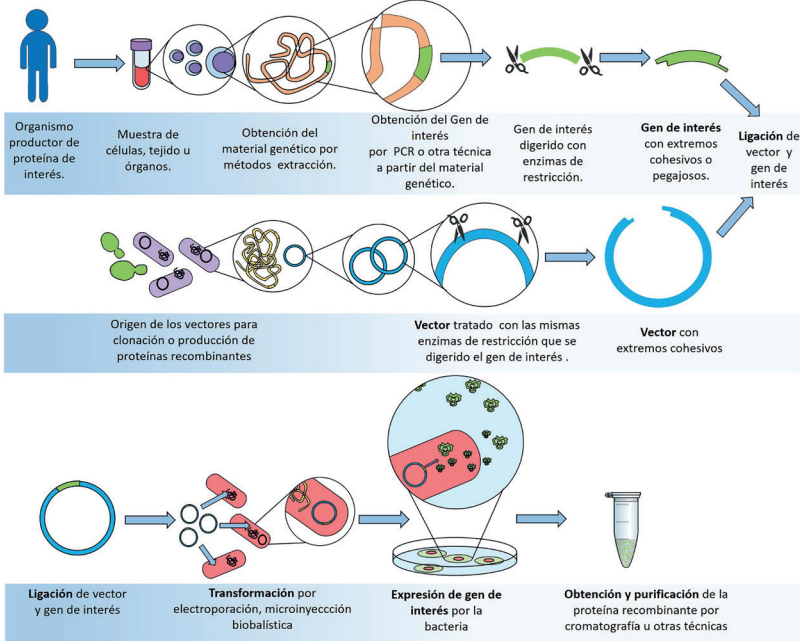
1.1.2 Construcción de la molécula de ADN recombinante (vectores).

1.1.3 Selección del sistema de expresión.

1.1.4 Obtención y purificación de la proteína recombinante.

1.1.5 Obtención del gen de interés.

Figura 2.16. Proceso de generación de una proteína recombinante.



Fuente: elaboración propia.

Cuando se elige producir una proteína como molécula recombinante, es necesario tener en cuenta diversos aspectos dentro de los cuales se incluyen las propiedades químicas, biológicas, lugar de producción de la proteína, estrategia de purificación y su potencial uso farmacológico. Este análisis inicial permitirá dar una idea general de qué tan viable es la producción de la proteína. Las consideraciones básicas en la producción de una proteína recombinante parten de la obtención del gen que codifica dicha proteína, denominado **gen de interés**. El gen de interés es un fragmento del material genético (ADN) que codifica o da origen a la proteína que se quiere sintetizar, es un código de letras (nucleótidos) (5'..ACGCGATAA..3') que tiene la información para crear una proteína. El gen puede obtenerse usando diferentes estrategias, entre ellas la amplificación enzimática (multiplicación), por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR propuesta por Kary Mullis en 1985. Esta técnica permite obtener

millones de copias de un fragmento de ADN, usando una enzima llamada DNA polimerasa y unas secuencias cortas de nucleótidos complementarias al fragmento de interés.

Otra estrategia para la obtención del gen de interés es la **síntesis química de genes**, en la que se construye mediante reacciones químicas la secuencia codificante (generalmente a cargo de una empresa comercial). Esta estrategia permite incluir cambios en la secuencia del gen, que aumenten la eficiencia de expresión de la proteína. Como complemento a estas dos opciones, es importante mencionar que en la actualidad existen bases de datos o bibliotecas virtuales en las que se reúne toda la información disponible de la proteína de interés (Centro Nacional para la Información Biotecnológica o NCBI y *Protein Data Bank* o PDB) y que son de gran utilidad al momento de producir una proteína recombinante para uso humano, ya que a través de ellas se puede conocer de forma precisa la secuencia y las modificaciones que debe incluir para ser funcional en los humanos^{4,6}.

Construcción de la molécula de ADN recombinante

La molécula de ADN recombinante es construida usando secuencias de ADN, que se conocen como vehículos. Estos vehículos son capaces de incorporar el ADN exógeno (el gen de interés) a su genoma y luego transferirlo a células compatibles o al organismo donde se expresará como una proteína. La unión entre el gen de interés y el vehículo, que se conoce también como vector, conforma la molécula de ADN recombinante. Los diferentes vectores tienen en común la capacidad de replicarse autónomamente, es decir, pueden multiplicarse independientemente del ADN que se encuentra en la célula hospedera. Existen diferentes tipos de estos elementos: los plásmidos, cósmidos y fagos, que son los vectores más utilizados; se diferencian en el tamaño del fragmento que puede ser insertado en ellos, con una capacidad máxima de miles de pares de bases⁸.

Los plásmidos y los cósmidos son moléculas de ADN de doble cadena circular, mientras los fagos son de forma lineal. Existen además otros vectores denominados BAC (Cromosomas Artificiales Bacterianos) y YAC (Cromosomas Artificiales de Levadura), que permiten la clonación de fragmentos de cromosomas (millones de pares de bases). Los plásmidos son componentes del genoma de las bacterias, los fagos se constituyen de genomas modificados de virus bacteriófagos y los cósmidos son modificaciones de los fagos con secuencias de plásmidos. Los vectores son seleccionados de acuerdo a las necesidades de expresión de la proteína⁹. Para autorreplicarse, los vectores requieren una secuencia denominada origen de replicación, reconocida como *ori*. Esta secuencia corresponde al punto de inicio de la replicación del material genético, proceso necesario para la generación de una gran cantidad de copias del vector, las cuales posteriormente serán expresadas en una mayor cantidad de proteínas.

Para la correcta expresión del gen, los vectores requieren secuencias específicas en su extremo terminal o 3', llamadas *señales de terminación* que permiten finalizar la multiplicación de la molécula. Para monitorear el proceso de transferencia del gen de interés a las células y la expresión de la proteína, los vectores contienen secuencias que permiten seleccionar las células que los contienen y las que expresen la proteína, aportando nuevas características. Las características empleadas frecuentemente para esta selección son la capacidad de sobrevivir en presencia de antibióticos, en el caso de células bacterianas, o la adición de una característica visible a la proteína recombinante, como fluorescencia, para las células eucariotas. Estas características le permiten al investigador seleccionar las células que han sido transformadas exitosamente y que tienen la capacidad de producir la proteína de interés^{4,8}.

Para la construcción de la molécula de ADN recombinante, es necesario utilizar **enzimas de restricción**, las enzimas fueron aisladas de bacterias y virus, identificando gran variedad de las

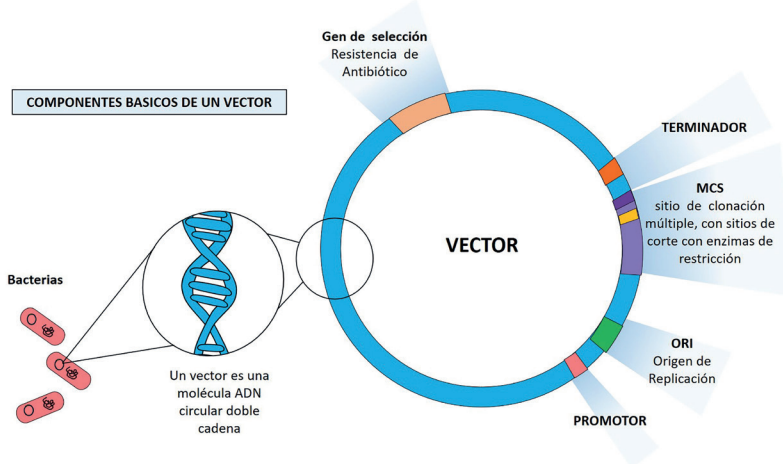
mismas, con diferentes funciones, como son la capacidad de invertir la dirección normal de la transferencia de información genética (transcriptasas inversas), es decir, sintetizan ADN a partir de ARN, adherir fragmentos de ADN (ADN ligasas), reconocer y cortar secuencias específicas del ADN (endonucleasas de restricción)¹.

Las endonucleasas de restricción permiten cortar y aislar un gen de interés que codifique para una proteína determinada y así poder introducirla en células capaces de expresarla. Con este procedimiento, el organismo que recibe la secuencia que codifica el gen de interés, presente en la molécula de ADN recombinante, podrá producir una proteína igualmente recombinante o heteróloga. Las enzimas o endonucleasas de restricción son proteínas que cortan la doble cadena de ADN de las moléculas que forman el vector y el fragmento de interés. Al cortar los extremos o bordes de ambas moléculas (vector e inserto) es posible volver a formar el enlace de las dobles cadenas de ADN, facilitando la unión entre las dos moléculas, para conformar una nueva, denominada recombinante. Para facilitar la expresión del gen de interés los vectores deben contener una secuencia reguladora antes del gen de interés (extremo 5'), que se denomina **promotor**. La secuencia del promotor es reconocida por una serie de proteínas y por la ARN polimerasa, lo que permite la transcripción del gen, que conlleva a la formación de un ARNm, que posteriormente será traducido para producir la proteína en la célula.

El promotor también define el sitio específico dentro de la célula u organismo donde se expresará el gen. El promotor, entonces, es fundamental en la expresión exitosa de cualquier proteína, ya que determina la velocidad y la cantidad de molécula producida. Los promotores pueden clasificarse en fuertes o débiles, dependiendo de la capacidad de generar mayor o menor cantidad de proteínas, es por esto que se debe considerarse cuidadosamente su elección^{10,11}. Dentro de la construcción del vector, la **ligación** o unión entre las diferentes moléculas (vector, promotor y ADN)

se hace posible utilizando otra enzima denominada ADN ligasa, la cual enlaza dichas moléculas de forma fuerte a través de enlaces covalentes. Los componentes necesarios de un vector se presentan en la **Figura 2.17**.

Figura 2.17. Vector y componentes básicos.



Fuente: elaboración propia.

Selección del sistema de expresión

En la selección de un sistema de expresión para la síntesis de una proteína recombinante, se deben tener en cuenta los siguientes factores, a saber: el origen biológico (especie), las propiedades químicas y biológicas de la proteína, su posterior aplicación y el bioproceso que se usará para su purificación y producción a gran escala. Cuando se requiere producir una proteína de un organismo eucarionte, un sistema que contenga esta misma característica será más eficiente que un organismo procarionte. Sin embargo, debido a que existen diferencias entre los diferentes tipos de células eucariotas, es necesario tener presente el tipo de modificaciones postraduccionales a que es sometida la proteína de interés en la célula nativa. Las características físicas y químicas de la proteína, como la solubilidad, estabilidad a cambios de pH, sensibilidad a la temperatura, se asocian con la eficiencia

del proceso de purificación y definen el sistema de expresión a seleccionar. El sistema de expresión afecta también la capacidad de toxicidad de la proteína sobre el hospedero, el grado de pureza y el lugar de la célula donde se puede recuperar dicha proteína expresada; extracelular o intracelular³.

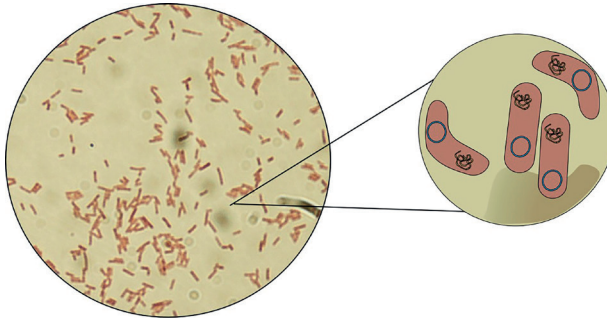
Un sistema de expresión corresponde a una célula o un organismo en el que se espera que la proteína de interés pueda ser sintetizada, lo que se denomina como la biofábrica de dicha molécula. Existen diferentes sistemas utilizados para la producción de proteínas, entre los que se encuentran: bacterias, hongos, parásitos, plantas, insectos y mamíferos; los cuales son seleccionados dependiendo de las características de la molécula que se quiere producir⁴.

Bacterias: debido a las características biológicas que reúnen y la facilidad en su cultivo y mantenimiento, las bacterias son las células más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes. Este sistema, además, tiene un alto rendimiento en la producción de proteínas. Vale la pena resaltar la gran cantidad de vectores que pueden emplearse en estos organismos y la facilidad con la que se puede controlar el proceso de expresión. La principal desventaja en el sistema de bacterias es la ausencia de mecanismos para realizar las modificaciones postraduccionales, cambios realizados en las proteínas producidas, llevándolas a obtener la estructura adecuada que les permite cumplir su función como molécula. A pesar de esta deficiencia, las bacterias continúan siendo consideradas uno de los sistemas más empleados¹².

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*, **Figura 2.18**), ha sido ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para producir proteínas recombinantes, usadas con fines diagnósticos, terapéuticos o como vacunas. Gracias al conocimiento de la fisiología y la genética de *E. coli*, los procedimientos de obtención de proteínas recombinantes pueden llegar a ser relativamente más económicos. Debido a la velocidad en que se reproducen, es posible obtener en poco tiempo muchas copias del gen humano

insertado en el ADN bacteriano. Sin embargo, la baja capacidad de secretar las proteínas al medio, es una desventaja para su uso con fines de producción. Por otro lado, la ausencia de modificaciones postraduccionales y el riesgo de contaminación con endotoxinas que afectan la salud, impide su aprobación para producir proteínas útiles en la industria alimentaria¹².

Figura 2.18. *E. coli* , Bacteria Gram Negativa utilizada como sistema de expresión .

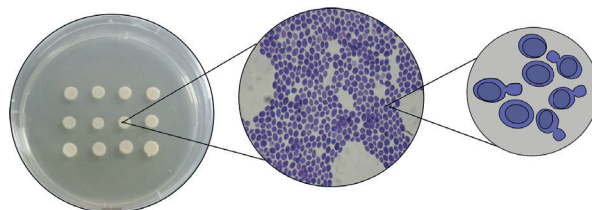


Fotografía tomada por Silvia Córdoba-Romero. Figura realizada por Juan David Anacona-Montilla

Hongos: los sistemas de expresión basados en levaduras (hongos) son muy utilizados en la industria y/o la academia, debido a que se ha demostrado que pueden ser una fuente eficiente y económica de proteínas de eucariotas superiores. El uso de hongos para la producción de proteínas recombinantes es justificado por el hecho de que conservan las ventajas de microorganismos unicelulares, siendo de fácil manipulación y rápido crecimiento. Además, tienen organización celular eucariota, permitiéndoles realizar modificaciones postraduccionales, como procesos de expresión y maduración, características propias de células animales y vegetales^{3,11}. El hongo *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 2.19**) es uno de los organismos eucariontes mejor caracterizados, dado que se conoce la secuencia completa de su genoma debido, en parte, a que ha sido ampliamente usado desde la antigüedad para la producción de pan, cerveza y vino. Actualmente, se usan otras especies de hongos con el fin de mejorar la producción y

disminuir los costos. Entre los nuevos microorganismos usados se encuentran: *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lastis*, los cuales poseen las mismas características anteriormente mencionadas para las levaduras, con la posibilidad de producir una mayor variedad de moléculas. Estos organismos son la base de diversos procesos desarrollados a escala industrial y son considerados sistemas seguros de producción^{3,11}.

Figura 2.19. *Saccharomyces sp*, Levadura utilizada como sistema de expresión.



Fotografía tomada por Silvia Córdoba-Romero. Figura realizada por Juan David Anacona-Montilla.

A continuación, se muestra una tabla con las ventajas y desventajas de las bacterias y levaduras más usadas para la producción de proteínas recombinantes (**Tabla 2.13**).

Tabla 2.1 Ventajas y desventajas de las bacterias y levaduras más usadas para la producción de proteínas recombinantes.

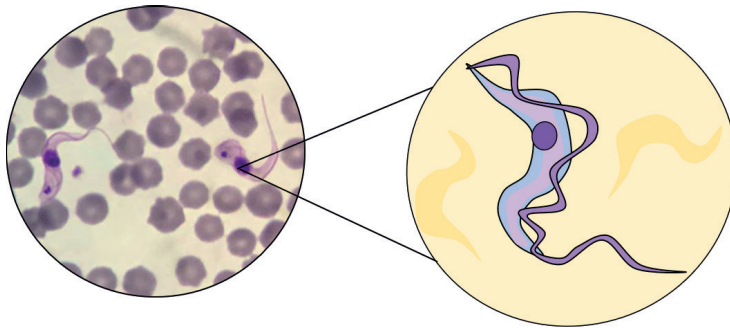
BACTERIAS	
<i>Escherichia coli</i>	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
Buen nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética.	Ineficiente secreción de la proteína al medio de cultivo.
Se cuenta con gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes.	Formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular.
Fácil manipulación.	La síntesis de las proteínas heterólogas induce a un incremento de la proteólisis celular.
Cultivos baratos con altas densidades celulares.	Realiza pocas modificaciones postraduccionales.
Niveles moderados de producción de la proteína recombinante.	Generación de endotoxinas dañinas para la salud humana y animal.

<i>Bacillus subtilis</i>	
Secreción de la proteína heteróloga.	<p>Secreta una gran cantidad de proteasas afectando el rendimiento del producto recombinante.</p> <p>Dispone de pocos vectores de expresión y elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes comparado con <i>E. coli</i>.</p> <p>Menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.</p>
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<p>Sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la biología molecular y la fisiología.</p> <p>Genoma totalmente secuenciado.</p> <p>Vectores de expresión y cepas disponibles.</p> <p>Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial.</p> <p>Cultivos baratos.</p> <p>Se producen altos niveles de la proteína recombinante.</p> <p>Realiza modificaciones postraduccionales.</p> <p>Es considerado como organismo seguro (GRAS).</p>	<p>Produce hiperglicosilaciones.</p> <p>Baja eficiencia en la secreción de la proteína heteróloga.</p>
<i>Pichia pastoris</i>	
<p>Emplea los promotores más fuertes y eficientemente regulados de los conocidos.</p> <p>Vectores de expresión y cepas disponibles.</p> <p>Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial.</p> <p>Secreción eficiente de la proteína heteróloga.</p> <p>Medios de cultivos baratos y formulados libre de toxinas y pirógenos.</p> <p>Los cultivos alcanzan altas densidades celulares.</p> <p>Altos niveles de producción.</p> <p>Bajos niveles de secreción de proteínas endógenas facilitando la purificación de la proteína heteróloga.</p>	<p>Produce glicosilaciones no deseables para algunas proteínas.</p> <p>Actividad proteolítica.</p> <p>Algunas proteínas no se producen de forma eficiente.</p>

Adaptado de Guerrero-Olazarán et al, 20043.

Parásitos: son sistemas de expresión menos utilizados (**Figura 2.20**), a pesar de estar asociados ampliamente con enfermedades, también poseen un gran potencial en la producción de proteínas recombinantes, sobre todo cuando se requiere producir moléculas complejas como las que se sintetizan en los seres humanos. Dentro de las ventajas que poseen los parásitos, la principal es la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, específicamente en aquellas proteínas que requieren azúcares en su estructura para ser funcionales, proceso que se denomina glicosilación. Por estas características los parásitos corresponden a una biofábrica potencial para proteínas¹³.

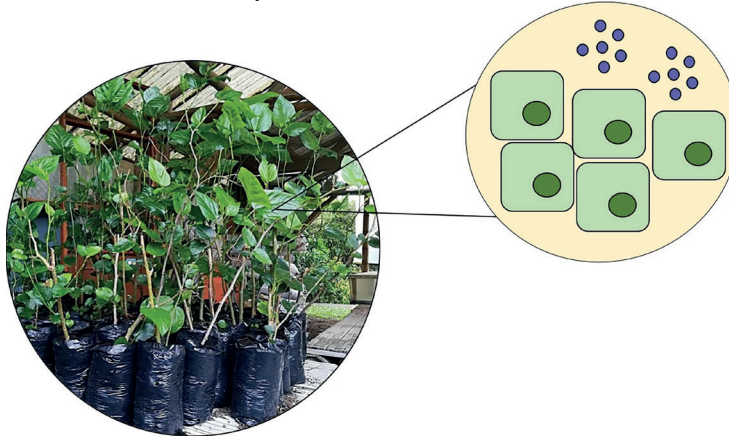
Figura 2.20. Especies de parásitos del orden Trypanosomatida han sido utilizados para producción de proteínas recombinantes.



Fotografía tomada por William Alberto Cañón-Franco. Figura realizada por Juan David Anacona-Montilla

Plantas: las plantas (**Figura 2.21**) como fábricas biológicas para la producción de proteínas presentan diversas ventajas, la primera de ellas es que suponen un sistema de bajo costo cuando se llevan a gran escala, es decir, a nivel de industrial. Otra ventaja es que permiten guardar o almacenar de forma estable la proteína dentro de la semilla, de tal manera que se facilita su conservación, transporte y almacenamiento. Las plantas han sido ampliamente utilizadas para la producción de diversas proteínas debido a que no propagan virus y patógenos a los seres humanos, además de esto, en la actualidad también sirven como plataformas para producción de vacunas^{4,14}.

Figura 2.21. La planta *Morus sp* ha sido utilizada como plataforma de proteínas recombinantes.



Fotografía y Figura por Juan David Anacona-Montilla.

Insectos: dentro de los organismos complejos o eucariotas, los insectos (**Figura 2.22**) han tomado gran importancia en la producción de proteínas recombinantes, esto debido a sus diversas características biológicas, dentro de las cuales se destaca la capacidad de realizar modificaciones a las proteínas para hacerlas funcionales, la velocidad de producción, el bajo costo y la facilidad de sintetizarlas en gran cantidad. Además de estas ventajas, se ha demostrado que las proteínas recombinantes producidas son seguras para el uso en humanos y animales¹⁵.

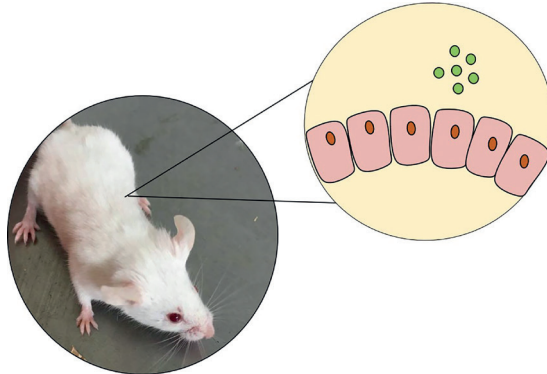
Figura 2.22. Huevo, gusano y polilla del gusano de Seda *B. mori*.
Plataforma de expresión de proteínas recombinantes.



Fotografías tomadas por Juan David Anacona-Montilla.

Mamíferos: los organismos eucariotas y sus células (**Figura 2.23**) pueden ser empleados como biofábricas en la producción de diversas proteínas, con variadas aplicaciones en diversos campos, entre los que se destacan el nutricional, agrícola y farmacéutico principalmente. Estos sistemas poseen la ventaja de producir proteínas que conservan sus características originales, al igual que su función biológica. Sin embargo, una de las desventajas que poseen los sistemas eucariotas, principalmente los basados en mamíferos, es el costo que supone el mantenimiento de las biofábricas, dificultad para llevarlos a gran escala y la complejidad del cultivo. No obstante, son en algunos casos la única estrategia para producir cierto tipo de proteínas^{15,16}.

Figura 2.23. Los roedores se encuentran entre los mamíferos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes.



Fotografía tomada por Natalia López-Orozco. Figura realizada por Juan David Anacona-Montilla.

Métodos de transformación

Un método de transformación es una herramienta que permite introducir la molécula recombinante (vector - ADN - Promotor) hasta el interior de la célula, donde se espera que la proteína se sintetice, este proceso se denomina **transformación o transfección**. Para alcanzar este objetivo se tienen diferentes métodos y cada uno de ellos genera alteraciones en la membrana

de la célula, de esta manera se generan poros a través de los cuales entra el ADN. Los métodos utilizados son seleccionados de acuerdo a las necesidades y la eficiencia de los mismos, es decir, a la capacidad de integrar el material al mayor número de células. Las técnicas utilizadas para la transformación se describen a continuación (**Figura 2.24**):

Electroporación: la electroporación es una técnica en la que, a través de descargas eléctricas, la membrana de la célula se ve alterada formando poros, estos a su vez permiten el paso de la molécula de ADN recombinante.

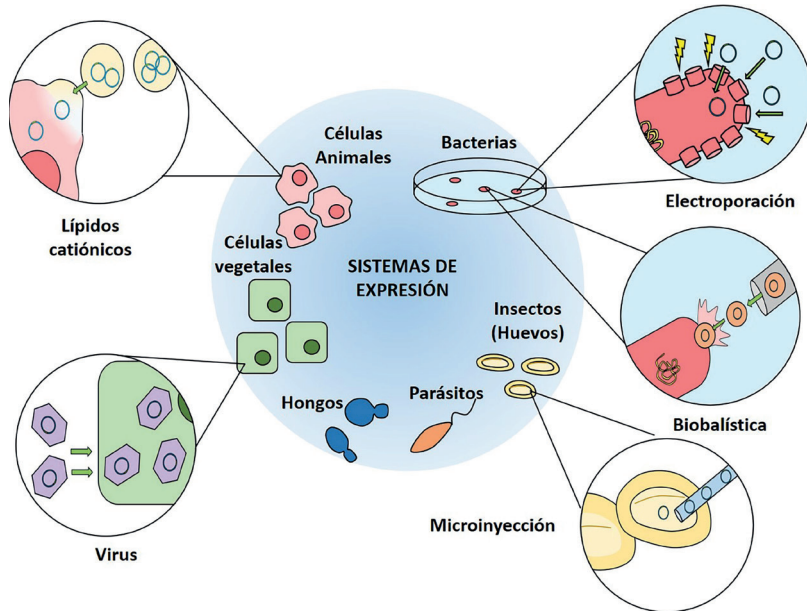
Microyección: corresponde a un método a través del cual se penetra a la célula usando agujas diminutas que permiten llevar el ADN hasta el núcleo o al interior de la célula. Este proceso se lleva a cabo bajo el microscopio óptico o estereomicroscopio.

Biobalística: método en el que las células son disparadas sobre partículas metálicas o “balas” que están recubiertas de ADN. La membrana de las células perforadas se recupera o cierra rápidamente, quedando en su interior la molécula de interés.

Liposomas catiónicos: los liposomas catiónicos corresponden a moléculas esféricas formadas por lípidos (grasa) en su interior. Estas esferas pueden albergar gran cantidad de sustancias, en este caso el ADN recombinante. Los liposomas, al estar constituidos del mismo material que la membrana celular, pueden fusionarse con esta y vaciar su contenido en ella, de tal manera que el ADN llega al interior de la célula.

Virus: son unos de los sistemas más eficientes para la introducción del material genético dentro de una célula, debido a la capacidad natural que tienen de ingresar o infectar ciertas células dentro de organismos específicos. Este proceso es denominado transfección.

Figura 2.24. Sistemas de expresión y métodos de transformación o transfección.



Fuente: elaboración propia.

Obtención y purificación de la proteína recombinante

Una vez se ha logrado producir la proteína, el siguiente paso es la extracción, purificación y caracterización. La extracción es un procedimiento que permite liberar la proteína recombinante de la célula o del tejido donde se encuentra. Los métodos utilizados en la extracción deben ser seleccionados cuidadosamente con el fin de evitar daño. Por otra parte, la extracción depende del origen de la molécula, es decir, la célula, bacteria, planta o insecto donde se produjo. Para obtener la proteína es importante conocer su ubicación, como se dijo anteriormente, si se almacena dentro de la célula (intracelular) o se libera al exterior de esta, es decir, secretada. Luego de extraer la proteína esta debe ser purificada, proceso que implica incrementar su concentración, eliminando impurezas y otras proteínas. El método más usado es la filtración en gel, un procedimiento en el que las proteínas

pasan por un laberinto formado por un gel, quedando atrapadas las más grandes, mientras que las pequeñas se desplazan más fácil y rápido. En términos generales, la purificación busca separar la proteína de contaminantes de origen celular o de sustancias utilizadas para su extracción. Los métodos y procedimientos son descritos con detalle en el Capítulo 1, cuando se describe el proceso de purificación de enzimas.

Uso y aplicaciones de las proteínas de uso farmacéutico

Las proteínas recombinantes tienen diferentes aplicaciones, dentro de las cuales podemos encontrar mejoramiento en la agroindustria, veterinaria, biorremediación, entre otras. Una de las aplicaciones más frecuentes es la farmacología; esta rama se encuentra en constante crecimiento y en la actualidad es la principal forma de producción de medicamentos. Para el periodo del 2010 al 2014, en Estados Unidos, se aprobaron 54 fármacos de origen biológico. Dentro de los medicamentos con aprobación, se encontraban anticuerpos, hormonas, enzimas y otros componentes necesarios para el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

En la actualidad, el sistema de expresión más utilizado para producir proteínas recombinantes son las células de ovario de hámster chino, seguido de células humanas y de otros mamíferos. Finalmente, se encuentran los organismos tradicionalmente usados como bacterias, levaduras y organismos misceláneos. El creciente progreso en áreas como la biología molecular, biotecnología y la ingeniería genética, ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos fundamentales en la medicina humana y animal. Gracias a la ingeniería genética, ha sido posible generar proteínas potencialmente terapéuticas en grandes cantidades, actualmente existen más de 30 proteínas aprobadas para su uso clínico y otras tantas que se encuentran en etapa de laboratorio, tratando de demostrar su adecuación clínica.

Las proteínas y medicamentos producidos en laboratorios requieren ser aprobados por todos los actores de la cadena antes de ser usados en humanos, esto con el fin de asegurar la calidad, seguridad y eficacia de la proteína o medicamento, además de su correcto uso, garantizando así la seguridad de paciente. Es por esto que la industria farmacéutica, la autoridad regulatoria y los sistemas de salud, deben funcionar de la mano a la hora de aprobar el uso de alguno de estos productos^{2,17,18}.

Es importante resaltar que la fabricación de proteínas recombinantes ha facilitado en gran medida el tratamiento de muchas enfermedades para las que anteriormente no había opciones terapéuticas, dado que no existía la tecnología del ADN recombinante. Como se mencionó previamente, la primera proteína producida fue la insulina humana que es usada para tratar la diabetes tipo I o insulino-dependiente, la cual era obtenida de porcinos. Posteriormente, se obtuvo la hormona de crecimiento humana, usada para tratar el síndrome de Turner; otra proteína de importancia farmacológica fue el activador del plasminógeno tisular, una proteína que disuelve los coágulos en la sangre, por lo que es usada en pacientes con infarto del miocardio o accidentes cerebrovasculares. Igualmente, se han desarrollado anticuerpos capaces de reconocer proteínas en la superficie de células cancerosas, lo que, unido a la quimioterapia, pretende mejorar la respuesta al tratamiento en las formas más agresivas de cáncer. Estos son algunos de los ejemplos de las proteínas que pueden ser generadas usando la tecnología de ADN recombinante y sus usos potenciales. Sin embargo, existen muchas otras, como son:

- Hormonas (para fertilidad asistida).
- Factores de crecimiento humano (hematopoyético).
- Anticuerpos monoclonales (Rituximab, Ibritumomab).
- Citoquinas (Interluquinas, interferones).
- Vacunas y antígenos (Vacuna virus del papiloma humano, antígeno de la hepatitis B).
- Terapia celular (Cndrocitos autólogos cultivados)⁵.

Panorama de producción de proteínas recombinantes en Risaralda

La producción de proteínas recombinantes puede pensarse como una tecnología que se encuentra lejos de los centros de investigación o laboratorios de nuestro país, sin embargo, es un campo que se encuentra en crecimiento y que ya hace parte de proyectos de investigación en importantes universidades, tanto a nivel regional como nacional. En el departamento de Risaralda, y más específicamente en la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), se encuentran proyectos enfocados al estudio y desarrollo de la biotecnología. En este recinto se encuentra el Doctorado en Ciencias Biomédicas y la Maestría en Biología Molecular y Biotecnología, todos adscritos a la Facultad de Ciencias de la Salud y que, desde su creación hasta el momento, se han destacado por la investigación y generación de conocimiento en aras de aportar al desarrollo de la región y el departamento. En el año 2012, el Órgano Colegiado de Administración y Decisión (OCAD) de Risaralda, aprobó la financiación del programa “Desarrollo de capacidades científicas y tecnológicas en biotecnología, aplicadas a los sectores de la salud y la agroindustria en el departamento de Risaralda”, financiado por el Sistema General de Regalías (SGR) de Colombia, para el cual la entidad ejecutora es la Universidad Tecnológica de Pereira. El programa financia alrededor de 13 proyectos de investigación, los cuales están enfocados al avance y formación de investigadores en biotecnología.

Dentro de los proyectos financiados por el SGR, se encuentra uno específicamente dedicado a lograr la expresión de una proteína recombinante en el gusano de seda *Bombyx mori* L. Esta investigación es desarrollada por el grupo categoría A1 en Minciencias, Infección e inmunidad, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, y pretende a largo plazo posicionar al gusano de seda como una biofábrica para la producción de proteínas humanas.

El gusano de seda *Bombyx mori* L. es un organismo eucariota que ha sido muy estudiado recientemente debido a sus características biológicas, además de su eficiencia y producción de proteínas en el capullo de seda, que lo convierte en un insecto de gran interés biotecnológico. El objetivo del proyecto realizado por el grupo de investigación radica en la producción de una proteína humana de origen sanguíneo, denominada Eritropoyetina y que tiene como función la producción de glóbulos rojos en el organismo humano, esta proteína se ve disminuida en pacientes con insuficiencia renal o anemia severa causada por largos periodos de quimioterapia, por lo que se hace necesaria la administración externa y por consiguiente su producción a gran escala. La expresión de la proteína de interés se hará en el capullo del gusano de seda, para lo cual se utilizará el promotor del gen de la fibroína, principal proteína formadora del capullo y lo que facilitará la extracción y purificación de la proteína recombinante, ya que será secretada al exterior cuando el gusano realice su capullo. Este proyecto es el inicio de una etapa amplia de investigación en la que se pretende generar proteínas humanas recombinantes que puedan ser producidas de forma eficiente, segura y más económica que las que existen en la actualidad, y así poder subsanar en parte la gran demanda que existe a nivel mundial.

En resumen, la Ingeniería genética ha logrado transformar células de diferentes organismos en fábricas productoras de proteínas humanas. Gracias a la posibilidad de manipular la secuencia de los genes que codifican las proteínas humanas y las secuencias que regulan su expresión, la biotecnología ha permitido el aislamiento de grandes cantidades de proteínas de uso farmacológico que no sería posible obtener con metodologías anteriores. Con el empleo de las estrategias de la ingeniería genética, se ha logrado optimizar células de diversos organismos, entre ellos bacterias, levaduras, insectos y simios, como sistemas de expresión de proteínas de origen humano (sistema de proteínas heterólogas). Lo que la convierte en una herramienta promisoría

para la generación de fármacos con menos efectos secundarios a los ya existentes y en el vehículo para escalar los proyectos que actualmente se encuentran en desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andersen DC, Krummen L. Recombinant Protein Expression for Therapeutic Applications. *Curr Opin Biotechnol.* 13;117-23. 2002.
2. Brown TA. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction.* 7th Ed. Wiley-Blackewll. 376. 2016.
3. Luque Cabrera J, Herraez Sánchez A. *Texto Ilustrado De Biología Molecular E Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas Y Aplicaciones En Ciencias De La Salud.* Elsevier. Madrid, ES. 197-215. 2006.
4. Demain AL, Vaishnav P. Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Biotechnol Adv* 2009;27(3):297-306.
5. Franco Fraguas ML, Savio Quevedo E. Medicamentos Biotecnológicos. Conceptos Básicos y Relevancia En El Contexto Clínico. *Tendencias en Medicina*; 2008; 1-5.
6. Gamboa Ramsés A , Trujillo Roldán MA. Un Acercamiento a La Producción De Proteínas Recombinantes Terapéuticas De Uso Humano, *El Residente.* 2009; 4:87-91.
7. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, et al. Estrategias de Obtención de Proteínas Recombinantes en *Escherichia Coli.* *VacciMonitor.* 2013; 22:30-39.
8. Gómez Marín JE, González-Marín A, Castaño Osorio JC, Patarroyo Gutiérrez MA. *Biología Molecular: Principios Y Aplicaciones.* 1^a Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, CO. 749. 2011.

9. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Bray J, Gileadi O, Knapp S, et al. Protein Production and Purification. *Nature Methods*. 2008; 5:135-46.
10. Guerrero Olazarán M, Cab-Barrera E. L, Galán Wong L.J, Viader Salvadó J.M, *Biología De Proteínas Recombinantes Para La Aplicación En Acuicultura, Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 2004.
11. Guevara Hernández E, López Zavala AA, Jiménez Gutiérrez LR, Sotelo Mundo RR, *Perspectivas Actuales Del Uso De Proteínas Recombinantes y su Importancia en la Investigación Científica e Industrial*. *Biocencia*. 2013; 15:8-17.
12. ArgenBio. *Biología, Es hora de comprender mas y temer menos. Por qué biología* ©;2020. Disponible: https://www.porquebiologia.com.ar/recursos/Biologia_Capitulo_2_Proteinas_recombinantes.pdf
13. Jiang H, Zhu J. *Recent Advances in Transient Gene Expression Protocol, Update on Production of Recombinant Therapeutic Protein: Transient Gene Expression*, Rapra Technology Ltd., Shropshire, UK. 2013; 17-80.
14. Leader B, Baca QJ, Golan DE, *Protein Therapeutics: A Summary and Pharmacological Classification*. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:21-39.
15. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, and Ramírez O, *Production of Recombinant Proteins'*. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. 2nd Ed. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 2004 Vol. 267. 15-53.
16. Nascimento Santos L, Carvalho Pacheco LG, Silva Pinheiro C, Alcantara-Neves NM, *Recombinant Helminth Proteins with*

Immunoregulatory Properties: Potential Therapeutic Use of Recombinant Proteins of Helminths with Immunoregulatory Properties. *Acta Trop.* 2017; 166:202-211.

17. Swiech K, Picanço Castro V, Tadeu Covas D, Human Cells: New Platform for Recombinant Therapeutic Protein Production, *Protein Expr Purif.* 2012; 84:147-53.

18. Wurm FM, Human Therapeutic Proteins from Silkworms. *Nature Biotechnol.* 2003; 21:34-35.

Bacteriocinas: péptidos bioactivos con propiedad antimicrobial

Silvia Córdoba-Romero, Fernando Siller-López. Grupo de Investigación MICROBIOTEC. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Libre, Seccional Pereira. Colombia.

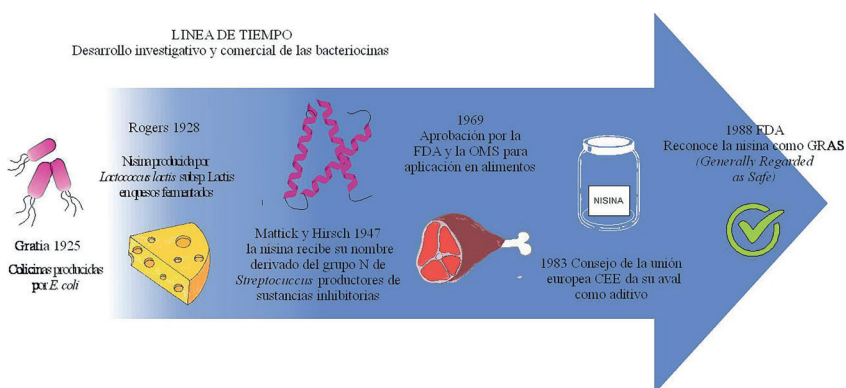
Introducción

Como parte de un mecanismo de competición o como producto de diversos procesos metabólicos, los microorganismos generan diferentes sustancias que inhiben el desarrollo de otros, un ejemplo de ello son el grupo de las bacterias ácido lácticas; este grupo de microorganismos es ampliamente conocido por su diversa gama de metabolitos producidos, entre los que se pueden mencionar los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrogeno, el ácido carboxílico, el diacetil, la reuterina, las biopelículas, los exopolisacaridos, las bacteriocinas, entre otros^{1,2}. A partir de allí, se genera una gran cantidad de posibilidades para el uso de estas sustancias con el fin de inhibir el desarrollo de determinados microorganismos de interés, generalmente patógenos en la industria de alimentos, cosméticos, medicina humana, veterinaria, entre otros^{3,4}.

Las bacteriocinas son un grupo reconocido de péptidos antimicrobianos ribosomalmente sintetizados (ADN-ARN-péptido) producidos por diferentes bacterias, estos péptidos, que poseen un tamaño que oscila entre los 2KDa y los 300KDa, tienen la propiedad de eliminar o inhibir el desarrollo y crecimiento de otras bacterias competidoras, generalmente similares a ellas⁵⁻⁷. Entre las más estudiadas, se encuentran las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, microorganismos que entre otras características, forman parte del microbioma

normal intestinal del humano y de otras especies, son fácilmente cultivables y se les puede encontrar en un amplio rango de matrices, generalmente alimentos de consumo humano, entre los que destacan principalmente los lácteos, productos fermentados y en general en cualquier medio donde puedan tener acceso a carbohidratos simples y otros nutrientes⁸. Como habitantes normales, estas son consideradas generalmente inocuas para la salud animal y humana⁹, no obstante, las bacterias ácido lácticas no son el único grupo microbiano productor estudiado, se cree que la capacidad de producir bacteriocinas es intrínseca de la mayoría de microorganismos y que existe un sinfín de metabolitos por descubrir y estudiar¹⁰. El uso de bacteriocinas para la preservación de alimentos ha sido ampliamente estudiado, de este modo, la nisina, bacteriocina más representativa producida por *Lactococcus lactis*, es de uso comercial desde que la OMS la aprobó como conservante en 1969 y la FDA en 1988 (**Figura 2.25**), y actualmente se aplica en todo el mundo como conservante. Lo anterior, ha llevado a un sentir general hacia un conocimiento más profundo, a fin de abrir las posibilidades para el uso de otras bacteriocinas en la industria de alimentos y demás áreas^{5,11}.

Figura 2.25. Línea de tiempo: Desarrollo investigativo de las bacteriocinas.



Fuente: elaboración propia.

Generalidades en bacteriocinas

La producción de péptidos como mecanismo de defensa no es exclusiva de las bacterias, diversos organismos tienen la capacidad de producirlos y todos estos tienen en común características como su pequeño tamaño, 6-60 aminoácidos, y su estructura general. Hongos, plantas, insectos, vertebrados, mamíferos, etc., sintetizan péptidos para inhibir el desarrollo de otros organismos competidores (hongos, bacterias, protozoarios, virus, etc.)¹². De este modo, se encuentran péptidos antimicrobianos, no sintetizados ribosomalmente para los cuales su síntesis es mediada por enzimas (péptido-sintetasas) y los péptidos sintetizados ribosomalmente, en los cuales la existencia de un gen codificador es necesaria para su síntesis¹³, dentro de este grupo podemos encontrar las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica producidos por bacterias de los cuales, se presume, tienen una gran diversidad de funciones, estos péptidos son sintetizados en el ribosoma de la bacteria, es decir, que la bacteria cuenta con juegos de genes estructurales que pasan por procesos de transcripción y traducción en el ribosoma donde el producto final será un péptido que tendrá o no modificaciones postraduccionales (dependiendo su clasificación) para finalmente ser liberado al medio extracelular¹⁴. Estos péptidos antimicrobianos tienen un blanco de acción más específico, en donde su aplicación para la inhibición de otras bacterias de interés, ha sido el campo de mayor estudio, de este modo se encuentra que generalmente su espectro de inhibición va dirigido a especies estrechamente relacionadas (bacteria contra bacteria), es así como, por ejemplo, las bacterias ácido lácticas (gram positivas) tienen mayor capacidad de inhibición frente a otras bacterias gram positivas, como *Listeria monocytogenes*, y/o *Staphylococcus aureus*, por citar un ejemplo, no obstante, investigaciones recientes sugieren que aún falta más por conocer acerca de estos compuestos y que su uso no solo no se encuentra limitado a determinados grupos bacterianos, sino

que podrían incluso traspasar la frontera del dominio procariota. Es así como su efecto anti fúngico⁹, anticancerígeno¹⁵, uso combinado de espermicida y como atenuante de enfermedades de transmisión sexual¹⁶, antiparasitaria¹⁷ y antiviral¹⁴, no obstante es importante resaltar que es muy poco lo que se conoce acerca de mecanismos de acción, efectos colaterales, entre otros.

Obtención de bacteriocinas

Los primeros péptidos antimicrobianos producidos por bacterias fueron descritos hace casi 90 años, éstos fueron llamados “colicinas”, haciendo mención al microorganismo productor *Escherichia coli*¹², a partir de allí, infinidades de bacteriocinas han sido descubiertas y siguen encontrándose aún. Diferentes nichos para el aislamiento de cepas productoras han sido reportados¹⁸, productos en fresco, procesados o fermentados a partir de los cuales se obtienen cepas nativas con potencial en la producción de bacteriocinas. Matrices como leche y sus derivados, encurtidos, carnes frescas o curadas, en general ecosistemas tan variados y complejos con gran abundancia de microorganismos, como la vagina, podrían ser un lugar ideal para el hallazgo de cepas promisorias¹⁹. Una vez se ha seleccionado la matriz y la población productora a estudiar (*Bacillus spp*, *Staphylococcus spp*, etc.), se inicia con el cultivo bacteriano en medios especiales dependiendo de las características y/o sus requerimientos nutricionales de las mismas. Se requiere abundante medio y cumplir los requerimientos fisiológicos del microorganismo, seleccionar un medio de crecimiento adecuado, el cual debe permitir un buen crecimiento del microorganismos y no debe interferir con la producción de las bacteriocinas ni afectar su acción antimicrobiana, Una vez obtenida la producción necesaria, se deben retirar las células por centrifugación para separarlas de los péptidos, que son precipitados por algún componente químico, generalmente sulfato de amonio, seguido de un proceso de purificación, cromatográfico, seguidamente se verifican las propiedades bioquímicas del compuesto y se establece su tamaño

y/o actividad. Finalmente, se evalúa su actividad y margen de acción antimicrobiano frente a un patógeno de interés. Se ha citado que la producción de bacteriocinas depende en gran medida de las características propias de la cepa productora, como su crecimiento y actividad fisiológica²⁰⁻²². Un sinnúmero de estudios han evaluado las condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas, evaluando así elementos físicos y químicos del proceso (pH, temperatura, composición del medio de cultivo), en términos generales, fuentes de nitrógeno y de carbono resultan ser las variables más determinantes para una óptima producción y esta misma se verá afectada por diversos factores que deberán ser controlados y que son específicos de cada cepa para su obtención a nivel comercial^{23,24}, esto a su vez ha permitido correlacionar la producción de bacteriocinas con la producción de biomasa obtenida, en donde su máxima producción coincide con el nivel máximo de crecimiento celular (fase exponencial)²⁴.

En el interior celular, la síntesis de bacteriocinas inicia con la activación de genes estructurales de bacteriocinas acompañados de otros encargados del transporte del péptido, genes de autoprotección y regulación localizados generalmente en plásmidos o transposones conjugativos, estos elementos genéticos móviles que, por su pequeño tamaño, capacidad de transferirse a otras bacterias por conjugación y cambiar su localización, provocan mutaciones que generalmente otorgan ventajas de supervivencia en las bacterias, como lo pueden ser genes de resistencia a los antibióticos. Continuando con el proceso de síntesis de bacteriocinas en el interior celular, un pre-péptido es sintetizado y transportado mediante un sistema altamente organizado, se cree también que este sistema se encuentra modulado por el método *quorum sensing* (comunicación celular) a fin de evitar bacterias no blanco²⁵.

La producción de bacteriocinas por parte de bacterias no patógenas ha sido estudiada ampliamente, especialmente por su reconocimiento como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por

parte de la FDA, bacterias ácido lácticas y algunas especies del género *Bacillus* han demostrado tener capacidad de producir péptidos ganando un espacio especial para su aplicación en el sector industrial, especialmente en alimentos¹³, de este modo se encontraría viable también el uso de cultivos iniciadores en alimentos procesados, especialmente aquellos sometidos a fermentaciones, en donde estas bacterias incorporadas en el alimento producirían el péptido sin necesidad de que este sea integrado como un aditivo²⁶, por otro lado, y sin restar importancia, especies patógenas también han sido estudiadas por su producción de péptidos antimicrobianos, entre los que se pueden destacar *Listeria spp*²⁷ y *Staphylococcus spp*²⁸. Es así como, por ejemplo, las estafilococinas, producidas por especies de *Staphylococcus spp*, han demostrado tener un amplio espectro de acción incluso frente a otras cepas no relacionadas epidemiológicamente con la mastitis bovina como *L monocytogenes*²⁹. En términos generales, se estima que el 99% de las bacterias son capaces de producir bacteriocinas o algún metabolito que le permita competir y sobrevivir en los diversos ecosistemas²⁷. En las últimas décadas, innumerables cantidades de bacteriocinas han sido identificadas y constantemente aparecen nuevas cepas productoras, nuevos mecanismos son descritos y nuevas aplicaciones surgen a diario, todo esto ha generado la necesidad de crear una base de datos especializada en bacteriocinas (<http://bactibase.hammamilab.org/bacteriocinslist.php?view=GeneralView>).

Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido organizadas y clasificadas basándose en diferentes características como: su estructura, mecanismo de acción, peso molecular, propiedades bioquímicas, microorganismo productor, entre otras. En base a ello, se han podido enumerar hasta 5 clases diferentes de bacteriocinas (siendo las 2 últimas aún cuestionadas y bajo estudio), de acuerdo con lo anterior, sigue siendo difícil unificar criterios en una sola nomenclatura para su clasificación^{22,30}, a continuación, se

menciona básicamente una de las clasificaciones más utilizadas, no obstante, y como se mencionó, es posible encontrar discrepancias entre los autores con respecto a esta clasificación²⁵.

1. Tipo I (lantibióticos): péptidos de pequeño tamaño, no mayor a 5 KDa. Termoestables, actúan generalmente sobre el esqueleto de la pared celular de patógenos, comúnmente producidos por Gram-positivas. Su principal característica es la presencia de aminoácidos poco comunes como dihidroalanina, β -metil-lantionina, y lantionina, debido a los procesos post-traduccionales. La más conocida es la nisina, con múltiples variantes naturales, producida por cepas de *Lactococcus lactis*. Éstas a su vez pueden ser divididas en dos subclases. Este grupo de bacteriocinas tiene un espectro de acción bastante amplio dentro del cual se encuentran efectos también sobre células eucaritas humanas y animales³¹⁻³³.

- 1.1. Tipo Ia: péptidos alargados, de carga neta positiva, atacan a la bacteria blanco por perforación de su membrana.
- 1.2. Tipo Ib: globulares, inflexibles, con carga neta negativa o nula. Inhiben enzimas catalíticas requeridas por la célula para su metabolismo, la bacteriocina más representativa es la mersacidina.

2. Tipo II (no lantibióticos): son lineales y sin modificaciones post-traduccionales. De mayor tamaño que la clase I, péptidos pequeños (<10KDa) y termoestables, actúan sobre la membrana plasmática debido a su estructura anfifílica helicoidal.

2.1. Tipo IIa: también llamadas bacteriocinas anti-listeria, actúan principalmente sobre *Listeria* spp. Poseen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys).

2.2. Tipo IIb: bacteriocinas de dos péptidos. Requieren la acción simultánea de dos péptidos diferentes para ejercer su actividad.

2.3. Tipo IIc: péptidos pequeños, termoestables, no modificados, que se transportan por medio de un péptido líder. Se clasifican a su vez en tiolbióticos (bacteriocinas con dos residuos de cisteína) y cistibióticos (con un único residuo de cisteína)^{32,34}.

3. Clase III (bacteriocinas lábiles): de elevado tamaño molecular (>30KDa), son termolábiles y pueden ser o no líticas. Las bacteriocinas líticas son endopeptidasas que lisan la pared celular de bacterias en forma enzimática. Las no líticas, suelen actuar interfiriendo en los procesos metabólicos celulares, es poco conocido el mecanismo de resistencia de las bacterias productoras de este tipo de bacteriocinas frente a sus propios metabolitos, ya que generalmente los genes estructurales de bacteriocinas vienen acompañados de un juego de genes protectores²².

4. Clase IV: bacteriocinas complejas, péptidos con algunos o varios fragmentos de lípidos o carbohidratos necesarios para su función biológica, no obstante, los hace susceptibles a la acción de enzimas lipolíticas y glucolíticas.

5. Clase V: bacteriocinas de estructura circular y sin modificaciones post-traduccionales⁷.

No obstante, y de acuerdo con estos mecanismos de clasificación propuestos, se han encontrado algunas incoherencias en donde una bacteriocina puede pertenecer simultáneamente a varios grupos, y como se mencionó anteriormente aún no se ha unificado un método para organizarlas, estando a su vez sujeto al criterio del autor. Zouhir y compañía han propuesto un nuevo sistema de clasificación para las bacteriocinas producidas por bacterias gram positivas, este sistema de clasificación se basa en evaluar las similitudes entre secuencias de aminoácidos de las distintas bacteriocinas, esto indica el orden de los residuos de aminoácidos que se pueden encontrar en determinadas posiciones

del péptido, se realizaron alineamientos entre las bacteriocinas mediante uso de recursos bioinformáticos y finalmente esto arrojó un total de 12 grupos, pudiendo clasificar un 70% de las bacteriocinas producidas por bacterias gram positivas estableciendo distancias filogenéticas con base en su estructura³⁵.

Mecanismo de acción de las bacteriocinas

A grandes rasgos, su mecanismo de acción se centra en el ataque a la membrana del organismo objetivo³⁶, ya sea cribando moléculas importantes en la síntesis de peptidoglicano (nisina), acoplándose en la membrana para formar poros (sakacina) o atacando directamente la pared de la célula blanco causando lisis inmediata (lisostafina)²⁵; no obstante, también se han descrito mecanismos mediante los cuales se atacan moléculas intracelulares importantes en diferentes procesos metabólicos de la bacteria³⁷. Para el caso específico de la nisina, su mecanismo de acción fue descrito por primera vez en 1953, para este momento la pérdida de componentes celulares sensibles a UV, como los ácidos nucleicos, empezó a dilucidar de su efecto sobre la membrana, no obstante, hasta este momento eran pocos los detalles que se conocían. Sería más adelante, en 1980, donde se podría establecer que ésta pérdida de componentes celulares de debía a la interrupción de construcción de pared celular a causa de un complejo formado entre la nisina y lípidos intermediarios en la síntesis de mureína³⁸, no obstante el mecanismo de acción de la nisina ha demostrado ser aún más compleja de lo que se creía, dependiendo inclusive de la bacteria blanco, de esta manera, desencadena una serie de efectos en donde puede incluso estimular la acción de enzimas autolíticas en la bacteria blanco³⁹, de esta manera, se ha demostrado que ésta actúa no solo bloqueando el potencial de membrana sino el gradiente de pH cuando fue aplicada en liposomas artificiales⁴⁰, sumando a esto su naturaleza anfifílica que le permite tener interacciones con la membrana objetivo, más aún se sugirió que la nisina también tiene la capacidad de ensamblarse en la membrana y formar poro⁴¹.

Alteración del potencial de membrana y formación de poro

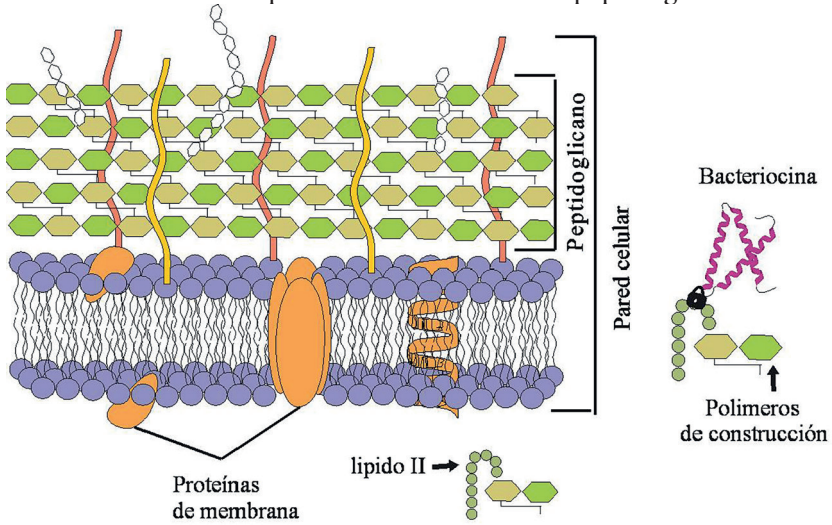
Como parte de las funciones de la membrana, en las bacterias y en cualquier organismo, mantener una composición iónica en el medio intracelular distinta al extracelular es indispensable en su supervivencia, para este proceso, la membrana cuenta con diferentes proteínas transportadoras que facilitan este proceso, en el caso puntual de la nisina, ésta actúa debilitando este proceso al insertarse en la membrana para formar poros de translocación iónica^{42,43}, en donde el tipo de poro formado por el péptido dependerá también de su naturaleza bioquímica (regiones hidrofóbicas) y de la hidrofobicidad de la membrana, de esta manera se pueden encontrar poros de tipo “barril, toroidal o alfombra”⁴⁴, por ejemplo, el alargado anfifílico de los lantibióticos catiónicos les permite formar poros que disipan la membrana llevando a la pérdida de metabolitos y consecuentemente a la muerte celular¹⁰, por su mecanismo de acción al causar perturbaciones en la membrana, se pueden destacar la nisina producida por *Lactococcus lactis*, la lacticina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*²⁶, la geobacilina, nukacina, las aureocinas A70 y A53⁴⁵. Como se mencionó anteriormente, por lo general este tipo de bacteriocinas utilizan lípidos de membrana u otro tipo de estructuras como sitio de acople ya sea para formar un poro como la nisina y la lacticina 3147 o solo para interrumpir el proceso de síntesis de membrana como la nukacina ISK-1 producida por *Staphylococcus warneri* y la mersacidina producida por *Bacillus* spp^{46,47}. Otro ejemplo de este tipo de mecanismos, es el utilizado por lactococcin G, que es dependiente de una enzima de membrana undecaprenil pirofosfato fosfatasa, involucrada en el proceso de síntesis de peptidoglucano, lo cual fue corroborado al realizar caracterización genotípica de algunas cepas resistentes⁴⁸, al igual que sucede con lactococcin G, la plantaricina también podría utilizar proteínas transmembrana como sitio de acople⁴⁸, un aspecto en común que tienen estas proteínas es su función como proteínas de transporte. De esta manera, facilitan la apertura de canales para el ingreso o salida de sustancias, lo anterior alude

a que, de alguna manera, la bacteriocina podría hacer uso este mecanismo para la generación de poros en la membrana una vez se liga a estas proteínas⁴⁹.

Inhibición de enzimas y/o procesos intracelulares

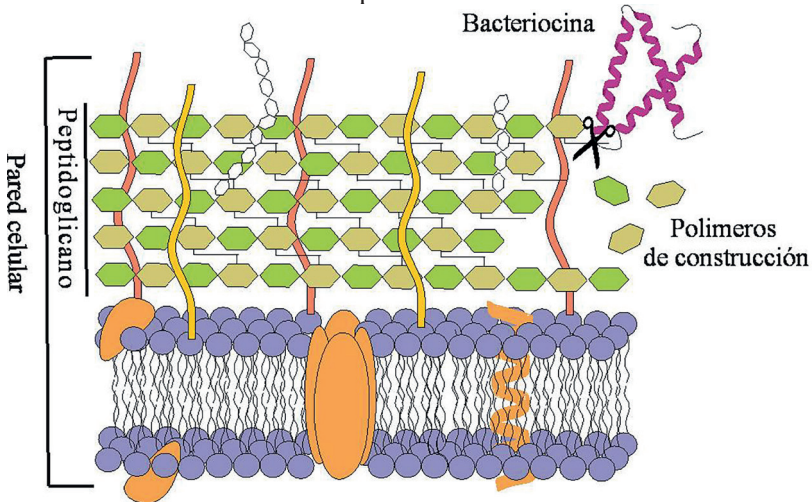
La interrupción de procesos metabólicos importantes en las bacterias, como la síntesis de proteínas, son otros mecanismos mediante los cuales actúan las bacteriocinas, estos procesos se pueden generar bajo diversos mecanismos, ya sea bloqueando sitios específicos importantes en el proceso, atacando enzimas relacionadas con el mismo o degradando ARN directamente. Como se mencionó anteriormente, la capacidad bactericida de las bacteriocinas está relacionada con su estructura, la microcina producida por *E. coli* es uno de los péptidos antimicrobianos en los cuales se han estudiado este tipo de mecanismos, la microcina B17 actúa sobre enzimas relacionadas con la replicación del ADN más propiamente la ADN girasa induciendo a una degradación masiva del ADN por activación de los sistemas de reparación lo que lleva a la muerte celular^{50,51}. Por otro lado, las colicinas producidas por *E. coli*, también han mostrado inhibición frente a otras enzimas relacionadas con los procesos de traducción, las colicinas, se posicionan en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano más específicamente en el punto de elongación, bloqueando sitios específicos en el ribosoma con lo cual el acople del ARN de transferencia con el ribosoma se afecta y finalmente la síntesis de péptidos se ve interrumpida^{45,52}, estudios han demostrado que la colicina E5 también han mostrado especificidad por la escisión de codones específicos (tirosina, histidina, asparagina, y el aspartato)⁵³. Otras de las bacteriocinas de las cuales se ha reportado su efecto en el interior celular son la Carocin S2 producida por *Pectobacterium carotovorum*, que bloquea un tipo específico de ribonucleasa agotando el suministro de algunos tipos de ARN⁵⁴.

Figura 2.26. Modo de acción de las bacteriocinas, secuestro de moléculas importantes en la síntesis de peptidoglicano.



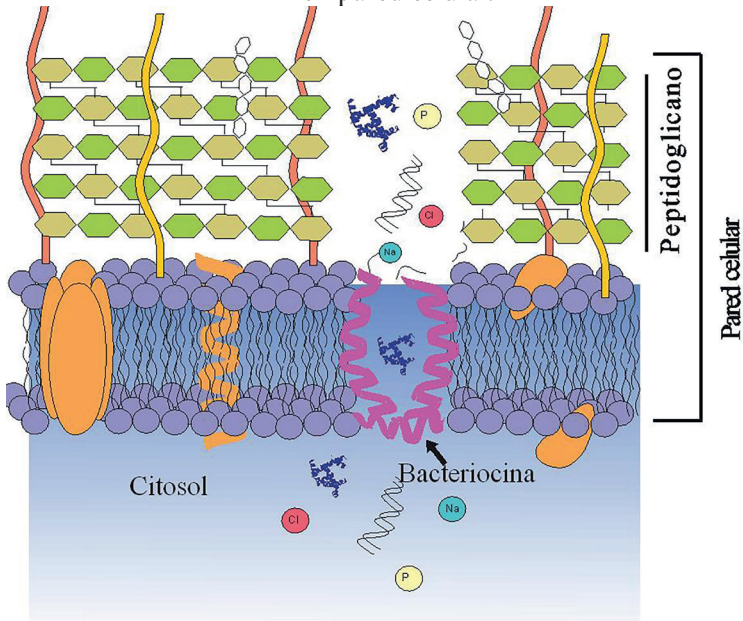
Fuente: elaboración propia.

Figura 2.27. Modo de acción de las bacteriocinas, lisis directa de pared celular.



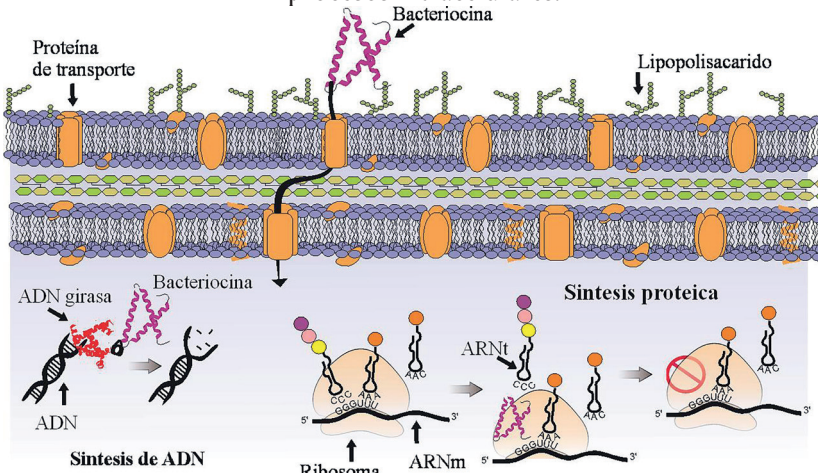
Fuente: elaboración propia.

Figura 2.28. Modo de acción de las bacteriocinas, formación de poro en pared celular.



Fuente: elaboración propia.

Figura 2.29. Modo de acción de las bacteriocinas, interrupción de procesos intracelulares.



Fuente: elaboración propia

Sinergias

Bacteriocinas y otros antimicrobianos

La aparición permanente de mecanismos de resistencias en cepas patógenas frente a los antibióticos de uso común se ha convertido en uno de los mayores retos a afrontar por parte de la comunidad científica⁵⁵. El uso combinado de bacteriocinas con antibióticos tradicionales, parece mostrarse como una buena alternativa no solo para dar solución a estos fenómenos de resistencia, entre los que se destacan también la formación de biopelículas, sino para superar los obstáculos que se puedan presentar con su individual, se cree entonces que la acción combinada de dos mecanismos de acción puede evadir la generación de formas de resistencia o mejorar la respuesta en cepas ya resistentes a antibióticos como la metilina y la vancomicina en medicina humana o animal⁵⁶, y eventualmente disminuir la toxicidad que pueden tener los antibióticos sobre el organismo blanco al reducirse la dosis requerida para el tratamiento al tiempo que se reducen los costos, con lo cual la cantidad a utilizar de ambos sería menor⁵⁷. De la misma forma, se sugiere que mediante este tipo de técnicas se ampliaría el espectro bactericida de las bacteriocinas, lo anterior debido a que el uso de bacteriocinas en bacterias gram negativas, se ha visto un poco limitada dada su especificidad de ataque en la pared celular, no obstante estudios han demostrado que el uso combinado de la nisina con antibióticos como la polimixina ha mejorado su efecto sobre bacterias objetivo, permitiendo que ésta llegue a su objetivo principal (lípidos II), en resumen, el antibiótico permeabiliza la membrana externa de las bacterias gram negativas que finalmente es quien impide el ingreso de las bacteriocinas hacia su sitio de acción⁵⁸.

Por otro lado y no menos importante, el uso de bacteriocinas con antimicrobianos naturales también se ha mostrado como una buena opción, su combinación con aceites

esenciales y otros compuestos de origen natural como extracto de té, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, que entre otras cosas también han ganado especial atención en la industria de alimentos, han mostrado tener una buena sinergia cuando fueron probados en microorganismos como *L. monocytogenes* y *S. aureus*⁵⁷).

Nanopartículas

Individualmente las nanopartículas (1-100 nm), tienen propiedades que han despertado gran atención por su potencial aplicación en diferentes áreas especialmente en biomedicina, en donde el uso combinado de estos materiales con moléculas biológicas ha mostrado tener un gran potencial para la generación de nuevos compuestos con un amplio rango de aplicaciones⁵⁹ entre otras propiedades, se ha demostrado que las nanopartículas, ayudan a prolongar la vida media del fármaco al cual están fusionadas, además tiene la capacidad de atravesar fácilmente tejidos biológicos para llegar al punto de acción⁶⁰ al igual que otros métodos, la fusión de bacteriocinas con nanopartículas busca mejorar la capacidad bactericida de los péptidos, reducir aquellas posibles interferencias con los componentes del alimento y/o evitar o eliminar mecanismos de resistencia, que tanto preocupan y que surgen constantemente⁶¹ de acuerdo con lo anteriormente expuesto, surge entonces la posibilidad combinar bacteriocinas con nanomateriales, método que ha mostrado ser bastante promisorio; un ejemplo de ello, es el efecto tóxico que tienen las nanopartículas de plata (AgNP) sobre la membrana de las bacterias, se cree que este mecanismo está íntimamente vinculado a la alta afinidad que tiene la plata por el azufre y el fósforo (átomos que componen estructuras principales en la membrana), por su lado las nanopartículas de oro, son ampliamente utilizadas dado que tienden a ser más biocompatibles⁶². Además el uso combinado de bacteriocinas con nanopartículas no se limita a materiales inertes también se ha sugerido el uso de nanovesículas lipídicas y otros materiales como el quitosano que le permitirían tener una mayor compatibilidad con otros componentes biológicos⁶².

Contrarrestar formación de biopelículas

La formación de biopelículas es considerado un factor de virulencia en determinados patógenos, usualmente los microorganismos que se encuentran dentro de biopelículas, tienen mayor capacidad de resistencia frente a antibióticos de uso habitual, no obstante, este tipo de resistencias no se debe específicamente a genes desarrollados por mutación, aunque se cree que el aumento de la población microbiana puede inducir la transferencia de genes de resistencia⁶³. Se ha evaluado la respuesta de patógenos de interés en el área de medicina humana, animal y en la industria alimentaria frente a las bacteriocinas aplicadas de manera individual y combinadas, mostrando en ambas formas que estas se posicionan como una buena opción para este tipo de aplicaciones que van desde patógenos formadores de biopelículas en superficies inertes en ambientes hospitalarios e industriales hasta aquellos formadores de placa dental como *S. mutans* en combinaciones de nisina con fluoruro de sodio, para la cual su efecto aumento considerablemente^{57,64}.

Resistencia a las bacteriocinas

Generalmente el desarrollo de mecanismos de resistencia se dan como consecuencia del uso inapropiado de antibióticos, y aunque generalmente estos son utilizados para el tratamiento de diversas patologías infecciosas en animales y humanos, su uso indiscriminado también se ha descrito en la industria de alimentos, situación que puede llevar a la generación de resistencia en patógenos de interés⁶⁵, por el mecanismo de acción de las bacteriocinas al atacar la membrana y generar lisis inmediata, difícilmente las bacterias podrían generar resistencia a las mismas⁴² de esta manera, se cree que la nisina que ha sido la bacteriocina más utilizada en la industria alimentaria por alrededor de 50 años aun no genera resistencia, aquellas cepas resistentes se han encontrado específicamente en ambientes de laboratorio y no específicamente en aislados propiamente de los

alimentos^{20,66} no obstante han sido reportadas cepas resistentes en donde se muestra un mismo patrón de resistencia cuando se exponían a grupos de bacteriocinas con mecanismos de acción similares⁶⁷, de otro lado investigaciones sugieren que el uso de bacteriocinas al igual que sucede con los antibióticos requiere de un especial cuidado en donde prácticamente cualquier bacteria podría volverse resistente a la nisina si la concentración de nisina con respecto a la celular no es demasiado alta o el periodo de exposición es demasiado prolongado⁴². De otro lado las condiciones físico químicas como la temperatura, el pH y la actividad de agua también juegan un papel importante y pueden influir seriamente en la eficacia de la nisina, esto último es muy importante dado que este tipo de condiciones suelen ser cambiantes en la industria de alimentos^{68,69}. Evaluaciones de la interacción entre cultivos iniciadores productores de bacteriocinas y cepas patógenas en determinadas matices sugieren que cuando los niveles de péptido producido no son óptimos, la bacteria blanco puede iniciar con la activación de genes de relacionados con estrés como métodos para sobrevivir y reproducirse⁷⁰. No obstante los mecanismos de resistencia serían significativamente menos complejas en comparación a los generados por antibióticos tradicionales⁷¹.

Experimentos llevados a cabo con cepas resistentes a antibióticos como la polimixina B, mostraron que modificaciones en algunos moléculas como los lipopolisacáridos LPS, (sitios importantes en la interacción del antibiótico), modificaciones como la baja acilación del lípido A en bacterias gram negativas como *S. typhimurium* y *E. coli* podrían ser los mismos mecanismos de resistencia empleados frente a los péptidos antimicrobianos^{72,73}.

Aplicaciones de las bacteriocinas

Aplicaciones en la industria de alimentos

En la actualidad, el uso de las bacteriocinas en la industria de los alimentos ha ganado bastante fuerza, todo esto apuntando a la generación de alimentos funcionales en gran medida debido

a que la FDA (*Food and Drugs Administration*), ha avalado su uso ⁴⁵, el uso de bacteriocinas para contrarrestar patógenos en los alimentos, es una de las aplicaciones más estudiadas, hasta el momento sigue siendo la nisina la única bacteriocina aprobada por la FDA en alimentos, en los cuales pueden ser aplicadas de diferentes formas, ya sea purificada en sus presentaciones comerciales, como único conservante o en combinación con otros compuestos, no purificada, es decir aplicación de productos de fermentación o mediante la aplicación de cultivos iniciadores de los cuales se haya demostrado su capacidad de producción ¹⁴, el uso de ingeniería genética, también ha abierto las posibilidades para el mejoramiento de la nisina, en donde los resultados muestran ser bastante promisorios ⁷⁴.

A diferencia de los antibióticos utilizados normalmente, las bacteriocinas son moléculas proteicas fácilmente degradadas por enzimas en el intestino del ser humano y no generan subproductos metabólicos como podrían hacerlo otras sustancias, ya que al ser ingeridas pasan a un proceso de proteólisis durante el proceso digestivo, de esta manera su acción frente a la microbiota normal del intestino es poca o nula ²². Por otro lado, la tendencia mundial que hoy por hoy existe hacia la disminución en el uso de conservantes sintéticos en la industria alimentaria, que no solo alteran el olor y el sabor del alimento sino, su frecuente asociación con problemas toxicológicos y procesos carcinogénicos ^{75,76} de otro lado se encuentran los tratamientos físicos que se emplean para neutralizar los microorganismos, como lo son, el tratamiento térmico y la congelación, que no aseguran por completo la inocuidad del producto ²² y pueden cambiar las propiedades organolépticas del mismo. Otro punto a favor que tienen las bacteriocinas es que toleran un alto estrés térmico, son activas sobre un amplio rango de pH y permanecen eficaces a una concentración bastante baja ²⁰ para aplicaciones industriales las bacteriocinas resultan ser una opción bastante viable, con lo que su inactivación sería menos probable cuando se someten a procesos industriales donde se requieren temperaturas para

procesos como la pasteurización. Por otro lado, los alimentos *per se* son una fuente de microorganismos con potencial producción de bacteriocinas, de nueva cuenta, las primeras bacteriocinas en ser descritas fueron las producidas por *E.coli*, y seguidamente fue propiamente del queso la matriz a partir de la cual las bacterias ácido lácticas se empezaron a mostrar como el grupo más promisorio para la obtención de estos péptidos, luego que algunos aislamientos de *Lactococcus* spp mostraran inhibición frente a otras BAL y algunos patógenos ⁷.

La utilización de nuevas tecnologías biológicas para la producción a gran escala de las bacteriocinas es una reciente opción que permitiría utilizar métodos de proteínas recombinantes fin de generar “cocteles” de bacteriocinas, además que la FDA ya ha reconocido como seguras las colicinas obtenidas a partir de plantas ⁷¹, algunos estudios han logrado con éxito la expresión de diferentes proteínas recombinantes en plantas a partir de genes de *P. aeruginosa* productores de piocinas demostrando tener un fuerte espectro inhibitorio frente al 53% de los aislados clínicos, esto resulta ser muy prometedor si se tiene en consideración que *P. aeruginosa* es un patógeno de mucha importancia dada su relación con enfermedades adquiridas en ambientes hospitalarios ⁷⁷.

Bacteriocinas y sus aplicaciones en medicina veterinaria

Una de las enfermedades de mayor incidencia en las vacas para producción de leche, es la mastitis, enfermedad que genera la inflamación de las glándulas mamarias por la presencia de patógenos como *S. aureus* y *Streptococcus* spp, actualmente la aplicación de bacteriocinas para el tratamiento de la mastitis es bien reconocida, con disponibilidad en el mercado de preparados comerciales de nisina aprobados por la FDA, estos se pueden encontrar en toallas para la desinfección de la ubre y otros preparados en infusión como selladores de la misma ⁵ dentro de los cuales se destacan *Wipe Out*[®] y *Mast Out*[®].

Diversas cepas de *Staphylococcus* spp patógenos menores, generalmente aislados de la ubre bovina han mostrado tener capacidad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, funcionando a su vez como un factor protector ²⁸. Por otro lado, los fenómenos de resistencia a los antimicrobianos en el área de producción animal también ha suscitado gran inquietud, para lo cual las bacteriocinas han sido probadas con éxito en el tratamiento de enfermedades en sectores productivos tan importante como el avícola y el porcícola, mostrando buenos resultados cuando fueron cotejadas en patógenos tan importantes como *C perfringens*, sensible a perfrina producida por algunas especies de *C perfringens*, patógeno causante de principal enfermedad de interés para los productores avícolas, así mismo contra patógenos en cerdos como *E. coli* enterotoxigénica *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, entre otros, usando combinados entre bacteriocinas con blancos de acción ⁴

Otras aplicaciones

Por su efecto anti fúngico las bacteriocinas también podrían ser utilizadas para la conservación de alimentos para consumo humano y animal, especialmente aquellos que son atacados por este tipo de microorganismos, Miao y compañía, lograron demostrar la acción no solo bactericida sino fungicida de la bacteriocina F1 producida por *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* aislada de kéfir ⁹, esta bacteriocina logro mostrar espectro de inhibición frente a microorganismos de gran importancia en la industria de alimentos y otras áreas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella entérica*, *Shigella dysenteriae*, *Aspergillus flavus* *Aspergillus niger* *Rhizopus nigricans* *Penicillium glaucum*.

El uso de bacteriocinas en humanos para el tratamiento de enfermedades ha mostrado tener grandes limitantes, una de ellas, es su corta vida media en sangre ⁷⁸, su aplicación en el área clínica se ha visto mayormente para la inhibición de patógenos

generadores de biopelículas sobre superficies intrahospitalarias ³³ por otro lado, también se ha reportado su uso como espermicidas y bactericidas frente a patógenos causantes de enfermedades de transmisión sexual, incluso aquellas causadas por virus, en donde la aplicación de subtilosina A también ha mostrado tener un efecto significativo sobre virus del herpes simple, atacando partículas virales y evitando su liberación de la célula infectada, no obstante, la aplicación de nisina y subtilosina A, sobre espermatozoides de cerdos mostraron tener inconvenientes, en donde por ejemplo la cantidad necesaria para ejercer su efecto ha mostrado efectos negativos sobre bacterias ácido lácticas, esto es importante si se tiene en cuenta que estos son habitantes normales benéficos del humano y de los animales ¹⁴. Es poco lo que se conoce con respecto a los mecanismos utilizados por las bacteriocinas para generar citotoxicidad, no obstante todo apunta a la utilización a los mismo métodos de acción ya reportados basados en la afinidad por determinadas estructuras en la membrana de la célula blanco, características que las hace distintivas de otras células no blanco como pudiera serlo en células cancerígenas en las cuales también se ha reportado efecto apoptótico ¹⁵.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stoyanova LG, Ustyugova EA, Netrusov AI. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Appl Biochem Microbiol* 2012; 48(3):229–43.
2. Erginkaya Z, Ünal E, Kalkan S. Microbial Metabolites as Biological Control Agents in Food Safety. In Springer, New York, NY; 2014. p. 225–59. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1378-7_9
3. Santos VL, Nardi Drummond RM, Dias-Souza MV, Santos VL, Nardi Drummond RM, Dias-Souza MV. Bacteriocins as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2017 Nov 3]. p. 403–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636607000164>
4. Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 5];48(1):22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28399941>
5. Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017; 49(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
6. Osuna Castro JA, Ibarra Junquera V, Aguilar González CN, Escalante Minakata, Pilar Morlett Chávez JA, Rodríguez Herrera R, Mondragón Preciado G. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investig Cienc.* 2013; 21:64–70.
7. Monroy-Dasta M.C., Castro-Barrera T., Fernández-Perrino F.J. YM-RL. Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS.* 2009; 73:63–72.

8. Vaughan A, Eijsink VGH, O'Sullivan TF, O'Hanlon K, van Sinderen D. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2001 Jul 1 [cited 2017 Nov 6]; 91(1):131–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01365.x>
9. Miao J, Guo H, Ou Y, Liu G, Fang X, Liao Z, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control* [Internet]. 2014; 42:48–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.041>
10. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2018 May 1]; 3(10):777–88. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1273>
11. Beristain-Bauza S., Palou E, Lopez-Malo A. Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Sel Ing Aliment*. 2012; 2:64–78.
12. Singh N, Abraham J. Ribosomally synthesized peptides from natural sources. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2014 Apr 12 [cited 2018 Apr 30]; 67(4):277–89. Available from: <http://www.nature.com/articles/ja2013138>
13. Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. [cited 2018 May 11]; Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/cjm-2014-0613>
14. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2018 May 5]; 49:23–8. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0958166917300988>

15. Ahmadi S, Ghollasi M, Hosseini HM. The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells. 2017 [cited 2017 Nov 3]. Available from: https://ac-els-cdn-com.ezproxy.unal.edu.co/S0882401017308409/1-s2.0-S0882401017308409-main.pdf?_tid=b516e068-c104-11e7-be96-0000aacb360&acdna t=1509761342_6ba1c408c170929ed253664b3b62bd6c
16. Silkin L, Hamza S, Kaufman S, Cobb SL, Vederas JC. Spermicidal bacteriocins: Lacticin 3147 and subtilosin A. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2018 May 12]; 18(10):3103–6. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0960894X07013352>
17. Amer EI, Mossallam SF, Mahrous H. Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2018 May 12]; 146:52–63. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0014489414002203>
18. Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2018 May 10]; 112(3):230–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16764959>
19. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol* [Internet]. 2014 Sep 12 [cited 2018 May 12]; 196(9):645–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24919535>
20. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwivathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci* [Internet]. 2016; 120:118–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>

21. Mataragas M, Drosinos EH, Tsakalidou E, Metaxopoulos J. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2004; 85(3):191–8.
22. Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Arch Biol Technol* [Internet]. 2007 May [cited 2017 Oct 29];50(3):512–42. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132007000300018&lng=en&tlng=en
23. Malheiros PS, Sant’Anna V, Todorov SD, Franco BDGM. Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*2a. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2015 [cited 2018 May 5]; 46(3):825–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26413066>
24. Trinetta V, Rollini M, Manzoni M. Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochem* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2018 May 5]; 43(11):1275–80. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1359511308002237>
25. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Food Microbiology: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Nov 12]; 3(10):777–88. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1273>
26. McAuliffe O, Ryan MP, Ross RP, Hill C, Breeuwer P, Abee T. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1998 Feb [cited 2018 May 1]; 64(2):439–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464377>

27. Quereda JJ, Meza-Torres J, Cossart P, Pizarro-Cerdá J. Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. *Gut Microbes* [Internet]. 2017 Jul 4 [cited 2018 May 11]; 8(4):384–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28156183>
28. Carson DA, Barkema HW, Naushad S, De Buck J. Bacteriocins of Non-aureus Staphylococci Isolated from Bovine Milk. Drake HL, editor. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2018 May 11]; 83(17):e01015-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28667105>
29. Ceotto H, Brede D, Salehian Z, dos Santos Nascimento J, Fagundes PC, Nes IF, et al. Aureocins 4185, Bacteriocins Produced by *Staphylococcus aureus* 4185: Potential Application in Food Preservation. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 May 12];7(10):1255–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618078>
30. Oscáriz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int Microbiol* [Internet]. 2001 Mar [cited 2018 May 1]; 4(1):13–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11770815>
31. Field D, Ross RP, Hill C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Curr Opin Food Sci* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2018 May 6]; 20:1–6. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S221479931730070X#sec0010>
32. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012 Dec 24 [cited 2017 Nov 3]; 11(2):95–105. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2937>

33. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *npj Biofilms Microbiomes* [Internet]. 2018 Dec 19 [cited 2018 May 1]; 4(1):9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41522-018-0053-6>
34. Tymoszewska A, Diep DB, Wirtek P, Aleksandrak-Piekarczyk T. The Non-Lantibiotic Bacteriocin Garvicin Q Targets Man-PTS in a Broad Spectrum of Sensitive Bacterial Genera. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 21 [cited 2018 May 6]; 7(1):8359. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-09102-7>
35. Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida J Ben. A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. *Protein J* [Internet]. 2010 Aug 31 [cited 2017 Nov 6]; 29(6):432–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10930-010-9270-4>
36. Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int Dairy J*. 1995;5(8):797–814.
37. Park S-C, Park Y, Hahm K-S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 30]; 12(9):5971–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016639>
38. Reisinger P, Seidel H, Tschesche H, Hammes WP. The effect of nisin on murein synthesis. *Arch Microbiol*. 1980 Oct; 127(3):187–93.
39. Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol*. 1985 Apr; 141(3):249–54.

40. Gao FH, Abee T, Konings WN. Mechanism of Action of the Peptide Antibiotic Nisin in Liposomes and Cytochrome c Oxidase-Containing Proteoliposomes. *Appl Environ Microbiol*. 1991; 57(8):2164–70.
41. Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: Recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998; 50(5):511–9.
42. Mantovani HC, Russell JB. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2018 May 1]; 67(2):808–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157247>
43. Bruno MEC, Kaiser A, Montville ' TJ. Depletion of Proton Motive Force by Nisin in *Listeria monocytogenes* Cellst. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1992 [cited 2018 May 1]; 2255–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195764/pdf/aem00048-0161.pdf>
44. Park S-C, Park Y, Hahm K-S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 [cited 2018 May 1]; 12(9):5971–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016639>
45. Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2018 May 1]; 46(5):494–501. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0924857915002794>
46. Ceotto H, Holo H, da Costa KFS, Nascimento J dos S, Salehian Z, Nes IF, et al. Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-

1. Vet Microbiol [Internet]. 2010 Nov 20 [cited 2018 May 1]; 146(1-2):124-31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627619>
47. Chatterjee S, Chatterjee S, Lad SJ, Phansalkar MS, Rupp RH, Ganguli BN, et al. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 1992 Jun [cited 2018 May 1]; 45(6):832-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1500347>
48. Kjos M, Oppegård C, Diep DB, Nes IF, Veening J-W, Nissen-Meyer J, et al. Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. Mol Microbiol [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 May 3]; 92(6):1177-87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.12632>
49. Oppegård C, Kjos M, Veening J-W, Nissen-Meyer J, Kristensen T. A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. Microbiologyopen [Internet]. 2016 [cited 2018 May 3]; 5(4):700-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27150273>
50. Davagnino J, Herrero M, Furlong D, Moreno F, Kolter R. The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. Proteins Struct Funct Genet [Internet]. 1986 Mar [cited 2018 May 1]; 1(3):230-8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.340010305>
51. Roy RS, Kim S, Baleja JD, Walsh CT. Role of the microcin B17 propeptide in substrate recognition: solution structure and mutational analysis of McbA1-26. Chem Biol [Internet]. 1998 Apr [cited 2018 May 1]; 5(4):217-28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552198906354>

52. Lancaster LE, Savelsbergh A, Kleanthous C, Wintermeyer W, Rodnina M V. Colicin E3 cleavage of 16S rRNA impairs decoding and accelerates tRNA translocation on Escherichia coli ribosomes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2018 May 1]; 69(2):390–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485067>
53. Ogawa T, Inoue S, Yajima S, Hidaka M, Masaki H. Sequence-specific recognition of colicin E5, a tRNA-targeting ribonuclease. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006 Dec [cited 2018 May 1]; 34(21):6065–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963495>
54. Chan Y-C, Wu J-L, Wu H-P, Tzeng K-C, Chuang D-Y. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2011 May 12 [cited 2018 May 3]; 11:99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569432>
55. McDermott PF, Zhao S, Wagner DD, Simjee S, Walker RD, White DG. THE FOOD SAFETY PERSPECTIVE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE. *Anim Biotechnol* [Internet]. 2002 Jul 11 [cited 2018 May 5]; 13(1):71–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12212946>
56. Brumfitt W, Salton MRJ, Hamilton-Miller JMT. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2002 Nov [cited 2018 May 5]; 50(5):731–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407132>
57. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2018 May

5]; 8:1205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706513>

58. Kragol G, Hoffmann R, Chattergoon MA, Lovas S, Cudic M, Bulet P, et al. Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicoridin. *Eur J Biochem* [Internet]. 2002 Sep [cited 2018 May 1]; 269(17):4226–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12199701>

59. Ma W, Saccardo A, Roccatano D, Aboagye-Mensah D, Alkaseem M, Jewkes M, et al. Modular assembly of proteins on nanoparticles. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 16 [cited 2018 May 4]; 9(1):1489. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-03931-4>

60. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2018 May 5]; 33(9):941–51. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.3330>

61. Khan I, Oh D-H. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2018 May 2]; 34:376–84. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1466856415002696>

62. Sidhu PK, Nehra K. Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *J King Saud Univ - Sci* [Internet]. 2017 Dec 14 [cited 2018 May 5]. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1018364717307243>

63. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017 Sep 25 [cited 2018 May 3];15(12):740–55. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro.2017.99>

64. Tong Z, Zhou L, Jiang W, Kuang R, Li J, Tao R, et al. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 May 6]; 32(10):2021–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930172>
65. Yi L, Dang J, Zhang L, Wu Y, Liu B, Lü X. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2018 May 2]; 67:53–62. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0956713516300548>
66. Kramer NE, Smid EJ, Kok J, Kruijff B, Kuipers OP, Breukink E. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by Lipid II levels. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2004 Oct [cited 2018 May 2]; 239(1):157–61. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/j.femsle.2004.08.033>
67. Macwana S, Muriana PM. Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2018 May 2]; 88(1):7–13. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0167701211003289>
68. Aouadhi C, Rouissi Z, Kmiha S, Mejri S, Maaroufi A. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. *Food Microbiol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2018 May 2]; 54:6–10. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0740002015001902>

69. Li J, Chikindas ML, Ludescher RD, Montville TJ. Temperature- and surfactant-induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2018 May 3]; 68(12):5904–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450809>
70. Miranda RO, Campos-Galvão MEM, Nero LA. Expression of genes associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin producer *Lactococcus lactis*. *Food Res Int* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2018 May 2]; 105:897–904. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0963996917308840>
71. Ghequire MGK, De Mot R. Turning Over a New Leaf: Bacteriocins Going Green. *Trends Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2018 May 5]; 26(1):1–2. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0966842X17302391>
72. Lohner K, Blondelle S. Molecular Mechanisms of Membrane Perturbation by Antimicrobial Peptides and the Use of Biophysical Studies in the Design of Novel Peptide Antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2018 May 2]; 8(3):241–56. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1386-2073&volume=8&issue=3&spage=241>
73. Mazzotta AS, Montville TJ. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 degrees C and 30 degrees C. *J Appl Microbiol* [Internet]. 1997 Jan [cited 2018 May 3]; 82(1):32–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113875>
74. Healy B, Field D, O'Connor PM, Hill C, Cotter PD, Ross RP. Intensive Mutagenesis of the Nisin Hinge Leads to the Rational Design of Enhanced Derivatives. Permyakov EA, editor. *PLoS*

One [Internet]. 2013 Nov 11 [cited 2018 May 12]; 8(11):e79563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24244524>

75. Thomas OE, Adegoke OA. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Toxicity of food colours and additives: A review. 2015 [cited 2018 May 5]; 9(36):900–14. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJPP>

76. Olea Serrano MF, López Martínez MC. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de colorantes y conservantes. Ediciones Díaz de Santos; 2000. 15 p.

77. Paškevičius Š, Starkevič U, Misiūnas A, Vitkauskienė A, Gleba Y, Ražanskienė A. Plant-expressed pyocins for control of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One [Internet]. 2017 [cited 2018 May 6];12(10):e0185782. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28973027>

78. Vukomanović M, Žunič V, Kunej Š, Jančar B, Jeverica S, Podlipec R, et al. Nano-engineering the Antimicrobial Spectrum of Lantibiotics: Activity of Nisin against Gram Negative Bacteria. Sci Rep [Internet]. 2017 Dec 28 [cited 2018 May 13]; 7(1):4324. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04670-0>

3

CAPÍTULO
TRES

APLICACIONES EN LA BIOTECNOLOGÍA MÉDICA

La biotecnología como herramienta para la generación de vacunas de uso humano y animal

Manuel Felipe Villalba, Leidy A. Palechor-Ocampo, Jaime A. Cardona-Ospina, Lida I. Mancilla-Estacio, Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

Las vacunas (del término en latín *vaccus*, que significa vacuno, o relativo a ganado vacuno) junto con la implementación de los sistemas de alcantarillado y la potabilización del agua, se han considerado como los logros de salud pública más importantes de la humanidad en los últimos dos siglos. Las vacunas son consideradas como la estrategia de mayor impacto en salud pública, debido a que han logrado evitar la muerte de millones de personas, impidiendo el desarrollo de las infecciones más comunes y letales como viruela, hepatitis A y B, poliomielitis, difteria, sarampión, tétanos y tuberculosis, entre otras. Este hecho les mereció el concepto de ser el mayor avance en salud pública de toda la historia. La vacunación tiene un beneficio colectivo, puesto que la inmunización de una persona hacia un agente patógeno repercute en la protección a toda una población contra una enfermedad específica, debido a que se puede detener la transmisión del microorganismo protegiendo a muchas personas. El mecanismo de acción de una vacuna consiste en la estimulación del sistema inmunitario, conformado por órganos y células altamente especializados. Una vez activas las células del sistema inmunitario, inician una lucha contra los gérmenes

o microorganismos que han logrado ingresar al organismo a través de la producción de moléculas como los anticuerpos y las citoquinas. El sistema inmunitario adecuadamente estimulado puede "recordar" contra que microorganismo ha sido vacunado y por lo tanto el individuo vacunado responde de forma más rápida y eficiente luego de un posterior encuentro con el microorganismo. Las primeras vacunas (vacunas tradicionales) se conformaron de virus o bacterias vivos, pero que perdieron su capacidad de infección (atenuados), como las vacunas contra viruela, rabia, BCG, cólera oral, o inactivadas por calentamiento o tratamiento con químicos que ocasionan la muerte del microorganismo, como las vacunas contra difteria, tétanos y meningitis. Posteriormente se logró la obtención de fragmentos de los microorganismos patógenos por procedimientos químicos o empleando las nuevas tecnologías de ingeniería genética. Estas nuevas vacunas, que sólo presentan uno de los componentes se clasifican en macromoléculas purificadas, antígenos combinados, vectores recombinantes, péptidos sintéticos o vacunas de ADN.

En general, las vacunas contienen una molécula o moléculas del microorganismo que se presentan al sistema inmunitario, y que tienen la capacidad de inducir una respuesta del sistema inmunitario, cuando se le administra a una persona sana, sin ocasionar la enfermedad, pero con la capacidad de aportar inmunidad y protección contra dicho patógeno. Las vacunas logran su efectividad y capacidad de protección contra el patógeno específico, gracias al desarrollo de la memoria inmunológica, característica importante porque permite que el organismo del individuo vacunado responda de manera más rápida y eficiente luego del encuentro con el agente infeccioso y protegiéndolo del desarrollo de la enfermedad.

Los registros de los primeros ensayos para inmunizar la población son muy antiguos y se realizaron en China e India en el siglo VI, utilizando un sistema de vacunación para protegerse de la viruela denominado variolación (término que se refiere

a inmunización activa, por contacto con los exudados de las lesiones sin preparación de vacuna (virus vivo)). El primer intento científico de controlar una enfermedad infecciosa producida por virus, empleando una vacuna atenuada, compuesta por el microorganismo completo, fue el trabajo de Jenner, en el año 1796, quien inoculó a varias personas con pus de viruela de ganado bovino, logrando evitar el desarrollo de la viruela humana.

En la década de los 80s (80 años después de los ensayos de Jenner), Pasteur fue el primero en realizar ensayos de vacunación contra bacterias, inmunizando contra el cólera aviar y el ántrax. Pasteur fue también el primero en establecer las bases del proceso de atenuación del patógeno, al aplicar tratamiento por calor a los extractos que contenían el agente patógeno. También logró la disminución o modificación de la capacidad patogénica por pases repetidos del patógeno en organismos diferentes al huésped.

Durante los años siguientes al inicio del siglo XX, se desarrollaron varias vacunas contra enfermedades como difteria, tétanos, tuberculosis (BCG, Bacille Calmette-Guerin, 1921) y contra la tosferina (*B. pertussis*, 1918), primera vacuna bacteriana completa inactivada. En 1930 se logró la producción de vacunas conformadas por subunidades de proteínas inactivadas por formalina, para la difteria y el tétanos. En 1949, Enders desarrolló la primera vacuna viral producida por cultivo *in vitro*, contra el virus de polio, mientras que, en 1955 Salk, obtuvo la vacuna de polio inactivada por cultivo en células de riñón de mono. Debido al riesgo asociado a las vacunas de organismos completos, se iniciaron investigaciones para crear vacunas basadas en el antígeno del patógeno únicamente. Aunque más seguras, estas vacunas no desencadenan una respuesta inmune tan fuerte, razón por la cual es necesario adicionar un antígeno bacteriano, presente en la pared, que induce una respuesta más fuerte (Polisacárido).

Los avances en biotecnología y la ingeniería genética han sido importantes en el desarrollo de vacunas para enfermedades que afectan tanto a animales de granja como a los seres humanos,

además de superar los inconvenientes antes mencionados y obtener la “vacuna ideal”. En este capítulo, se describen las tecnologías más importantes que se utilizan para desarrollar vacunas basadas en la ingeniería genética. En principio, las tecnologías pueden utilizarse para cambiar el agente patógeno que se desea neutralizar, es decir alterar sus propiedades mediante modificaciones genéticas, o bien para modificar los genes o las secuencias de codificación aislados de agentes patógenos para producir inmunógenos concretos asociados a una inmunidad protectora. En el presente capítulo se pretende informar al lector sobre qué es y cómo funciona una vacuna, como se produce y el papel que juega la biotecnología en el desarrollo de vacunas más eficientes y con menos efectos adversos.

En los últimos 200 años, la vacunación ha conseguido controlar varias enfermedades importantes, al menos en ciertas partes del mundo: viruela, difteria, tétanos, poliomielitis y sarampión, entre otras. En el caso de la viruela, el sueño de la erradicación se ha cumplido, ya que la enfermedad ha desaparecido. La vacunación contra la gripe, hepatitis B, neumococo y *Haemophilus influenza* de tipo B han supuesto un gran avance contra estas infecciones. Sin embargo, algunas vacunas pueden presentar efectos adversos después de su inoculación como fiebre y reacciones alérgicas, en algunos casos de requiere de varias dosis para que la vacuna sea eficaz y no se recomienda la vacunación si la persona se encuentra enferma o inmunosuprimida. Otra desventaja es el hecho que en la actualidad existen enfermedades que presentan altas tasas de mortalidad para las cuales aún no hay vacuna como el cáncer, el sida y más recientemente el SARS-CoV-2 (COVID-19), entre otras.

¿Qué es y cómo funciona el sistema inmune?

El **sistema inmune** o sistema inmunitario humano, es el encargado de la defensa de nuestro cuerpo para evitar que agentes patógenos o microorganismos (organismos microscópicos que

incluyen bacterias, virus, parásitos y hongos) ingresen y los destruye impidiendo su reproducción, para evitar el desarrollo de infección y/o enfermedad. Este sistema también se encarga de eliminar las células tumorales y evitar la reacción contra los componentes propios del cuerpo (**autoinmunidad**). El sistema inmune está compuesto por moléculas, células, tejidos y órganos que actúan de manera coordinada, para eliminar los agentes infecciosos mediante mecanismos que han sido el producto de miles de años de evolución. Una de las características más importantes de nuestro sistema inmune es la **memoria inmunológica**. Esta propiedad es la capacidad de recordar hacia que microorganismos se ha expuesto previamente, para incrementar la rapidez y la intensidad de la respuesta inmune en una nueva exposición. Una vacuna es una parte o todo el microorganismo patógeno que desencadena la respuesta inmune. La protección generada por la vacunación se asocia con una respuesta celular específica por parte de los Linfocitos B (que producen anticuerpos) y Linfocitos T (que producen citoquinas). Para comprender como trabaja una vacuna, es necesario conocer sus componentes y la manera como trabajan cada uno de ellos, formando una red organizada y coordinada.

Componentes del sistema inmune

El sistema inmune está compuesto de una serie de elementos entre ellos moléculas, células, tejidos y órganos que cumplen funciones específicas y coordinadas, para producir una adecuada y oportuna respuesta frente a los microorganismos o agentes extraños (**Tabla 3.1**). Los órganos del sistema inmune, conocidos como órganos linfoides, por ser el lugar de concentración de las células llamadas linfocitos, se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, estos son la **médula ósea**, el timo, los ganglios linfáticos y el bazo. La médula ósea, es un tejido blando que se encuentra en la parte central de los huesos largos, como el fémur, es el sitio en el que se generan las células circulantes en la sangre, entre las que

se encuentran los leucocitos o **glóbulos blancos** (o leucocitos, del griego leukos = blanco y kytos = célula), que están destinados a convertirse en células del sistema inmune.

Órganos del Sistema inmune

El **timo** es un órgano ubicado en la parte posterior del esternón, es el lugar en el cual un tipo de glóbulos blancos, denominados linfocitos **T**, maduran (se diferencian) adquiriendo la capacidad de enfrentarse a los microorganismos y estimular otras células del sistema de defensa mediante la producción de sustancias llamadas citoquinas.

Tabla 3.1. Clasificación de los componentes del sistema inmune por moléculas, células y órganos.

Componente	Moléculas	Células	Órganos
Inmunidad Innata	Moléculas con actividad antimicrobiana: Defensinas, lisozima	Mastocitos	Barreras naturales: Piel, mucosas
	Sistema del complemento	Polimorfonucleares neutrófilos	
	Interleuquinas	Monocitos	
	Quimiocinas	Macrófagos	
	Pentraxinas	Células Natural Killer	
	Coleccionas	Células Dendríticas	
Inmunidad Adaptativa	Anticuerpos	Linfocitos B	Médula ósea
	Interleuquinas	Linfocitos T	Timo
			Ganglio linfático
			Bazo

Fuente: elaboración propia.

El **sistema linfático** es un sistema de vasos que recorre todo el cuerpo, transporta la linfa, un líquido transparente que baña los tejidos del cuerpo y que drena en múltiples pequeños nódulos llamados **ganglios linfáticos**. Los ganglios linfáticos

son pequeños aglomerados celulares en forma de frijol, que se localizan a lo largo de los vasos linfáticos, conformando grupos o *clusters* en la nuca, axilas, ingle y abdomen, entre otros lugares. Estos ganglios son compartimentos especializados en donde las células del sistema inmune se congregan y pueden encontrar los antígenos. Los leucocitos pueden viajar a través del cuerpo utilizando los vasos sanguíneos o a través del sistema de vasos linfáticos. Su capacidad para circular inmersas en los fluidos de la linfa y la sangre es lo que permite a las células del sistema inmune vigilar constantemente la presencia de organismos patógenos.

El bazo, un órgano aplanado ubicado en el abdomen, que contiene compartimentos especializados donde las células del sistema inmune se reúnen y donde pueden enfrentar los antígenos. El bazo también se encarga de retirar de la sangre las células de la defensa que han envejecido o están dañadas y los microorganismos que han sido marcados como invasores. Adicionalmente existen aglomeraciones de tejidos linfoides en muchas partes del cuerpo, especialmente en el tracto digestivo, los alveolos y pulmones, regiones que son superficies del cuerpo por las que pueden ingresar patógenos. Estos tejidos incluyen las amígdalas, adenoides y apéndice.

Células del sistema inmune

Las células del sistema inmune se denominan en general leucocitos, y se distinguen por sus funciones, que dependen de su estructura celular. Un tipo de leucocitos es especializado en atrapar y digerir los microorganismos, estas células son llamadas fagocitos (del griego fagos = que come), en vertebrados este tipo de leucocitos se identifican como macrófagos y neutrófilos. Estas células pueden además liberar sustancias denominadas mediadores (interleuquinas y citoquinas), que actúan como mensajeros para atraer más células de defensa al lugar en donde se requiere activar la respuesta inmune. Los leucocitos son capaces también de marcar las células malignas del cáncer o las bacterias invasoras para que

sean destruidas. Los leucocitos se pueden clasificar en **granulocitos y agranulocitos** de acuerdo con la estructura y apariencia de su núcleo y citoplasma. Los granulocitos son aquellos leucocitos que presentan un núcleo multilobulado y grandes cantidades de gránulos citoplasmáticos, que contienen químicos, con potencial capacidad para destruir los microorganismos. Los agranulocitos por su parte poseen un núcleo uniforme y muy pocos o ausencia de gránulos citoplasmáticos.

Leucocitos agranulocitos: A este grupo de leucocitos pertenecen los linajes linfóide y mieloide y representan un 35-38% del total de leucocitos. En el linaje linfóide se encuentran los linfocitos, los cuales a su vez se clasifican como células B, T y NK. Las células B tienen la capacidad de diferenciarse en células plasmáticas una vez reconocen el antígeno específico y se especializan en la síntesis y secreción de inmunoglobulinas a los fluidos del cuerpo. Aunque estas moléculas pueden reconocer los antígenos que circulan libres o en la superficie de las células de los microbios, no pueden penetrar las células. Por su capacidad para la interacción con los antígenos solubles en sangre y demás fluidos corporales, los linfocitos B son los responsables de la respuesta humoral. Cada célula plasmática produce un único tipo de anticuerpo que produce en grandes cantidades y las vierte al torrente sanguíneo.

Las células T a diferencia de las células B, no reconocen los antígenos solubles, pero por la presencia de receptores similares a los anticuerpos, tienen la capacidad de reconocer fragmentos de los antígenos en la superficie de diferentes células presentadoras de antígeno y son las células que dan origen a la denominada respuesta celular (sin embargo, es importante aclarar que la división entre respuesta humoral y respuesta celular es más histórica, dado que toda la respuesta del sistema es celular). Los linfocitos T pueden subdividirse en varias subpoblaciones como linfocitos T ayudadores o “*helper*” (Th), linfocitos T citotóxicos (CTLs) y linfocitos T reguladores (Treg).

Los linfocitos T ayudadores (linfocitos Th) tienen la capacidad de detectar los péptidos presentados por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) de clase II y activan otras células del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas. Algunas de estas células pueden colaborar con los linfocitos B para mejorar la producción de anticuerpos.

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs), tienen una función diferente, estos atacan otras células que portan ciertas moléculas extrañas o anormales sobre su superficie. Este tipo de linfocitos es importante en el ataque a los virus, debido a que estos patógenos se reproducen dentro de las células que infectan, logrando evadir el sistema inmune. Cuando una célula está infectada por un virus, algunos pequeños fragmentos pertenecientes a estos logran ubicarse en la membrana celular y los CTLs, pueden reconocerlos iniciando un ataque a la célula infectada. Los linfocitos T reconocen los antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno unidos a las moléculas del MHC. Estas moléculas son proteínas que permiten a los linfocitos T distinguir entre lo propio y lo extraño. Las moléculas del MHC proporcionan un soporte para presentarle a los linfocitos T los antígenos. Los linfocitos T reguladores son los encargados, como su nombre lo indica, de regular el sistema y evitar respuestas inmunitarias excesivas.

Existe un tipo de linfocitos denominados células asesinas naturales o NK (por sus siglas en inglés: Natural Killer), las cuales destruyen las células anormales como las infectadas por virus o tumorales, gracias a que poseen gránulos que contienen moléculas capaces de inducir citotoxicidad. A diferencia de los linfocitos T, que reconocen los antígenos unidos a las moléculas del MHC, los linfocitos NK tienen la capacidad de reconocer las células que carecen de moléculas MHC clase I propias o alteradas.

Dentro de la línea mieloide encontramos células como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Estas células se identifican en un grupo definido como mononucleares. Los

monocitos son leucocitos denominados fagocitos, por su capacidad para absorber y digerir microbios y otras partículas extrañas. Los monocitos circulan por la sangre y cuando migran al interior de los tejidos, se transforman convirtiéndose en macrófagos, que adquieren una mayor capacidad para realizar la fagocitosis y tienen además la capacidad de presentar los antígenos. Los macrófagos se especializan de acuerdo con el tejido en que se encuentran, entre ellos en pulmones, riñones, cerebro e hígado. Los macrófagos tienen muchas funciones importantes en el sistema inmune. Se encargan de la eliminación de desechos y de células alteradas o viejas del cuerpo, tienen la capacidad de presentar fragmentos de antígenos a los diferentes linfocitos para inducir la respuesta inmune y producen o secretan una serie de moléculas que funcionan como señales químicas, denominadas monoquinas, que juegan un papel vital en la respuesta inmunitaria. Un grupo de leucocitos denominados células dendríticas se encarga también de la presentación de antígenos, pero poseen una baja capacidad fagocítica.

Leucocitos granulares: Este grupo de los leucocitos comprende los neutrófilos, basófilos, mastocitos y los eosinófilos. La función principal de los neutrófilos es la fagocitosis, siendo de gran importancia en la infección aguda. Los neutrófilos también se encargan de liberar sustancias tóxicas para determinados microorganismos, principalmente bacterias y de mediar su destrucción. Los basófilos y eosinófilos liberan los químicos de sus gránulos dañando las células o microbios cercanos. Estos granulocitos que actúan principalmente contra parásitos se encuentran tanto circulando en la sangre, como reclutadas en las barreras naturales del cuerpo como la **piel** y las **mucosas**. Los mastocitos son similares a los basófilos, excepto que no se encuentran en sangre, ellos se ubican en pulmones, piel y tracto intestinal, entre otros sitios. Cumplen su función en las reacciones alérgicas y son básicos en las reacciones tempranas de hipersensibilidad. Los eosinófilos por su parte tienen una función importante en las reacciones alérgicas y en la protección contra los gusanos planos o helmintos.

Moléculas del sistema inmune

El sistema inmune produce una serie de moléculas que cumplen funciones diversas, como mensajeros químicos para activar las células que conforman el sistema, marcar los microbios para dirigir el ataque de las células o directamente neutralizar los antígenos. Entre las principales moléculas que participan en la respuesta inmune se encuentran los anticuerpos, las citoquinas, el sistema del complemento y los inmunomoduladores endógenos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas, familia de proteínas a las que pertenecen los anticuerpos, son producidas por los linfocitos B y secretadas al torrente sanguíneo. Los anticuerpos tienen la capacidad de unirse de manera específica a los componentes de los microorganismos patógenos liberados. Pueden también unirse directamente sobre ellos señalándolos para facilitar la fagocitosis por parte de las células del sistema fagocítico o su destrucción por las NK. Las inmunoglobulinas se distinguen en varios tipos dependiendo de su papel en la respuesta inmune. La inmunoglobulina G o IgG, trabaja eficientemente recubriendo los microbios patógenos para acelerar su destrucción por otras células del sistema inmune. La IgM es efectiva en la destrucción de las bacterias. Esto es posible al adherirse a ellas e impedir los procesos metabólicos y su invasión a tejidos, impidiendo el crecimiento de los microorganismos. La IgA es abundante en los fluidos del cuerpo como las lágrimas, la saliva, las secreciones del tracto respiratorio y el digestivo, siendo importante en la inmunidad de las mucosas. La IgE parece estar relacionada con las infecciones parasitarias y con el desarrollo de las enfermedades alérgicas. La IgD permanece unida a los linfocitos B y es importante en la respuesta inicial de estas células como receptor de célula B.

Las citoquinas son moléculas del sistema inmunitario que permiten la comunicación de los componentes de este sistema. Estas proteínas son secretadas por unas células y actúan sobre las mismas u otras para coordinar una respuesta inmune apropiada. Las

citoquinas incluyen una diversidad de interleucinas, interferones y factores de crecimiento. El papel de algunas citoquinas es la activación de ciertos tipos de células del sistema inmune, mientras otras las inactivan. La diversidad en la función de las citoquinas es amplia. Por ejemplo, la interleuquina 2 (IL-2), es responsable de activar la producción de linfocitos T, optimizando la respuesta inmune celular, mientras las quimocinas son citoquinas liberadas por las células en un sitio de daño o infección y su papel es la llamada de otras células del sistema inmune hacia la región afectada para reparar el daño o combatir la infección.

El sistema del complemento está compuesto de más de 25 proteínas que trabajan juntas y su función es reconocer los patógenos complementando la capacidad de los anticuerpos e inducir los cambios asociados con la respuesta inflamatoria, ayudando a combatir las infecciones. Las proteínas del sistema del complemento circulan en la sangre, demás fluidos y los tejidos del cuerpo en forma inactiva y son activadas localmente como una cascada, en forma sucesiva y ordenada al activarse las primeras proteínas del sistema. Aunque existen tres formas de activar la cascada del complemento, todas convergen en una vía común, que dan lugar a tres respuestas principales: reclutamiento de células inflamatorias, opsonización o marcación de patógenos y destrucción de patógenos. Las proteínas del complemento pueden inducir vasodilatación e incrementan por lo tanto la permeabilidad vascular, que permite la salida de los anticuerpos y los componentes del complemento a los tejidos. La función principal del sistema del complemento es la destrucción directa de los microorganismos que ingresan al organismo, como una forma de ayudar o complementar la respuesta del sistema adaptativo (que se mencionará más adelante).

Establecimiento de la respuesta inmune

Las enfermedades infecciosas son las más comunes en el ser humano y varían en nivel de gravedad desde una gripa común, pasando por una hepatitis incapacitante hasta una

enfermedad de alta mortalidad como las ocasionadas por el Virus de la Inmunodeficiencia humana, causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o SIDA, o la producida por el virus del Ébola. La mayoría de los agentes infecciosos ubicados al exterior del organismo no logran penetrar a este gracias a las barreras como la piel y las mucosas del tracto digestivo y respiratorio. Estas vías de ingreso de organismos cuentan con una serie de mecanismos para protección natural como la secreción de moco en las vías nasales, la estimulación de los reflejos como estornudos o tos para inducir la salida de los microbios de las vías respiratorias y la presencia de ácido en el estómago para destruir muchos patógenos que son ingeridos con los alimentos.

Los microbios que sobreviven logrando pasar este primer frente de defensa, se deben enfrentar a las células que conforman las paredes del sistema digestivo, respiratorio y urogenital. Estas células de defensa denominadas epiteliales, producen una capa de moco que impide el paso de muchos microorganismos. Este moco posee moléculas como la defensina y la lisozima, capaces de destruir los microbios. En la superficie de esta capa de células se encuentra también anticuerpos IgA. Bajo el epitelio, se ubican una serie de células de defensa como los macrófagos, linfocitos B y T, en espera de los microbios que logren atravesar esta primera barrera.

Los microorganismos que logran atravesar las barreras epiteliales y mucosas, deben enfrentarse a otros mecanismos de defensa que también hacen parte de la denominada **Inmunidad Innata**, la cual no es específica, es un mecanismo general de respuesta que se activa al reconocer fragmentos conservados entre grupos de microorganismos denominados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés. La inmunidad innata incluye varios componentes (**Tabla 3.1**), entre ellos los fagocitos, como los macrófagos y las células dendríticas, que se encuentran patrullando los tejidos, las células NK y las moléculas del complemento, también participan lo

neutrófilos y los basófilos. Estos componentes están siempre listos antes de la invasión de los microorganismos para impedir su entrada, eliminarlos o limitar su crecimiento. La inmunidad innata es la encargada de activar la respuesta inflamatoria, la cual se caracteriza por la presencia de calor, dolor y enrojecimiento en las áreas afectadas y ocurre en los primeros días luego el ingreso del microorganismo. De igual manera logra la destrucción de las células infectadas por virus y otros agentes infecciosos intracelulares, al activar las células NK. Como se mencionó previamente, las células que conforman el sistema inmunitario innato producen citoquinas que son importantes en la activación de la respuesta inmune adaptativa. Adicionalmente, existen moléculas solubles asociadas con el sistema innato como las colectinas y pentraxinas que son importantes en la destrucción de los microorganismos. La inmunidad innata además de ser inespecífica carece de la capacidad de responder de forma más rápida y potente en un segundo evento de exposición (memoria inmunológica). La activación del sistema innato es clave para lograr una buena activación del sistema adaptativo, el cual incluye a los linfocitos B y T, los cuales presentan receptores únicos que les permiten reconocer a los agentes extraños y responder de manera específica.

La inmunidad adaptativa se caracteriza por que responde únicamente ante la presencia de un estímulo, es altamente específica y tiene la capacidad de inducir memoria inmunológica. La inmunidad adaptativa controla los microorganismos mediante la producción de anticuerpos y citoquinas, de una manera específica y altamente regulada. La especificidad de este sistema inmunitario se debe a que se activa sólo con componentes determinados de los agentes infecciosos (**antígenos**) y que en un segundo evento de exposición sólo estos componentes volverán a desencadenar la respuesta. La memoria inmunológica hace referencia a la capacidad de inducir una respuesta inmune con mayor velocidad e intensidad luego una segunda o posterior exposición al mismo

antígeno. Son estas dos características, especificidad y memoria, las que permiten que las **vacunas** sean efectivas como medida de prevención de las enfermedades infecciosas.

La especificidad del sistema inmune adaptativo está dada por la presencia de receptores tanto en los linfocitos B como en los linfocitos T, que poseen la capacidad de reconocer los denominados determinantes antigénicos o epítopes, que son específicos para cada agente extraño o microorganismo. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B, aportan especificidad a la respuesta inmunitaria adaptativa, debido a que estas moléculas son capaces de interactuar sólo con un tipo de antígeno, que logran interactuar de manera específica con su región de reconocimiento. Los anticuerpos se asocian con la respuesta adaptativa denominada humoral, por tener la capacidad de reconocer los antígenos solubles o libres en el torrente sanguíneo o en los fluidos corporales. Las inmunoglobulinas son proteínas capaces de unirse a los microbios con alta afinidad. La unión de los anticuerpos a virus y toxinas microbianas puede bloquear su habilidad para unirse a receptores de las células huésped. Los anticuerpos también marcan los patógenos invasores para su destrucción, al facilitar su absorción por parte de las células fagocíticas del sistema de inmunidad innata. La respuesta inmunitaria adaptativa también incluye un tipo de respuesta conocida como inmunidad celular. En este tipo de respuesta, el reconocimiento de los antígenos presentes en los microorganismos, se da gracias a que las células presentadoras de antígeno como los fagocitos, procesan los antígenos de los microorganismos que han fagocitado y los degradan mediante la acción de enzimas líticas y generan fragmentos que se unen a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en su membrana plasmática. El reconocimiento de los antígenos específicos de los microorganismos unidos al MHC se realiza por parte del receptor de la célula B (BCR) o el receptor de la célula T (TCR), moléculas especializadas en el reconocimiento de un solo antígeno. En la respuesta mediada por células de la inmunidad adaptativa, el reconocimiento de los antígenos en la membrana

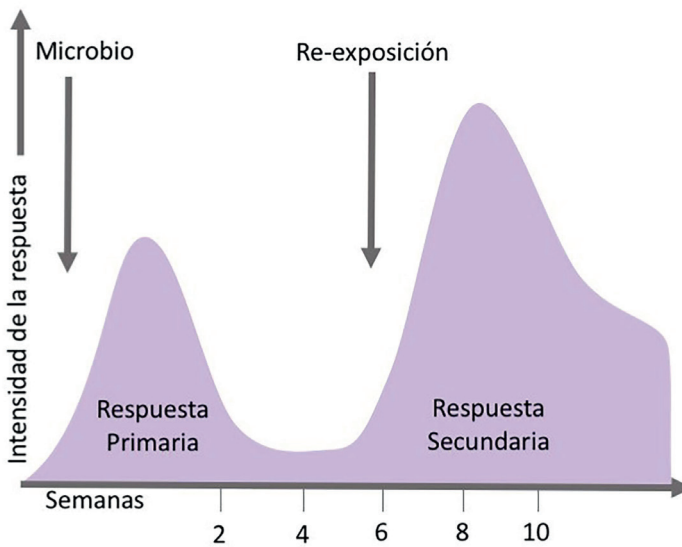
de las células fagocíticas activa los linfocitos T y B, específicos, induciendo su proliferación (expansión clonal) y diferenciación, en un lapso entre 5 y 10 días después de la exposición inicial al antígeno (**Figura 3.1**). Los linfocitos activados reaccionan directamente contra los antígenos extraños que se presentan en la superficie de las células huésped. Estos linfocitos pueden destruir células infectadas por virus que exhiben antígenos virales en su superficie, eliminando la célula infectada antes de que el virus tenga la posibilidad de replicarse. Otro mecanismo de las células T es la producción de moléculas mensajeras o citoquinas, que actúan como señales para activar macrófagos, que pueden destruir microbios después de haberlos fagocitado.

Al activarse los linfocitos B por un antígeno específico, se transforman en células plasmáticas, que se especializan en la secreción de un solo tipo de anticuerpos. Los linfocitos B de memoria se dirigen a los ganglios linfáticos y pueden permanecer en ellos durante periodos de tiempo muy largos. Estos linfocitos conservan su capacidad de reconocimiento de los antígenos y pueden, en el evento de presentarse el antígeno específico, activar nuevamente la respuesta inmune, esta vez de manera más rápida e intensa. La respuesta específica más rápida, debida a los linfocitos B de memoria, como resultado de una segunda exposición al mismo antígeno se denomina memoria inmunológica.

Un subgrupo de linfocitos T responsables de la inmunidad celular pueden alojarse también en los ganglios linfáticos cumpliendo funciones de células de memoria, linfocitos T de memoria, facilitando la respuesta luego de una segunda exposición al mismo microorganismo o antígeno. Debido a esta capacidad de conservar poblaciones de linfocitos T y B de memoria, es posible el empleo de estrategias para lograr la protección del organismo, preparándolo para un posterior encuentro con un agente infeccioso, mediante la presentación de los antígenos presentes en el microorganismo. Al reconocer fragmentos del microorganismo patógeno, se induce la activación de la respuesta

inmune adaptativa, mediada por la producción de anticuerpos y posteriormente los linfocitos de memoria, a lo que se denomina Respuesta inmune secundaria (**Figura 3.1**). Los linfocitos de memoria almacenados en los ganglios linfáticos pueden conferir protección al individuo tras una segunda exposición al mismo patógeno, debido a que la respuesta inmunitaria será más rápida, eficiente y de mayor intensidad.

Figura 3.1. Representación de la respuesta inmune primaria (primera exposición a un microbio) y de la respuesta inmune secundaria (re-exposición).



Fuente: elaboración propia.

¿Cómo funciona una vacuna?

La respuesta inmune puede ser desencadenada no solamente por una infección sino también por inmunización con vacunas. Las vacunas contienen microorganismos o partes de microorganismos que han sido tratados para retirar su capacidad de generar la infección natural. La **vacunación** consiste en inducir la respuesta inmunitaria imitando la activación que produce

un microorganismo patógeno, mediante la administración del agente patógeno completo, que se ha modificado para que pierda la capacidad de producir la enfermedad, o partes de este, con el objetivo de conferir protección contra ese microorganismo luego de un posterior encuentro con el mismo. La **vacuna ideal** tiene la capacidad de producir una respuesta inmune similar a la que produciría el contacto con el microorganismo, generando **células de memoria** sin producir la enfermedad, característica conocida como **inocuidad**. De acuerdo con la característica estructural de las vacunas, se pueden clasificar como **vacunas vivas atenuadas** o **vacunas inactivadas** y **vacunas de subunidades**. Las vacunas vivas atenuadas se conforman de microorganismos que han sufrido cambios en su genoma (mutaciones), debido a que se emplearon organismos huéspedes diferentes a los seres humanos para su reproducción. Este proceso modifica la capacidad del microorganismo de producir la infección, aunque la estructura es suficientemente conservada para inducir la respuesta inmune. En las vacunas inactivadas, se ha eliminado la capacidad de reproducción del microbio patógeno, a través de procedimientos químicos o físicos como calor, ácidos, entre otros. Las vacunas de subunidades consisten en la producción de fragmentos de la estructura de los microorganismos, con la capacidad de estimular al sistema inmune. Estas vacunas pueden presentar fragmentos de diferentes agentes patógenos en una sola mezcla.

Después de la administración de la vacuna, si la dosis es adecuada, se induce la activación de la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta se reconoce por la presencia de síntomas de inflamación, similares a los inducidos por la infección con el microorganismo. Esta respuesta se asocia frecuentemente con la aparición de síntomas como fiebre y malestar general, que se presenta en los primeros días después de la vacunación. Estos síntomas son temporales y generalmente indican una buena respuesta del sistema inmune. Aproximadamente una semana después de la administración de la vacuna, producto del procesamiento de los componentes de la vacuna por parte de las

células del sistema inmune, se induce la activación del sistema inmune adaptativo y posteriormente se induce la producción de células de memoria (linfocitos B y T). La cantidad de células de memoria que induce una vacuna depende de varios factores como la respuesta de cada individuo, asociada principalmente al componente genético, su nutrición, la edad, la dosis administrada, la vía de administración y el tipo de microorganismo. Así mismo la vacuna incluye además de los componentes del microorganismo, una serie de moléculas que mejoran la respuesta adaptativa a la vacuna, como sales de aluminio (alumbre), denominados adyuvantes. De igual manera como la respuesta inmune varía de acuerdo con el microorganismo y tipo de vacuna, existe gran diversidad en el tiempo de mantenimiento de las células de memoria. Esta es la razón principal por la cual, en el caso de algunas vacunas, se requiere administrar una o más dosis de refuerzo, con la finalidad de generar una respuesta inmune protectora a largo plazo.

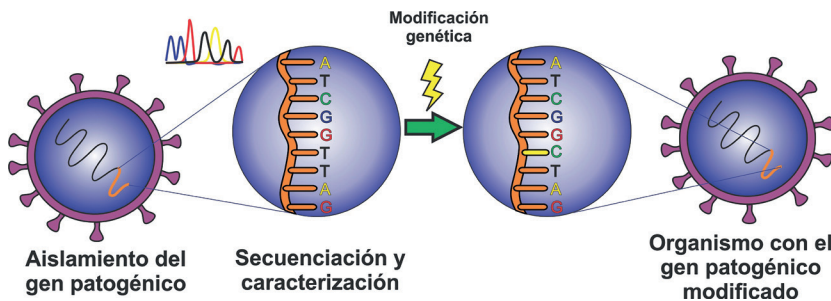
¿Cómo se puede utilizar la Biotecnología para producir una vacuna?

La biotecnología es el uso o aprovechamiento de las células y sus procesos biomoleculares para desarrollar tecnologías y productos que permitan mejorar la calidad de vida y la salud del planeta. La biotecnología se inició hace más de 6000 años, desde que el hombre emplea los microorganismos como levaduras (hongos microscópicos) en la industria alimentaria, para la producción de pan y bacterias para la producción de queso. Dentro del campo de la biotecnología moderna se encuentra la Ingeniería Genética, en esta área se ha logrado obtener un adecuado conocimiento de la estructura del material genético de los organismos vivos y de los procesos para la transmisión de la información genética. En el campo específico de las vacunas, la ingeniería genética ha permitido el aislamiento y estudio del genoma de los agentes causantes de enfermedades. Este es el primer paso necesario para la producción de las vacunas basadas en biotecnología.

Vacunas atenuadas mediante modificación genética

Los avances en la ingeniería genética han permitido el desarrollo de este tipo de vacunas, que mediante el reconocimiento de los genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad denominada patogenicidad – los que causan o están vinculados con la enfermedad- se pueden modificar o eliminar del genoma ¹. Gracias a esta tecnología se han desarrollado virus y bacterias con sus genes patogénicos alterados, siendo los últimos más complejos por el gran tamaño de su genoma ². Estas modificaciones se pueden conseguir gracias a manipulaciones tanto biológicas – utilizando organismos similares - como químicas – cambios claves en el gen -, aunque se debe tener en cuenta que los extremos son malos: si se cambia mucho el patógeno ya perderá su capacidad de infectar y con esto la función de vacuna; o si la atenuación es baja puede tener la habilidad de revertir la patogenicidad y causar la enfermedad ³. Ejemplos de este tipo de vacunas son las desarrolladas contra la fiebre amarilla y la viruela ⁴. En la **Figura 3.2**, se muestra el proceso de producción de las vacunas vivas atenuadas.

Figura 3.2. Proceso de producción de organismos vivos atenuados.



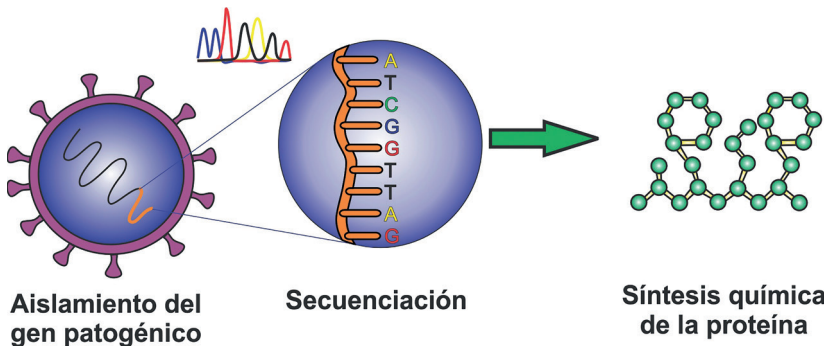
Fuente: elaboración propia.

Vacunas de péptidos sintéticos

Este tipo de tecnología emplea la secuencia de la proteína antigénica- la que estimula la respuesta inmune- procedente del agente causante de la enfermedad como molde para la construcción

por métodos químicos de dicha proteína. Para esto, inicialmente se obtiene el gen (fragmento de ADN) que contiene la información necesaria para la producción la proteína antigénica a partir de la extracción del material genético del organismo patógeno⁵, como se muestra en la **Figura 3.3**.

Figura 3.3. Desarrollo de vacunas de péptidos sintéticos.



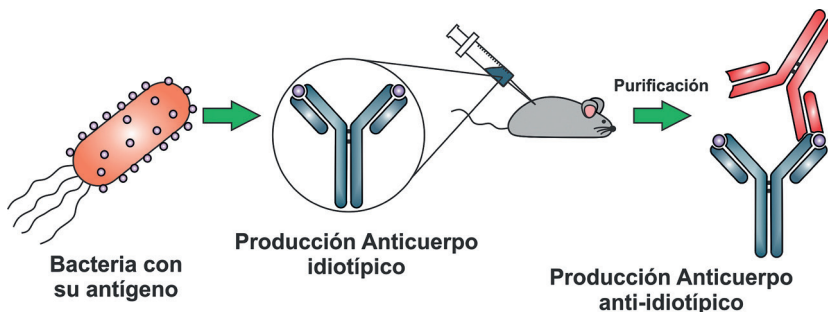
Fuente: elaboración propia.

Estas proteínas virales o bacterianas presentan epítomos, término empleado para definir la parte tridimensional de la molécula reconocida por el sistema inmune. Los epítomos o epítopes afectan la especificidad y eficiencia de la respuesta inmune, por ser las regiones que reconocen los anticuerpos producidos y los receptores de las células de defensa. Debido a que en el organismo los epítomos deben adquirir una estructura tridimensional adecuada, sólo unas pocas moléculas sintetizadas químicamente logran tener la forma adecuada de la proteína a la que se busca imitar. Para superar este problema, se utilizan anticuerpos que identifican los epítomos clave y permiten seleccionar los que pueden adquirir la estructura tridimensional correcta (denominados mimitopos), produciendo una respuesta inmune eficiente y adecuada en el paciente^{1,6}. Las vacunas sintéticas proceden de una secuencia genética que contiene información acerca de las proteínas antigénicas de los patógenos, pero que su síntesis o elaboración se consigue por medio de métodos químicos.

Vacunas anti-idiotipo

El tipo de inmunidad que brinda esta tecnología es pasiva porque no se administran antígenos del virus o bacteria, sino anticuerpos contra él ¹. Estas vacunas son muy efectivas cuando el agente patógeno presenta muchas mutaciones, como por ejemplo con el virus de la influenza, pero al ser de tipo pasivo se necesita la frecuente administración de dosis ⁷. Este tipo de vacunas no se conforma de un antígeno, sino de un anticuerpo, término empleado para definir las proteínas producidas por los linfocitos B para combatir las infecciones. Este anticuerpo tiene la propiedad de imitar la morfología del antígeno del patógeno, adquiriendo también su forma tridimensional y de esta manera logra inducir inmunidad. El primer paso para desarrollar este tipo de vacunas es construir un anticuerpo contra el antígeno del organismo que produce la enfermedad. Este anticuerpo se conoce como anticuerpo idiotípico. Luego, se inyecta a un animal que presentará una respuesta inmune contra éste, produciendo los anticuerpos anti-idiotípicos. Debido a que presenta un epítopo similar al antígeno objetivo, estos anticuerpos pueden actuar como vacuna. En la **Figura 3.4** se muestra el mecanismo de desarrollo de este tipo de vacunas.

Figura 3.4. Vacunas anti-idiotipo.

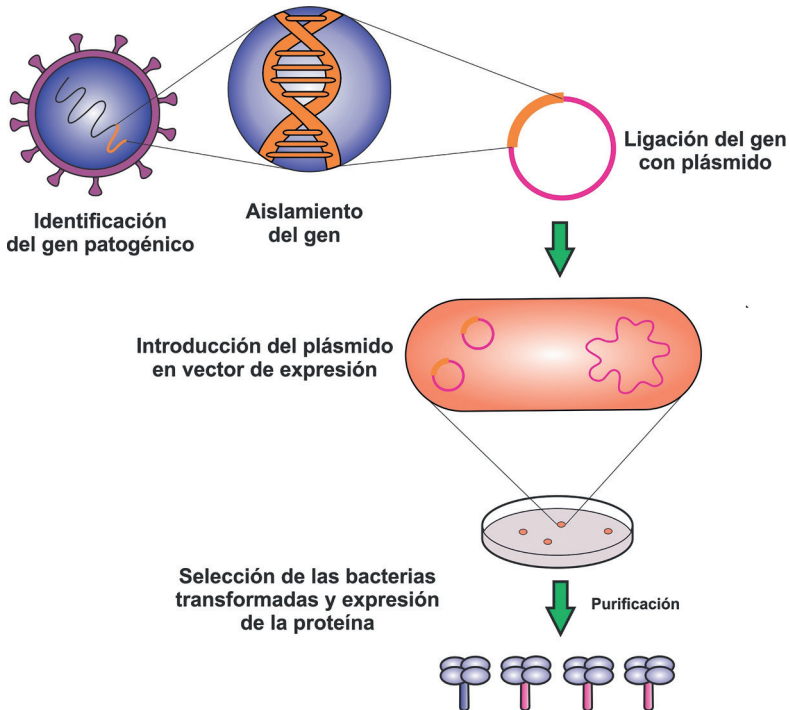


Fuente: elaboración propia.

Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes

Mediante la tecnología de ADN recombinante se han generado numerosos antígenos que han demostrado eficacia como vacunas. Gracias a la tecnología del ADN recombinante, definida como el conjunto de técnicas que permiten modificar el genoma de los organismos, es posible “pasar o transferir” genes entre organismos que no están relacionados. Empleando esta metodología se logra aislar genes que contienen la información de proteínas de interés, generalmente ubicadas en la superficie del organismo patógeno, que participan en el mecanismo de infección y que son reconocidas por el sistema inmune, para producir estas proteínas en un sistema de expresión a las que se les buscará desarrollar la vacuna (**Figura 3.5**).

Figura 3.5. Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes.



Fuente: elaboración propia.

Para producir en las células este tipo de vacunas se utilizan sistemas biológicos como bacterias, levaduras o plantas; siendo las bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) las más utilizadas por su rápido crecimiento y menor complejidad del genoma. A pesar de su amplio uso, las bacterias presentan limitantes para la producción de proteínas de origen eucarionte, debido a que, como células procariotas, no contienen maquinaria para realizar algunas modificaciones requeridas (postraduccionales) en las proteínas que producen las eucariotas, necesarias para producir las proteínas funcionales. Las levaduras, son capaces de realizar las modificaciones postraduccionales, pero su crecimiento no es tan rápido como el de las bacterias y su cultivo y manejo presentan mayores complicaciones que las bacterias, lo que hace que el costo de producción de las proteínas recombinantes sea más elevado ¹. A pesar de que tienen una tasa de crecimiento más lento de los tres sistemas, las plantas representan un sistema de producción de bajo costo y con capacidades de desarrollo a gran escala, además de permitir algunas modificaciones postraduccionales propias de los organismos eucariotas.

El avance en la producción de este tipo de vacunas se ha centrado empleando principalmente bacterias y plantas, como se presenta a continuación:

-Producción en bacterias: existe una amplia variedad de bacterias potencialmente útiles que pueden ser empleadas como vectores. El material genético que contiene información de la estructura del antígeno, se introduce en las bacterias mediante plásmidos, que son moléculas de ADN circular con capacidad de expresarse y autorreplicarse en las células bacterianas ⁸. Los plásmidos son capaces de permanecer en el interior de la bacteria o vector de expresión y posteriormente ser reconocidos por la maquinaria de las células para formar la proteína antigénica.

-Producción en plantas: la tecnología del ADN recombinante se puede emplear para introducir en el genoma de plantas el gen que codifica una proteína antigénica de interés y expresarla en las células vegetales, para su uso como vacuna. La mayoría de las proteínas recombinantes empleadas como vacunas producidas en plantas se obtienen mediante la tecnología de transgénesis. Esta metodología ofrece muchas ventajas potenciales para generar compuestos farmacéuticos de importancia en medicina clínica, frente a otros métodos empleados hasta la fecha, que utilizan biorreactores con cultivos microbianos para la producción de proteínas recombinantes ¹.

Las principales ventajas de la producción de antígenos recombinantes en plantas son:

- Un mayor rendimiento en la producción o eficacia frente a los sistemas clásicos de producción mediante microorganismos.
- La facilidad de cultivo de las plantas como sistemas de expresión de proteínas, debido a que ocupan menor espacio y requieren menor cuidado.
- La posibilidad de dirigir la expresión del antígeno en ciertas partes de la planta, facilitando la purificación del mismo ⁹.

-Producción de anticuerpos en plantas: además de permitir la producción de proteínas antigénicas, las plantas han demostrado ser sistemas versátiles en la producción para muchas formas de anticuerpos, principalmente los de las clases IgG e IgA. Los anticuerpos recombinantes producidos en plantas se denominan generalmente planticuerpos (*plantibodies* en inglés) y tienen aplicaciones directas en la producción de vacunas humanas ¹⁰. La mayoría de los planticuerpos se expresan en plantas de especies que pueden ser cosechadas varias veces al año, como el tabaco, las papas, la soya, alfalfa, arroz y trigo. La

mayor desventaja de la utilización de plantas transgénicas para la producción de anticuerpos radica en la purificación de la proteína, que puede encarecer el proceso de producción. Adicionalmente, la capacidad inmunogénica de los anticuerpos puede disminuir o perderse totalmente, si sufren modificaciones que se producen en las células eucariotas en forma natural. La posible actividad alérgica de los anticuerpos producidos en plantas para los seres humanos es otro de los problemas que se están estudiando actualmente.

Vacunas génicas

La característica principal de estas vacunas es que no se administra al paciente el antígeno que induce la respuesta inmune, sino el gen que lo codifica, logrando así que las mismas células del hospedero produzcan el antígeno objetivo. Al expresar la proteína antigénica, se genera la respuesta inmune de tipo humoral y celular, igual que en las vacunas vivas atenuadas. Una de las principales ventajas de este tipo de vacuna es que se pueden administrar varios antígenos a la vez, simplemente agregando más secuencias de genes antigénicos ¹. Sin embargo, la capacidad de generación de una respuesta humoral es menor que la de las vacunas clásicas inactivas y de proteínas inmunizantes obtenidas por recombinación genética. En estas vacunas existe la posibilidad de producir respuestas inmunes frente al ADN o autoinmunidad causada por la expresión continua del antígeno. Otra limitante en este sistema es baja eficiencia de la inserción del gen, llamada Transfección *in vivo* en las células del paciente, por lo que se necesita la utilización de vehículos biológicos - llamados vectores - que serán mostrados a continuación:

-**Vacunas de vectores virales:** los virus son organismos especializados en insertar su material genético en las células. Después de replicar su ácido nucleico aprovechan la maquinaria de éstas para replicarse. Esta habilidad puede ser utilizada, modificando su capacidad patogénica e

insertándole genes de interés en el genoma, pero conservando su mecanismo infectivo adecuadamente. El principal inconveniente de estas vacunas es que la inmunogenicidad de este vector recombinante está relacionada directamente con la capacidad de replicarse dentro del organismo objetivo, razón por la cual los vectores más eficientes son los que presentan un mayor potencial patogénico ¹. Otra desventaja es que se puede generar una respuesta inmune frente al vector, lo que llevaría a una neutralización de este y a una falla en la producción de las proteínas inmunogénicas recombinantes. Si el paciente fue previamente expuesto (una primera infección con el mismo virus) con el virus utilizado como vector, la respuesta inmune será potente y llevará a la falla de la nueva vacuna.

Una opción para evitar el uso de virus atenuados y así elevar las probabilidades de éxito en la inmunización, es el uso de vacunas de partículas similares a virus (VLP por sus siglas en inglés), también llamadas pseudoviriones. El principio utilizado para este método es la capacidad intrínseca de las proteínas más externas de los virus de auto ensamblarse. Los VLPs son similares a las proteínas de los virus reales del punto de vista estructural y morfológico, pero con la gran ventaja que no contienen ADN viral por lo que no son infecciosos ¹¹. Un ejemplo típico de este tipo de vacunas es la desarrollada contra el Virus del Papiloma Humano, el cual es el causante del Cáncer de Cuello Uterino.

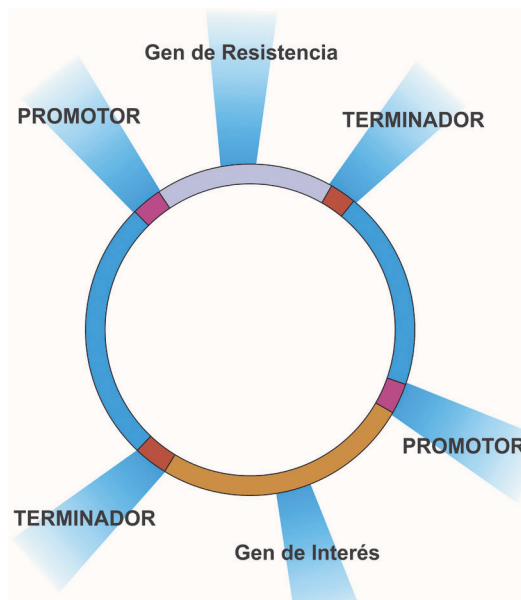
-***Vacunas de vectores bacterianos***: este tipo de vacunas presentan un potencial de administración oral, logrando una inducción en la respuesta inmune de la mucosa, clave para las enfermedades producidas por patógenos cuya vía de entrada es por esta vía ¹². Sin embargo, presentan el mismo problema de los vectores virales frente a una memoria inmunogénica, además de la posible reversión hacia la patogenicidad. Adicionalmente se presenta la dificultad de mantener la estabilidad del ADN recombinante insertado ¹.

-**Vacunas de ADN desnudo:** consisten en plásmidos cuya principal característica es que pueden replicarse independientemente del genoma de la célula. Para poder reconocer las células que los tengan, presentan genes de resistencia a antibióticos, permitiendo así su crecimiento en medios que contengan el antibiótico al cual son resistentes. Los plásmidos que forman parte de las vacunas de ADN contienen un gen codificante para una proteína antigénica, un promotor generalmente viral, un terminador que permite la expresión del gen en células de mamíferos (estos dos le “indican” a la célula donde hay un gen codificante) y un gen de resistencia a antibiótico que permite la selección del plásmido durante su producción en bacterias ¹³. Con esta metodología es posible, además, la expresión de dos o más genes que se controlan bajo una sola secuencia reguladora. Estos plásmidos se denominan bicistrónicos, se distinguen de los conocidos como vectores de expresión múltiple, que contienen múltiples genes con promotores y señales de terminación individuales para cada uno de ellos ¹. Pese a que los ensayos previos con animales demostraron que las vacunas génicas eran capaces de inducir respuestas humorales y sobre todo celulares, en humanos la inmunogenicidad de estas vacunas es mucho menor.

Para mejorar la inmunogenicidad se están perfeccionando una serie de tecnologías tales como el uso de adyuvantes clásicos o genéticos, la combinación con otras vacunas, o la modificación del plásmido en el caso de vacunas de ADN desnudo. Por otro lado, la ruta de aplicación, dosis y la posible re-inmunización, son factores que influyen en la potencia y naturaleza de la respuesta inmune resultante de la administración de la vacuna génica. Aunque la mayoría de las vacunas de ADN que se encuentran actualmente en ensayos clínicos se administran mediante inyección intramuscular o intradérmica, se buscan métodos de administración alternativos, como la “pistola de genes” o bombardeo de partículas de oro cubiertas de ADN, que permite

la incorporación del ADN a una mayor población celular ¹⁴. Sin embargo, debido a la limitada capacidad de adsorción de estas partículas, la cantidad de plásmido que se introduce en las células es muy baja. Los plásmidos, pese a tener gran variedad según su uso, presentan casi siempre la misma estructura (**Figura 3.6**), estando conformados por un gen de resistencia – que es el que ayuda para identificar que la transformación genética fue exitosa – y el gen de interés que se desea expresar. Rodeando a los genes se encuentra un promotor – el que permite la expresión de la proteína – y un terminador – que le indica el fin del gen -. Tanto el promotor como el terminador deben ser específicos para el organismo en el que se desea expresar la proteína.

Figura 3.6. Estructura de un plásmido.



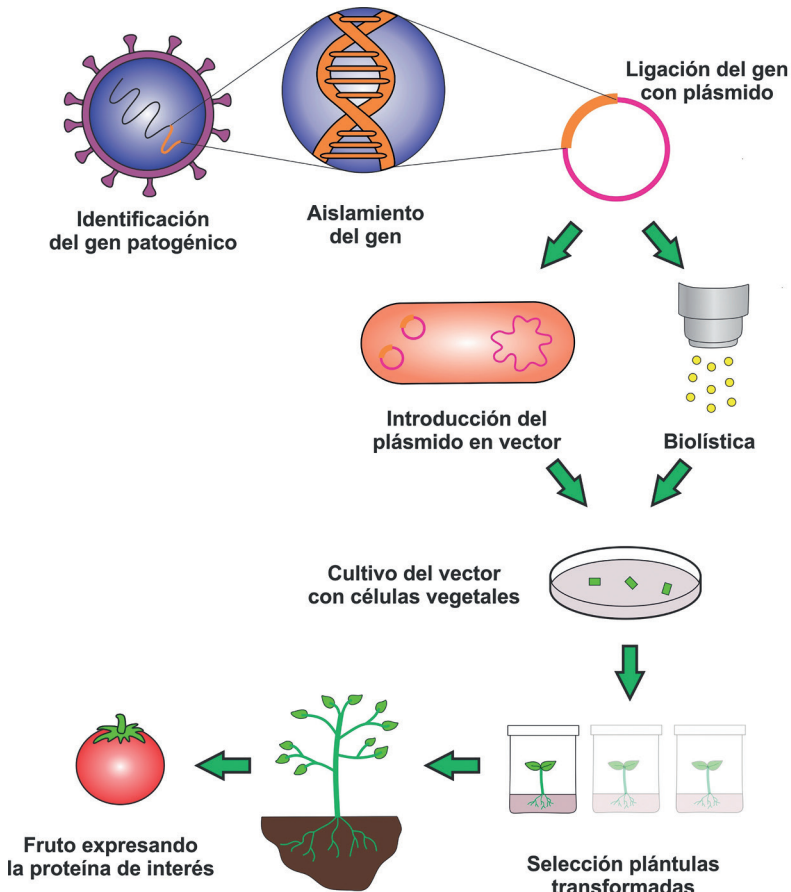
Fuente: elaboración propia.

Vacunas comestibles

Este tipo de vacunas consiste en antígenos producidos en plantas que han sido modificadas por ingeniería genética, para llevar en su genoma la información necesaria para producir una

proteína antigénica del patógeno y su proceso de producción se presenta en la **Figura 3.7**. La construcción del plásmido es similar a otras vacunas, diferenciándose en que se pueden utilizar dos metodologías para la transformación de la planta: 1) uso de vectores (que generalmente son bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*) y 2) biolística, que utiliza partículas de oro unidas al plásmido que son “disparadas” a la planta. Luego de la transformación debe regenerar y seleccionarse las plántulas transformadas – se detectan gracias al gen de resistencia – que serán llevadas a campo para la producción de sus frutos.

Figura 3.7. Etapas del desarrollo de vacunas comestibles.



Fuente: elaboración propia.

Estas plantas, que son conocidas como transgénicas, se pueden cultivar de manera natural para más adelante usar sus tejidos - preferiblemente frutos - como vacuna comestible tanto para humanos como para animales ¹⁵. Una de las principales ventajas de este tipo de vacunas es su fácil administración y la capacidad de generar una respuesta inmune a nivel de mucosas. Este sistema de vacunación es de gran aplicación en las personas que padecen de belonefobia o miedo a las agujas. Sin embargo, dado que su administración es vía oral, existe el riesgo de la posible degradación de los antígenos en el estómago e intestino antes que puedan inducir la respuesta inmune ¹. El procesamiento de los alimentos previa ingestión, puede también afectar la estructura del antígeno, razón por la que las vacunas comestibles sólo podrían emplearse en alimentos que puedan ser consumidos en su forma fresca. Teniendo en cuenta la tasa de absorción, los alimentos que contienen el antígeno, deben contener alta concentración y en forma soluble, para que la vacunación sea efectiva al ingerir bajas cantidades del alimento ¹⁶. Esta tecnología de desarrollos de vacunas también se podría aplicar a otros organismos vivos, como es el caso de los animales ¹.

Ventajas de las vacunas producidas mediante biotecnología

Las vacunas modernas presentan diferentes características que traen consigo ventajas y desventajas, que han sido presentados a lo largo del capítulo, y que a modo de resumen se presentan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Principales ventajas y desventajas de las vacunas modernas.

Tipo de vacuna	Ventajas	Desventajas
Vacunas atenuadas mediante modificación genética	<ul style="list-style-type: none"> -Presentan respuesta humoral y celular. -No requieren de adyuvantes. -Funcionamiento con pocas cantidades del patógeno 	<ul style="list-style-type: none"> -Riesgos de seguridad por posible activación de patogenia. -En el caso de los virus, posibilidad de modificaciones genéticas
Vacunas de péptidos sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> -No requieren adyuvantes. -No hay administración directa del patógeno 	<ul style="list-style-type: none"> -Se necesita una buena caracterización del antígeno -No todos los péptidos imitan las formas conformacionales nativas
Vacunas anti-idiotipo	<ul style="list-style-type: none"> -No requieren adyuvantes. -No hay administración del patógeno. -Eficiencia contra los patógenos que tienden a mutar mucho como los virus 	<ul style="list-style-type: none"> -No presenta respuesta celular -Respuesta inmune menos duradera -Necesidad de administración de dosis constantes
Vacunas de péptidos recombinantes	<ul style="list-style-type: none"> -Potente respuesta humoral. -Han demostrado buena eficiencia -No hay administración directa del patógeno 	<ul style="list-style-type: none"> -Algunos péptidos no logran configuración nativa. -Baja respuesta celular. -Requieren de dosis de refuerzo. -Baja estabilidad por su conformación. Requieren de adyuvantes.
Vacunas génicas	<ul style="list-style-type: none"> -Respuesta humoral y celular. -Buena estabilidad térmica -No hay riesgos de seguridad -Posibilidad de una vacunación neonatal -Se pueden administrar varios antígenos en una misma vacuna -Fácil producción -No requieren adyuvantes 	<ul style="list-style-type: none"> -Respuesta celular insuficiente. -Existe la posibilidad de requerir dosis de refuerzo -Baja eficiencia cuando se dedica transfectar <i>in vivo</i> -Respuestas inmunitarias frente al ADN, inmunotolerancia y autoinmunidad -Poco control en la expresión de los antígenos -Respuesta inmune pobre en la mucosa -Alto costo de producción. -Desconocimiento de su poder inmunogénico a largo plazo (faltan estudios)
Vacunas comestibles	<ul style="list-style-type: none"> - Seguridad. -Fuerte inmunidad generada en las mucosas. -Fácil administración. 	<ul style="list-style-type: none"> -Desarrollo costoso y demorado -Requiere de altos niveles de expresión del antígeno en el tejido vegetal.

Adaptada de Ellis, R et al. ²

Proceso para la evaluación y aprobación de las vacunas

Las autoridades que regulan el desarrollo de vacunas han establecido criterios rigurosos para los ensayos previos a su aprobación. Además de los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio, la potencial vacuna debe someterse a cuatro etapas de evaluación ¹⁷:

1. Investigación pre-clínica: se refiere a los ensayos realizados en el laboratorio y que prueban la pureza de la vacuna. Además, se evalúa su seguridad y eficacia en

animales. En esta etapa se espera que la inmunización sea efectiva y no cause reacciones adversas en el huésped, como puede ser por la dosis administrada y la actividad biológica adecuada. Esta etapa tiene una duración aproximada de 3.5 años en los que se evalúa gran cantidad de moléculas.

2. Estudios clínicos en humanos que, a su vez, se dividen en tres fases:

- **Fase I:** el producto es administrado a un pequeño grupo de voluntarios (20-100) que son considerados sanos para la enfermedad objetivo. Los ensayos en esta fase tienen como propósito evaluar la seguridad, dosis adecuada y potencia de la vacuna. La duración de esta fase es de 1.5 años.

- **Fase II:** en ésta se profundizan los estudios de la fase anterior, sobre todo en el análisis de la respuesta inmune y efectos colaterales a una mayor cantidad de voluntarios (100-500). La duración de esta fase es de 2 años.

- **Fase III:** El producto es administrado a una muestra de voluntarios mayor (1000-5000). En esta fase se confirma la efectividad y se hace un seguimiento a largo plazo de las reacciones adversas. La duración de esta fase es de 3.5 años. Para esta última etapa los compuestos evaluados se reducen significativamente.

3. Período de licencia: se refiere a los procedimientos legales y administrativos a los cuales se someten los resultados obtenidos en las etapas anteriores para la aprobación y registro de la vacuna. En esta etapa se espera tener al menos un compuesto que se considera como aprobado.

4. Relevamiento post-licencia: tiene como objetivo seguir evaluando la vacuna durante algunos años posteriores a la comercialización. Se estudian los cambios en la incidencia de la enfermedad y en su transmisión. También, se registran los casos de reacciones indeseables.

Vacunas aprobadas producidas por biotecnología y vacunas en estudio

Debido a que una vacuna mal elaborada podría causar la muerte de muchas personas o animales, los candidatos a vacunas se deben evaluar continuamente. A continuación, se presentan algunos ejemplos de vacunas que se encuentran en los diferentes procesos para conseguir la aprobación o que ya se encuentran disponibles comercialmente:

Tabla 3.3. Lista de vacunas aprobadas, en proceso de aprobación o comercialización.

Tipo de vacuna	Enfermedad Objetivo	Producto	Sistema de expresión	Organismo objetivo	Estado de desarrollo
Vacunas atenuadas mediante modificación genética	Dengue ¹⁸	Virus	Virus del dengue	Humanos	Fase II
	Enfermedad de Newcastle	Virus de baja virulencia	Virus de la enfermedad de Newcastle	Animales (aves de corral)	Comercial
Vacunas de péptidos sintéticos	Hepatitis B ¹⁹	Péptido antigénico	Síntesis química	Humanos	Comercial
	Fiebre aftosa ²⁰	Péptido antigénico	Síntesis química	Animales (ganado)	Investigación pre-clínica
Vacunas anti-idiotipo	Neuroblastoma, un tipo de cáncer ²¹	Anticuerpo anti-idiotipo	Animales (ratones)	Humanos	Fase I
	Mieloma múltiple ²²	Anticuerpo anti-idiotipo	Animales	Humanos	Fase II
Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes	Ébola ²³	Planticuerpo contra el virus	Plantas (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	Humanos	Fases I y II
	Antrax ²⁴	Péptidos recombinantes	Bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	Animales (caprinos)	Investigación pre-clínica
Vacunas génicas	Malaria ²⁵	ADN desnudo	Bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	Humanos	Fase I
	Influenza Aviar ²⁶	ADN desnudo	Animales (aves de corral)	Animales (aves de corral)	Fase I
Vacunas comestibles	Rabia ²⁷	Glicoproteína de superficie	Plantas (espinaca, tabaco)	Humanos	Fase I
	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino ²⁸	Proteína de superficie	Plantas (banano)	Animales (porcinos)	Investigación pre-clínica

Fuente: elaboración propia.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La vacunación estimula la activación del sistema inmune y lo prepara para la llegada de agentes capaces de producir enfermedad. Por esta razón las vacunas previenen enfermedades infecciosas que pueden ser letales. Adicionalmente las vacunas evitan las secuelas, (como el cáncer en el caso de hepatitis) producidas por algunas enfermedades infecciosas a largo plazo. Los programas masivos de vacunación protegen a las personas

vacunadas y a las que no lo están, al evitar la transmisión de la enfermedad entre personas permitiendo el control de la enfermedad. Los esquemas de vacunación establecidos mediante los programas de salud pública han demostrado su éxito en prevenir enfermedades con un bajo costo y ante todo es seguro.

Las vacunas aprobadas que componen el esquema actual de inmunizaciones han demostrado su eficacia, que depende de la capacidad de desencadenar la respuesta inmune protectora e inducir la producción de células de memoria contra el agente causal de una enfermedad en el organismo, siendo inocuas, es decir que no afectan el organismo de la persona vacunada. Entre otras características que debe presentar una vacuna ideal encontramos la inducción de células de memoria capaces de persistir por largos periodos de tiempo, facilidad para su administración, por ejemplo, por vía oral, y la necesidad de pocas dosis para lograr la protección deseada. Para el establecimiento de una vacuna y su adopción en el esquema de vacunación de la población general, además de los factores mencionados anteriormente de seguridad, eficacia e inocuidad, se deben cumplir algunos requisitos como bajo costo de la producción de la vacuna, condiciones de almacenamiento y transporte simples, que no requieran equipos o condiciones especiales. Lo que asegura su utilización a mayor número de personas y en todas las regiones de un país.

Los avances de la Biología Molecular y la Biotecnología han permitido el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación basadas principalmente en la Ingeniería Genética. La manipulación del material genético de los microorganismos patógenos y el desarrollo de técnicas que favorecen la alta producción de proteínas recombinantes empleando sistemas de expresión vivos, han permitido el desarrollo de vacunas a menor costo, con mayor grado de seguridad, mayor eficacia, facilidad de producción e incremento en la cobertura de la vacunación. Muchas de estas estrategias han permitido el desarrollo de vacunas para uso tanto a nivel humano como animal.

La Universidad Tecnológica de Pereira en el marco del proyecto “Desarrollo de capacidades científicas y tecnológicas aplicadas a los sectores de la salud y la agroindustria en el departamento de Risaralda” financiado por el Sistema General de Regalías, adelantó trabajos tendientes a evaluar el potencial de la planta conocida como morera (*Morus alba*), como una plataforma potencial para expresar una proteína importante del Virus de la Enfermedad de Newcastle denominada Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). El virus de la Enfermedad de Newcastle es una amenaza a nivel nacional para el sector avícola y ha sido considerado una prioridad nacional de interés social, por ser una amenaza para la seguridad alimentaria del país. Durante el desarrollo del proyecto, se logró transformar mediante agroinfiltración, hojas de *Morus alba* con un plásmido que contenía la secuencia de la proteína HN (de un aislado de origen colombiano) y detectar la expresión transitoria de la proteína HN. Estos resultados sugieren que las hojas agroinfiltradas de *Morus alba* pueden ser empleadas como plataforma para la expresión de proteínas heterólogas. Finalmente, es importante indicar que los sistemas de expresión en plantas pueden usarse para el desarrollo de vacunas contra agentes virales como virus ZIKA y Chikungunya²⁹ y por qué no, contra agentes infecciosos más recientes como el SARS-CoV-2, responsable del desarrollo del COVID-19.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lopez M, Mallorquín P, Pardo R, Vega M. Vacunas de nueva generación, informe de vigilancia tecnológica. Genoma-España. Madrid. España. 2004; 13:15-6.
2. Ellis R, Rappuoli R, Ahmed S. Technologies for making new vaccines. Plotkin's Vaccines. 4th ed. Elsevier. Philadelphia, Pa. 1177-97. 2004.
3. Ellis RW. New technologies for making vaccines. Vaccine. 1999; 17(13-14):1596-604.
4. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas. Vacunas. 2002; 3(1):29-33.
5. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85(15):5409-13.
6. Hardy B, Raiter A. A mimotope peptide-based anti-cancer vaccine selected by BAT monoclonal antibody. Vaccine. 2005;23(34):4283-91.
7. McCarthy H, Ottensmeier CH, Hamblin TJ, Stevenson FK. Anti-idiotypic vaccines. Br. J. Haematol. 2003; 123(5):770-81.
8. Brown TA. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. 7th Ed. John Wiley & Sons. Oxford, Univet Kindom. 2016.
9. Ma JK, Drake PM, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat. Rev. Genet. 2003;4(10):794.
10. Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. Curr. Opin. Biotechnol. 2002; 13(2):161-6.

11. Rybicki EP. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8(5):620-37.
12. Medina E, Guzmán CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine.* 2001; 19(13):1573-80.
13. Gregersen J-P. DNA vaccines. *Naturwissenschaften.* 2001;88(12):504-13.
14. Owen J, Punt J, Stranford S. *Kuby immunology.* 7th Ed. WH Freeman New York; US. 2013.
15. Arntzen C. Plant-made pharmaceuticals: from 'Edible Vaccines' to Ebola therapeutics. *Plant Biotechnol. J.* 2015;13(8):1013-6.
16. Shahid M, Shahzad A, Sahai A. *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants.* 29th Ed. Springer. 225-52. 2013.
17. Delgado Fernández M, Cuevas Fiallo A. Guía de la calidad para el registro de vacunas terapéuticas contra el cáncer. *Ingeniería Industrial.* 2007; 28(2):1-7.
18. Kirkpatrick BD, Whitehead SS, Pierce KK, Tibery CM, Grier PL, Hynes NA, et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8(330):330ra36-ra36.
19. Krebber WJTA, Kessler JH, Melief CJM, Kwappenberg KMC. Synthetic long peptides (slp) for therapeutic vaccination against hepatitis b virus infection. Google Patents; 2017.
20. Zhang Z, Pan L, Ding Y, Zhou P, Lv J, Chen H, et al. Efficacy of synthetic peptide candidate vaccines against serotype-A foot-and-mouth disease virus in cattle. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(3):1389-98.

21. Cacciavillano W, Sampor C, Venier C, Gabri MR, Dávila MT, Galluzzo ML, et al. A Phase I Study of the Anti-Idiotypic Vaccine Racotumomab in Neuroblastoma and Other Pediatric Refractory Malignancies. *Pediatr. Blood Cancer*. 2015; 62(12):2120-4.
22. Qazilbash MH, Stadtmayer EA, Baladandayuthapani V, Lin H, Tross BM, Honhar M, et al. Randomized Phase II Trial of Combination Idiotype Vaccine and Anti-CD3/Anti-CD28 Costimulated Autologous T Cells in Patients with Multiple Myeloma Post-Autotransplantation. *Blood*. 2016; 28 (22): 4548.
23. Loh H-S, Green BJ, Yusibov V. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. *Curr. Opin. Virol*. 2017; 26:81-9.
24. Koehler SM, Buyuk F, Celebi O, Demiraslan H, Doganay M, Sahin M, et al. Protection of farm goats by combinations of recombinant peptides and formalin inactivated spores from a lethal *Bacillus anthracis* challenge under field conditions. *BMC Vet. Res*. 2017; 13(1):220.
25. Spearman P, Mulligan M, Anderson EJ, Shane AL, Stephens K, Gibson T, et al. A phase 1, randomized, controlled dose-escalation study of EP-1300 polyepitope DNA vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria administered via electroporation. *Vaccine*. 2016; 34(46):5571-8.
26. DeZure AD, Coates EE, Hu Z, Yamshchikov GV, Zephir KL, Enama ME, et al. An avian influenza H7 DNA priming vaccine is safe and immunogenic in a randomized phase I clinical trial. *NPJ Vaccines*. 2017; 2(1):15.
27. Hirlekar R, Bhairy S. Edible vaccines: An advancement in oral immunization. facilities. *Asian J Pharm Clin Res [Internet]* 2017; 10(2):71-7.

28. Shahaid N, Daniell H. Plant based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases. *Plant Biotechnol. J.* 2016; 14(11):2079-2099.

29. Cardona Ospina JA, Sepúlveda Arias JC, Mancilla Estacio L, Gutierrez-López LG. Plant expression systems, a budding way to confront chikungunya and Zika in developing countries?. *F1000Research.* 2016, 5:2121

Aplicaciones clínicas de las células madre y de productos de células madre

Carlos Alberto Isaza Mejía, Julieta Henao Bonilla, Jainer Enrique Aranzazu O. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Centro de Células Madre y Biotecnología (Cemab).

Fundamentos biotecnológicos

El término “regeneración” se refiere a la capacidad que tiene el organismo de tratarse y curarse a sí mismo. Los tres grandes componentes de la medicina regenerativa son las células madre, los factores de crecimiento y la matriz extracelular (conocida como andamiaje o scaffold). En este capítulo revisaremos los fundamentos biotecnológicos, ético-legales y clínicos de la medicina regenerativa basada en las células madre, los factores de crecimiento y los secretomas. En todos los tejidos del cuerpo las células madre residen en lugares específicos y microambientes altamente organizados, conocidos como “nichos de células madre”, donde ellas se relacionan entre sí y con otras células del entorno. La mayor parte del tiempo las células madre del nicho se mantienen en un estado quiescente y así evitan su agotamiento prematuro e innecesario, pero cuando ocurre una señal de alarma ellas se activan, para dar origen a cualquier otra célula del cuerpo y reemplazar a las que se van muriendo, o liberar al medio moléculas que contribuyen en la reparación de daños provocados por enfermedades, traumas y el mismo fenómeno de envejecimiento¹.

Estas células poseen al menos tres características especiales: pueden conservarse inmodificables y producir indefinidamente células madre idénticas, o entran en un proceso de diferenciación que finalmente produce el tipo de célula constitutiva del correspondiente tejido. Ambos fenómenos

ocurren en forma natural a lo largo de la vida del organismo, pero también se pueden replicar en el laboratorio, ya que a partir de una pequeña muestra de tejido se pueden aislar *in vitro* células madre, multiplicarse, conservarse y diferenciarse en el tipo de célula que se desee. La tercera propiedad biológica destacable es su capacidad migratoria; el llamado mecanismo *homing* se refiere a la capacidad de estas células para llegar al tejido dañado, en respuesta a señales provenientes del tejido lesionado, captadas por receptores específicos existentes en las células madre ²⁻⁴.

Un individuo puede recibir células madre de él mismo (trasplante autólogo) o de otra persona (trasplante heterólogo o alogénico). La fuente autóloga es por supuesto la más compatible y segura, pero no es superior en resultados al trasplante alogénico, el cual tiene la ventaja de que las células se pueden obtener de tejidos fetales o donantes jóvenes y saludables, producirse a escala y almacenarse en bancos en cantidades suficientes para su uso inmediato, siempre que presente inmunohistocompatibilidad.

En forma sencilla las células madre se clasifican según su origen en las que provienen del embrión, del feto o de un organismo adulto. También se pueden categorizar según su capacidad de diferenciación, en células madre totipotentes, pluripotentes o multipotentes, según que tengan la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula, en células del mismo origen embrionario, o sólo en células de tejidos específicos (Ver Capítulo Uno, Células madre: generalidades). Las células madre adultas se encuentran en los tejidos y la mayoría de ellas generan linajes limitados, esto es, las células madre hematopoyéticas pueden dar origen solamente a células sanguíneas, y las neurales diferenciarse en neuronas y células gliales. El término "*Mesenchymal Stromal Cell*" (MSC, originalmente llamada célula madre mesenquimal) se refiere a una subpoblación específica de células madre adultas, que cumplen unos criterios mínimos establecidos por la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), relacionados con sus marcadores de superficie, adherencia y potencial de diferenciación. Las MSC han

sido consideradas como multipotentes, capaces de diferenciarse en tejidos procedentes del mesodermo, pero estudios recientes han encontrado que dichas células también pueden diferenciarse en otros tipos celulares que no tienen origen mesodérmico, tales como neuronas y células beta del páncreas, lo cual sugiere que las MSC son células madre pluripotentes. Dichas células pueden aislarse prácticamente de todos los tejidos del cuerpo, pero existen grandes diferencias en las condiciones logísticas para su obtención y en el rendimiento en células aisladas de los distintos tejidos ^{5,6}.

Un tipo de célula madre que se encuentra “a mitad del camino” entre las embrionarias y las adultas son las que provienen de los tejidos placentarios, en particular del cordón umbilical, capaces de diferenciarse en células del ectodermo, mesodermo y endodermo, superando muchas de las limitaciones de las adultas: son fáciles de obtener (sin causar dolor, sin mayores costos, de tejidos que son rutinariamente desechados y sin las restricciones éticas de otras fuentes), de cultivar y de conservar en dosis óptimas para trasplantes ⁷.

Aun así, las mayores restricciones para las células madre adultas son su limitado potencial de expansión y de diferenciación en los linajes celulares que se requieren. Esta restricción ha sido superada gracias al desarrollo de nuevas técnicas que permiten la “reprogramación”, que hace posible convertir una célula adulta en cualquier otra célula. La reprogramación se logra de dos maneras: i) la célula se puede transdiferenciar en otro tipo de célula con la ayuda de factores de transcripción; dichos factores son fácilmente sintetizados, pueden ser almacenados, carecen de inmunogenicidad, atraviesan fácilmente las membranas celulares y sus efectos biológicos son rápidos, reversibles y controlables; ii) la célula se puede desdiferenciar con inductores, tales como los 4F (OCT4, KLF4, SOX2, y c-Myc), para inducir un rejuvenecimiento epigenético y dar origen a las llamadas iPSCs (*Induced Pluripotent Stem Cell*), con características de las células embrionarias. La reprogramación de células somáticas a iPSC revierte

marcadores de senilidad (como el tamaño de los telómeros, el perfil de expresión de genes, los niveles de estrés oxidativo y el metabolismo mitocondrial) a niveles indistinguibles de una célula embrionaria; por tanto, la conversión de células somáticas diferenciadas en células de tipo embrionarias demuestra que la edad y la función celular no son variables inmodificables y que es posible recuperar funciones celulares que se fueron perdiendo en el proceso de envejecimiento; estas conquistas de la medicina regenerativa refuerzan la idea de que el envejecimiento no es un proceso irreversible. El siguiente ejemplo ilustra las diferencias entre las dos estrategias de reprogramación: las neuronas transdiferenciadas a partir de fibroblastos retienen el perfil molecular propio de su edad, mientras que las neuronas derivadas de iPSC tienen un fenotipo rejuvenecido. Esta técnica supera los dilemas de carácter ético y las restricciones de orden legal que ha tenido la investigación en células de origen embrionario y abre posibilidades de diferenciación a gran escala, ampliando el espectro de las indicaciones clínicas. Desde luego, no se pueden ignorar asuntos críticos de seguridad relacionados con la mutagenicidad y la carcinogenicidad, entre otros ^{2,8}.

Aspectos éticos y legales

Las interesantes características descritas de las células madre, que constituyen el punto de partida del desarrollo del organismo humano y a partir de las cuales se originan más de 200 tipos de células, han resultado muy atractivas para la comunidad científica y médica. Pero también han provocado en el imaginario de las personas un entusiasmo excesivo, en particular porque esta nueva terapia involucra pacientes que no tienen otras opciones de tratamiento y están desesperados. Este fenómeno ha sido aprovechado por toda clase de inescrupulosos para ofrecer la medicina regenerativa como la gran panacea, desconociendo que en muchas áreas el trasplante de células madre aún se encuentra en fase experimental, que el paso a la clínica enfrenta grandes desafíos y, si bien ha habido un crecimiento exponencial de los

estudios clínicos, los resultados muestran desde efectos nulos o muy modestos, hasta franco beneficio, superior a las terapias existentes⁹.

Los fracasos reportados no deberían eclipsar el hecho de que muchos pacientes se han beneficiado con la medicina regenerativa y, aunque se deben tomar medidas para reducir el riesgo a un mínimo, la única manera de eliminar completamente el riesgo es detener la investigación y, en consecuencia, el progreso médico; así que la aceptabilidad del riesgo también depende de la magnitud del beneficio y podría ser no ético privarse de estas terapias en enfermedades severas, sin opciones terapéuticas disponibles.

Los pacientes pueden acceder a las células madre por la vía de un producto comercializado, haciendo parte de ensayos clínicos, aceptando un tratamiento no aprobado (en el marco de la “excepción especial hospitalaria”, “*off-label*” o “uso compasivo”), o por reclutamiento directo a través del internet, de entidades comerciales cuya actividad no tiene supervisión. Cualquiera que sea la ruta de ingreso del paciente a la terapia, en cumplimiento de su “derecho al tratamiento” lo mínimo exigible es que la terapia experimental haya superado los estudios preclínicos y la fase 1 de seguridad en humanos⁹. Se sabe que una excesiva regulación puede asfixiar la innovación, pero la insuficiente regulación puede permitir la oferta de terapias inseguras o inefectivas; el gran desafío entonces radica en proteger la innovación y facilitar los avances terapéuticos, mientras se garantiza la seguridad y la efectividad¹⁰.

Puesto que los avances científicos en el campo de la medicina regenerativa ocurren continuamente, con frecuencia los procesos regulatorios se quedan a la zaga del desarrollo de estas terapias, con lamentables consecuencias, particularmente si se trata de enfermedades que ponen en peligro la vida. Cabe preguntarse entonces si la normatividad existente se ajusta a las características de las innovaciones y si quienes son responsables de aplicar nuevas

regulaciones entienden suficientemente la nueva tecnología ^{9,11}. El hecho es que, con respecto a la medicina regenerativa, a nivel internacional no hay armonización en la normatividad y que existen grandes fisuras en la interpretación de la misma. En un esfuerzo por poner orden, las guías de la *International Society of Stem Cell Research* (ISSCR) y la *International Society of Cell Therapy* (ISCT) han definido los criterios para un correcto y oportuno traslado de las células madre de la investigación a la clínica (9); por su parte, en Colombia el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) ha hecho buenos aportes en este sentido y lidera el propósito de sacar adelante una normatividad para el país. A modo de ejemplo, en los Estados Unidos las células madre mesenquimales son reguladas como productos medicinales de terapia avanzada (*advanced therapy medicinal products*, ATMPs), sometidas a autorización de mercado; sin embargo, la cláusula “*hospital exemption*” autoriza a los hospitales a usar ATMPs sin comercialización previa, pero con buena evidencia terapéutica, bajo la exclusiva responsabilidad del médico. También está contemplado el “uso compasivo”, según el cual el paciente con una enfermedad que pone en peligro su vida, crónica o debilitante, y que no logra ser controlado con fármacos autorizados, pueda acceder a un recurso terapéutico en investigación, por fuera de un ensayo clínico ¹². Adicionalmente, la Sociedad Internacional para la Investigación en Células Madre (ISSCR) publicó en el año 2016 las “Guías para la investigación en células madre y su transferencia a la clínica”, con interesantes consideraciones éticas y científicas. En lo concerniente al traslado de las células madre a la clínica se tocan aspectos como: i) el rigor que debe existir desde el procesamiento y la manipulación de las células; esto es, que se garanticen los derechos del donante, la calidad de la muestra y la adherencia a las buenas prácticas de manufactura; ii) el soporte de los estudios preclínicos, generadores de evidencia respecto a la seguridad y posibles efectos terapéuticos, y clínicos, sin sobreestimar los beneficios; iii) la innovación, con un llamado a no comercializar servicios no probados, intervenciones no demostradas o con evidencias sacadas de contexto; en otras

palabras, evitar el “turismo de células madre”, al comercializar productos no soportados científicamente; iv) la aplicación médica, con la aceptación del uso *off-label*, pero insistiendo en una actitud prudente, debido a las incertidumbres de este tipo de tratamiento. Estas consideraciones pretenden balancear seguridad/eficacia con las necesidades de los pacientes que no tienen otras opciones disponibles ^{9,13}.

Condiciones para el uso clínico

La primera terapia celular reconocida fue la transfusión sanguínea, la cual prosperó gracias al descubrimiento de los grupos sanguíneos por Carl Landsteiner en el año 1900; el segundo gran paso de la terapia celular se logró con el trasplante exitoso de médula ósea en 1957 ⁹. En 1995 se condujo el primer estudio clínico con células madre de médula ósea, en pacientes con enfermedad neoplásica. Desde entonces, miles de pacientes han salvado sus vidas con la administración de células madre autólogas o alogénicas, para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades; en otros casos la terapia celular ha tenido efectividad modesta y transitoria, o ha resultado inútil ¹⁴.

Hay abundante investigación preclínica que apoya la seguridad y la efectividad de una variedad de terapias celulares en modelos animales. Numerosos estudios clínicos corresponden a fases tempranas de investigación y han sido hechos en pequeñas cohortes de pacientes, con enfermedades en diferentes estadios de progreso, fenotípicamente heterogéneas y con pacientes que también reciben la terapia convencional; de modo que la evaluación de la efectividad del trasplante celular es particularmente complicada y debe tener la potencia suficiente para mostrar diferencias respecto a los controles con el tratamiento estándar. En los últimos años, sin embargo, se ha avanzado en ensayos clínicos controlados que permiten llegar a conclusiones más confiables de la seguridad y eficacia de la terapia celular, a la vez que se han ido clarificando una serie de inquietudes relacionadas con la fuente y manipulación de las células madre a usar, las formas

farmacéuticas a administrar y el régimen posológico óptimo (**Tabla 3.4**). La comunidad científica y clínica reconoce que la medicina regenerativa tiene los méritos para ser considerada un punto de inflexión en el tratamiento de numerosas enfermedades y que gradualmente se acumulará la evidencia suficiente como para que el trasplante de células madre haga parte de los protocolos convencionales del tratamiento de muchas condiciones clínicas^{9,14}.

Tabla 3.4. Aspectos que deben ser resueltos mediante ensayos clínicos con células madre.

<p>Tipo y fuente de las células madre</p> <ul style="list-style-type: none">• Médula ósea, sangre, tejido adiposo, cordón umbilical, otro.• Autólogas o heterólogas. <p>Producto a aplicar</p> <ul style="list-style-type: none">• Células purificadas o mezcla de células.• Células aisladas directamente o células cultivadas.• Células criopreservadas y descongeladas o células frescas.• Células manipuladas y modificadas o no. <p>Aspectos físico-químicos del producto a aplicar</p> <ul style="list-style-type: none">• Vehículo de la solución o suspensión.• pH.• Otras moléculas que deben acompañar el producto. <p>Ruta de administración</p> <ul style="list-style-type: none">• Intralesional, intraarterial, intravenosa, transmucosal, combinación de vías. <p>Dosificación</p> <ul style="list-style-type: none">• Cantidad de células por aplicación.• Dosis única o dosis múltiples.• Intervalos entre dosis.• Momento(s) óptimo(s) para la administración.
--

Fuente: elaboración propia.

Se pueden aislar células madre de cualquier tejido del cuerpo y en cualquier momento de la vida de una persona, pero la capacidad de éstas para reparar los daños va decayendo por el propio proceso de envejecimiento, o la presencia de enfermedades como la diabetes, la enfermedad cardiovascular, el cáncer o los trastornos que comprometen el sistema inmune; por estas razones, suele ocurrir que las mismas personas llamadas a beneficiarse de la

medicina regenerativa no se encuentran en condiciones óptimas para servir de donantes ¹⁴⁻¹⁶. La relativa facilidad de recuperación, aislamiento y expansión *in vitro* de las MSC derivadas de cordón umbilical y del tejido adiposo, junto con sus propiedades biológicas bien documentadas y su carencia de toxicidad, han hecho de estas células un atractivo recurso para terapia celular y explica el rápido incremento de los ensayos clínicos fase III, en los cuales se utilizan estas células ¹⁸. Inclusive, entre las mismas MSC hay múltiples ventajas para el uso de células madre de cordón umbilical: a) no expresan HLA-ABC, lo que indica que tienen menos alorreactividad, y por ende bajo riesgo de rechazo y de desarrollar enfermedad injerto contra huésped; b) muestran incrementada secreción de quimiocinas y factores de crecimiento; c) tienen mayor rendimiento en células madre: se ha reportado que la médula ósea rinde hasta 317.400 cel/mL, el tejido adiposo hasta 1'550.000 cel/mL y el cordón umbilical hasta 4'700.000 cel/cm³ de tejido; c) tienen alta plasticidad, ya que, por su inmadurez, expresan genes asociados con las tres capas germinales; d) su recolección no es invasiva, no tienen los dilemas ético-legales de otras fuentes y pueden estar disponibles en grandes cantidades, mantenerse criopreservadas por largo tiempo y recuperarse viables hasta un 90%, después de la descongelación; d) la sangre del cordón se ha utilizado clínicamente por más de 30 años; d) se sabe que la edad del donante impacta negativamente la potencia paracrina de las células madre ^{9,20}.

Debe insistirse en que existen importantes diferencias entre los distintos tipos de las propias MSC ^{21,22}, lo cual ha llevado a investigar las ventajas de la terapia con una mezcla de diversas células madre, con la hipótesis de que pueden resultar más efectivas que las de un solo tipo. Todo indica que la combinación de células madre tiene efectos sinérgicos probablemente debido a las propiedades complementarias de diferentes subtipos de células madre; por ejemplo, algunas podrían tener mayor potencial de diferenciación o mayor actividad paracrina. Esta hipótesis, sin embargo, no ha sido confirmada ²³.

La ruta de aplicación de las MSC ha sido uno de los tópicos más controversiales en el campo de la medicina regenerativa, pero con los años la vía intravenosa se ha consolidado, sobre todo en enfermedades sistémicas, aunque en el proceso de distribución las células madre podrían tener dificultades para atravesar ciertas barreras biológicas, como la hemato-encefálica. La aplicación intralesional se prefiere cuando la patología está localizada ¹⁸. El número de aplicaciones y la cantidad de células administradas también son motivo de discusión porque, si bien células como las del cordón umbilical carecen de antígenos clase II de HLA y de moléculas coestimulantes de las células T, teóricamente el uso repetido, local o sistémico, podría generar anticuerpos reactivos. No obstante, en cerca de la mitad de los estudios publicados se hicieron aplicaciones múltiples y las dosis se han ido estableciendo, sin una probada base científica o clínica, entre 1-2 millones de células/kg de peso (o 100 millones/dosis) ¹⁸.

Uno de los grandes desafíos biotecnológicos que enfrenta la medicina regenerativa ha sido la producción y la conservación *in vitro* de cantidades suficientes de células madre para abastecer una demanda médica, que crecerá en la medida que se vayan confirmando sus potenciales beneficios ^{5,24}. Los bancos de células madre han surgido como una magnífica alternativa para conservar las células madre en forma indefinida y con plena vitalidad ²⁵. Puesto que el nacimiento es un momento único para obtener células madre capaces de conservar el mayor vigor biológico y el mayor potencial de diferenciarse, surgieron inicialmente los llamados “bancos de células madre de recién nacidos”, basados en la recolección de sangre del cordón y posteriormente de otros tejidos fetales como la gelatina de Wharton ²⁶. Los servicios clínicos de los bancos de células madre del cordón umbilical se han ido expandiendo y en estos momentos se perfilan como la estrategia más recomendable para la producción a escala y el aprovisionamiento de células madre para trasplantes alogénicos ²⁷.

La seguridad del almacenamiento y el transporte de las células madre también es un asunto importante. Aunque hay unos pocos productos comercializados, debido a que la calidad de las células es extremadamente sensible a las condiciones de transporte y almacenamiento, casi en la totalidad de las investigaciones publicadas los bancos locales proporcionan las células “*off-the-shelf*”, así que el procuramiento local de células parece mandatorio en muchas regiones. Desde luego, las buenas prácticas de manufactura en la preparación de las células deben quedar garantizadas y certificadas en la preparación de células madre para uso clínico ¹⁸.

Con respecto al momento óptimo de aplicación, conviene recordar que el más alto nivel de evidencia de eficacia del trasplante de células madre se ha logrado en el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas, en las que los tejidos enfermos pueden destruirse mediante quimio o radioterapia de la médula ósea, antes de proceder al trasplante de las células madre. En otros órganos, donde las células madre deben competir con las células residentes enfermas y muchas células muertas se reemplazan por tejido fibroso avascular, la fuerza de la evidencia terapéutica es menor. Este hallazgo refuerza la propuesta de la aplicación temprana de células madre, antes de que se haya instalado la fibrosis y deteriorado la irrigación¹⁸. Por último, conviene recordar que una gran cantidad de pacientes candidatos a recibir células madre ya están siendo tratados favorablemente con los protocolos convencionales para su condición clínica; en tales casos, para hallar diferencias entre quienes reciben terapia regenerativa y quienes no, se requieren números muy grandes de pacientes ²⁸.

Evidencias clínicas de las células madre

Puesto que el enorme potencial terapéutico de las células madre se debe básicamente a que estas células tienen propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y regenerativas, la exploración clínica se ha enfocado en aquellas enfermedades cuya

patogénesis implica un fenómeno inflamatorio de bajo grado, una alteración de la respuesta inmune o una pérdida de tejido por muerte celular. Enseguida revisaremos las condiciones clínicas en las cuales las células madre se han investigado y utilizado como herramienta terapéutica, discutiremos el soporte científico y el nivel de evidencia actualmente disponible, en términos de seguridad y efectividad.

Trastornos cardíacos

A pesar de los progresos en la investigación cardiovascular, la patología cardíaca continúa siendo una de las más comunes causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La terapia basada en células madre se ha reconocido como una estrategia innovadora para la reparación, regeneración y recuperación funcional del miocardio, de ahí que, una vez superada la etapa de investigación en animales, la mayoría de los ensayos clínicos encaminados a evaluar seguridad y efectividad de la medicina regenerativa en las enfermedades cardiovasculares se han enfocado en la angina de pecho, el infarto del miocardio y la cardiomiopatía crónica. Si bien la evidencia actual de beneficios no es concluyente, sí pesa cada vez más la evidencia en favor de resultados favorables ²⁹.

Angina refractaria. Los pacientes con este síndrome, caracterizado por la persistencia de angina después de al menos tres meses de terapia médica estándar, con frecuencia no son candidatos a revascularización debido a la presencia de lesiones coronarias difusas o severa comorbilidad. La terapia celular ha emergido como un promisorio instrumento para el manejo de estos pacientes y los ensayos clínicos así lo señalan: en el año 2017 se publicó una revisión en la que se incluyeron 13 estudios clínicos, con 1061 pacientes y 12 meses de seguimiento en promedio. Los autores concluyeron que “aunque los datos disponibles aun no son concluyentes, dada la escasez de alternativas terapéuticas, consideramos que la terapia basada en células madre es una opción viable para agregar al tratamiento convencional de la

angina refractaria”³⁰. Un meta-análisis publicado en el año 2018, con 304 pacientes, reportó mejoría de la tolerancia al ejercicio y de la frecuencia de ataques de angina a los tres, seis y doce meses, así como reducción de la mortalidad a los dos años³¹. Un segundo meta-análisis publicado en marzo del 2019, que incluyó 526 pacientes controlados durante 14 meses, encontró que, comparados con quienes recibieron el manejo convencional, los pacientes tratados con células madre tuvieron menos efectos adversos serios, menos mortalidad, menos crisis de angina y menos medicación antianginosa³². Un tercer meta-análisis del año 2019, con 269 pacientes y 15 meses de seguimiento en promedio, reporta los siguientes resultados: disminución de la mortalidad por todas las causas, de la frecuencia de angina y aumento del tiempo de ejercicio, sin incremento de reacciones adversas³³.

Infarto agudo de miocardio (IAM). En diferentes estudios de pacientes con IAM, que recibieron PCI y medicación convencional oportunamente, la aplicación de células madre se asoció con significativo incremento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) y de otras variables indicadoras de mejoría de la función ventricular y modificación de la remodelación; inclusive los beneficios del *bypass* coronario son mayores cuando se combina con células madre³⁴. Además, a través de diferentes estudios se abre la posibilidad de conseguir resultados benéficos mediante administración intravenosa, en lugar de la aplicación directa en el corazón o las coronarias, con las consecuentes ventajas logísticas, de seguridad y de costos. Aunque la evidencia pesa más en favor de la seguridad y los beneficios de las células madre en el IAM, conviene mencionar que otros estudios no han mostrado efectos terapéuticos, lo que significa que persisten vacíos en el conocimiento, que deben ser superados, tales como los mencionados en la tabla 1 de este capítulo³⁵⁻⁴⁰.

Cardiomiopatía (isquémica y no isquémica). Muchos pacientes con insuficiencia cardíaca están expuestos a un largo proceso de remodelación miocárdica, que no permite restaurar

la función ventricular, pese al manejo médico y quirúrgico óptimo, debido a que los actuales protocolos de tratamiento son incapaces de rescatar la pérdida de cardiomiocitos causada por la miocardiopatía. Partiendo de la base de que un mecanismo central en el desarrollo de insuficiencia cardíaca es la respuesta inflamatoria continuada en el tiempo, resultó interesante la explotación de las propiedades antiinflamatorias, antifibróticas e inmunomoduladoras de las células madre en pacientes con cardiomiopatía isquémica y no isquémica. De acuerdo con una revisión de 5 estudios clínicos publicados entre los años 2017-2018, en los que se incluyeron 605 pacientes, los autores reportan que la terapia celular resulta segura, causa efectos inmunomoduladores, se relaciona con mejoría de la capacidad funcional y agrega beneficios clínicos a la terapia estándar del paciente. Concluyen que los resultados son promisorios y aconsejan seguir fortaleciendo el nivel de evidencia ⁴¹. Un meta-análisis publicado en mayo de 2019, que incluyó 20 investigaciones y 1418 pacientes, evaluados por 21 meses en promedio, muestra el siguiente resultado: comparados con los controles, las células madre mejoraron indicadores de función cardíaca (LVEF y LVESV), la distancia de marcha, la clasificación funcional de la insuficiencia cardíaca, la calidad de vida y la mortalidad. No hubo diferencias con el grupo control respecto a eventos adversos serios y hospitalizaciones ⁴². En una reciente revisión de 9 estudios, que incluyeron 612 pacientes con falla cardíaca, se encontró mejoría de los parámetros clínicos y paraclínicos, evaluados durante 9 meses en promedio. Los autores concluyen que las células madre son una terapia efectiva para el tratamiento de la falla cardíaca, mejorando el pronóstico y la capacidad de ejercicio de los pacientes ⁴³.

Trastornos hepáticos

Si bien el hígado tiene una extraordinaria capacidad regenerativa, infecciones virales, fármacos, tóxicos, trastornos metabólicos, enfermedades genéticas e inmunes, entre otras, pueden provocar falla hepática aguda o evolucionar a inflamación

crónica, cirrosis y estados terminales, pese al manejo médico y quirúrgico indicado. El trasplante de hígado no es una opción realista para muchos pacientes, debido a la escasez de donantes, complicaciones relacionadas con la inmunosupresión, complejidad y altos costos de la intervención quirúrgica; por tanto, hay urgente necesidad de nuevas alternativas terapéuticas.

Una vez demostrada *in vitro* la capacidad de las MSC de diferenciarse en células hepáticas y sus propiedades antiinflamatorias, anti-apoptóticas, anti-fibróticas, antioxidantes y proangiogénicas, se avanzó en la confirmación de la seguridad y la efectividad de estas células en diferentes modelos animales de daño hepático, para posteriormente iniciar los estudios en humanos, todos los cuales han mostrado que la administración es segura y, aunque en algunos de ellos no se modificó el curso clínico de la enfermedad y persisten barreras técnicas y vacíos de conocimiento, la mayoría de investigaciones confirma efectos terapéuticos en falla hepática aguda ⁴⁴ y en cirrosis hepática de diferentes etiologías, con cambios histológicos, bioquímicos y mejoría de la función hepática ⁴⁵⁻⁴⁸. Conviene anotar que, por las mismas condiciones de comorbilidad de este tipo de pacientes, la fuente de células madre migra rápidamente a las MSC alogénicas (de médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo) y hacia la vía de administración intravenosa, haciendo el procedimiento más sencillo y menos costoso ^{49,50}.

En el año 2015 se publicó un meta-análisis de 7 ensayos clínicos con enfermos de cirrosis terminal por hepatitis B, C o alcohólica, en el que se compararon 233 pacientes que recibieron placebo o tratamiento convencional, con 256 pacientes a quienes se les agregaron células madre. Resultados: hubo cambios histológicos, bioquímicos y de la función hepática en favor del grupo tratado con células. Conclusión “el trasplante de células madre mejoró significativamente la función hepática, convirtiéndose en este momento en el más promisorio abordaje

terapéutico”⁵¹. En el año 2016 se publicó un estudio en el que 65 pacientes con cirrosis por hepatitis B descompensada se dividieron en un grupo de control que recibió el tratamiento estándar y otro grupo que recibió células madre de cordón umbilical. A los seis meses de seguimiento los autores registraron los siguientes resultados: en el grupo trasplantado con células madre hubo inhibición de la proliferación de linfocitos T y B, activación de las células Treg, aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias y reducción de las proinflamatorias; por tanto, concluyen que las células madre reducen la inflamación y el daño celular, disminuyendo la probabilidad de falla hepática⁵². También en el año 2016 se publicó una investigación hecha en 72 pacientes con cirrosis alcohólica. Un grupo recibió el tratamiento estándar y otro grupo el estándar más células madre (dos dosis). Les hicieron biopsias de control a los 6 meses y seguimiento de eventos adversos por 12 meses. Los resultados fueron los siguientes: en el grupo tratado con células madre hubo reducción de la fibrosis hepática entre 25% y 37%; en los indicadores de función hepática también hubo significativa mejoría; la proporción de eventos adversos no fue diferente entre los grupos. Los autores concluyeron que las células madre fueron seguras y se asociaron con mejoría histológica y funcional⁵³. En un ensayo clínico publicado recientemente se reporta que 20 pacientes cirróticos que recibieron células madre tuvieron mejoría en la escala MELD (que mide estado de enfermedad hepática), del INR, albúmina sérica y niveles de bilirrubina, a los 3 y 6 meses del trasplante de las células⁵⁴. Es oportuno mencionar que en una reciente revisión de la enfermedad hepática por alcohol (que va desde el hígado graso/esteatosis hasta la cirrosis y el cáncer de hígado) los autores concluyen que la terapia celular parece promisoriosa en el tratamiento, por su capacidad de migrar al hígado, diferenciarse en hepatocitos y liberar en el órgano factores de crecimiento, antiinflamatorios e inmunomoduladores⁵⁵.

Trastornos osteoarticulares

Los trastornos osteoarticulares, tales como la osteoartritis, las tendinopatías crónicas y las fracturas con pérdida de hueso, han sido los más estudiados por la medicina regenerativa, la cual se posiciona actualmente como una opción segura y buen candidato para superar la limitación funcional y el dolor crónico a los que están condenados algunos de estos pacientes, ya que es la única herramienta terapéutica cuya capacidad de reparación tisular ha sido demostrada.

Osteoartritis. El cartílago articular tiene muy poco potencial de auto-reparación, principalmente debido a la falta de vascularización y la escasez de células madre, y el poco tejido que puede regenerarse puede no tener las mismas propiedades bioquímicas y biomecánicas del cartílago nativo, así que una lesión focal del cartílago puede extenderse sin control hasta requerir reemplazo articular. Por tanto, debe prestarse toda la atención a la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento de las lesiones del cartílago articular y es aquí donde la medicina regenerativa entra en escena, como un recurso terapéutico válido en la degeneración del cartílago articular ⁵⁶.

El tratamiento convencional de la osteoartritis muestra solo modestos beneficios clínicos, mientras más de 40 ensayos clínicos publicados reportan que la inyección intraarticular de células madre con factores de crecimiento resulta en franca recuperación del cartílago y de los parámetros clínicos (dolor y limitación funcional), imagenológicos, artroscópicos y de calidad de vida ^{57,58}; la adición de factores de crecimiento se hace para estimular la proliferación y diferenciación celular y generar una matriz extracelular adecuada para estimular el desarrollo del cartílago. Un meta-análisis del año 2019, que incluyó 33 investigaciones y 724 pacientes con osteoartritis, muestra que hubo significativa mejoría del dolor y de la función articular, acompañados de regeneración del cartílago articular ⁵⁹, sin embargo, algunos expertos señalan

que, si bien hay buena confianza en la seguridad, es necesario acumular mayor evidencia con respecto a la efectividad del procedimiento ⁶⁰.

Tendinopatías. El 20 a 30% de las lesiones deportivas comprometen los tendones y, pese a que se han hecho grandes esfuerzos por unificar criterios sobre la fisiopatología, la clínica y el abordaje terapéutico, no existe un tratamiento consensuado de las tendinopatías agudas de origen traumático. Por otro lado, las tendinopatías crónicas, como la tendinosis o degeneración tendinosa, sin signos de respuesta inflamatoria, son lesiones por esfuerzos repetitivos, que someten el tendón a excesiva tracción o sobrecarga, causantes de alteraciones microscópicas que debilitan las propiedades mecánicas del tendón; su prevalencia se eleva con la edad y sus formas clínicas más frecuentes afectan el hombro, el codo, el trocánter, la rodilla, la rótula y el tobillo ^{57,61}.

Tradicionalmente el manejo de las tendinopatías comprende agentes analgésicos, antiinflamatorios, fisioterapia y, si el tratamiento conservador no es suficiente, cirugía. Con cierta frecuencia, cuando el tratamiento no quirúrgico es insatisfactorio, se recurre a la infiltración con glucocorticoides, cuya efectividad es transitoria y con el inconveniente de que estos fármacos inhiben la actividad de los tenocitos y la síntesis de colágeno, debilitando los tendones y aumentando el riesgo de rupturas ⁶². Por el contrario, la mayoría de los estudios clínicos publicados muestra que la aplicación intralesional de células madre mejora el dolor, el desempeño articular y los defectos estructurales del tendón lesionado ^{62,63}.

Degeneración del disco intervertebral. El disco intervertebral es un anillo fibrocartilaginoso que envuelve un material gelatinoso llamado núcleo pulposo; tiene la función de amortiguar las fuerzas compresivas sobre la columna vertebral. La degeneración del disco intervertebral se acompaña de pérdida de la vitalidad de sus células madre, resultando en deformación del disco e inestabilidad,

que puede provocar dolor local, radiculopatía o mielopatía ⁶⁴. Las opciones de tratamiento de la degeneración del disco son paliativas, con base en medicamentos, fisioterapia y, no pocas veces, cirugía, la cual puede dejar como secuelas problemas biomecánicos y aceleramiento de la degeneración de los segmentos vecinos ⁶⁵. La aplicación intradiscal de células madre es una interesante opción y los estudios clínicos han demostrado la seguridad y el beneficio en términos de dolor, incapacidad, calidad de vida y calidad del disco ^{66,67}. Este procedimiento es seguro, mínimamente invasivo, no requiere cirugía u hospitalización y se compara favorablemente con los resultados obtenidos con intervenciones quirúrgicas, tales como la fusión espinal o el reemplazo del disco ⁶⁵. En una reciente revisión sistemática de reportes de aplicación de células madre para regeneración del disco intervertebral, en la que se incluyeron siete estudios con 98 pacientes, los autores concluyen que “esta revisión prueba que las células madre son seguras y una opción factible en la degeneración del disco intervertebral. Se evidencia mejoría radiológica y clínica, con muy baja tasa de complicaciones” ⁶⁸.

Fracturas con pérdida de hueso. La reconstrucción de grandes segmentos de hueso es todo un desafío médico, en términos de tiempo de tratamiento, complicaciones y costos. En fracturas con pérdida de hueso, con respecto al *gold estándar* actual que consiste en la aplicación de bloques óseos autólogos, las células madre mezcladas con hueso desmineralizado y plasma rico en plaquetas son claramente superiores, además que reducen a la mitad el tiempo de recuperación ⁶⁹.

Trastornos pulmonares

El pulmón tiene una extraordinaria capacidad de auto-reparación, pero está expuesto a numerosos factores dañinos medio ambientales y endógenos. A partir del momento que se demostró en cultivos de tejido pulmonar humano que las células madre inhiben la proliferación de fibroblastos y aumentan la reparación epitelial ⁷⁰, se han llevado a cabo numerosos estudios en

una variedad de modelos animales de enfermedades obstructivas, restrictivas e inflamatorias del pulmón (como hipertensión pulmonar, displasia broncopulmonar, EPOC, fibrosis pulmonar, asma, apnea obstructiva del sueño, injuria aguda e infección), con resultados de seguridad y efectividad que han proporcionado las bases para el inicio de investigaciones clínicas ⁷¹. Ensayos clínicos recientes confirman la seguridad del uso de las células madre en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y, aunque es aconsejable mejorar el nivel de evidencia clínica, los resultados son promisorios en enfermedades como la EPOC y la fibrosis pulmonar ⁷².

En el año 2013 se publicó un ensayo clínico en el que 62 pacientes con EPOC moderado a severo se distribuyeron en forma aleatoria para recibir células madre o placebo, a fin de evaluar la seguridad de las células. Al cabo de dos años de control los autores concluyen que la aplicación de células madre es segura y, dado que hubo significativa reducción de indicadores de inflamación en el grupo que recibió las células madre, hacen un llamado a intensificar la exploración del rol terapéutico de dichas células ⁷³. En una revisión del año 2017, de 4 investigaciones con 86 pacientes que sufrían de EPOC de diferentes grados, tras un promedio de seguimiento de 15 meses, los autores concluyeron que las células madre han demostrado un buen papel adyuvante en el escenario clínico. Los ensayos que utilizaron células madre combinadas con otros tratamientos convencionales encontraron que los pacientes obtuvieron un mayor beneficio en las pruebas de función pulmonar y de calidad de vida, así como reducciones en los marcadores sistémicos de inflamación ⁷⁴. Otra revisión de 15 estudios registrados (concluidos o en curso) hasta el año 2017 en la base de datos ClinicalTrials.gov, que incluían 803 pacientes con EPOC, se discuten las propiedades potencialmente benéficas de las células madre en esta patología y los autores concluyen que el trasplante de células madre es una alternativa clínica a enfermedades como la EPOC, por diversas razones que incluyen sus acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras, además de

la seguridad de la aplicación ⁷⁵. Estudios recientes han confirmado que las células madre modulan la respuesta inmune en pacientes con EPOC ⁷⁶.

Trastornos del tracto digestivo

Se cree que la *enfermedad intestinal inflamatoria (IBD)* es causada por una alteración de la respuesta inmune, que ataca la propia microbiota intestinal, en una persona con predisposición genética; por tanto, el tratamiento se enfoca en el control de la inflamación y normalización del sistema inmune. A pesar del creciente número de fármacos inmunosupresores disponible, hasta el 25% de los pacientes con colitis ulcerativa y el 75% con enfermedad de Crohn (CD) tendrán que ser sometidos a resección intestinal, por enfermedad refractaria ⁷⁷.

En la CD se ha encontrado que la infusión de células madre alogénicas es segura y más efectiva que el tratamiento convencional. En efecto, estudios que incluyen ensayos clínicos controlados y meta-análisis, demuestran que las células madre en infusión intravenosa son seguras y efectivas en el tratamiento de la CD, incluyendo la forma severa perianal: desde el primer reporte del éxito en la curación de la fístula recto-vaginal mediante la inyección de células madre, en el año 2003, 11 estudios fases I a III, que incluyen 365 pacientes, han demostrado la seguridad y la eficacia de las células madre en la enfermedad de Crohn ⁷⁸.

Por otro lado, en el año 2010 se publicó el primer estudio controlado en 42 pacientes con colitis ulcerativa, vigilados por 24 meses. Las células madre redujeron la actividad de inflamación autoinmune y estimularon el proceso de reparación de la mucosa intestinal, incrementando la duración de las remisiones y reduciendo la frecuencia de hospitalizaciones ⁷⁹. Entre 2008-2018 se publicaron 20 investigaciones fases I/III, con 519 pacientes con colitis ulcerativa y seguimientos entre 3 meses y 5 años, con tasas de remisión del 45 al 100% ⁸⁰.

Más recientemente (2019), se publicaron los siguientes resultados de un ensayo clínico fase III con 212 pacientes con IBD, distribuidos aleatoriamente para recibir o no células madre: tasas de remisión a los seis meses (50% vs 34%) y al año (56% vs 39%). No hubo aumento en la incidencia de eventos adversos en el grupo que recibió células madre ⁸¹.

Diabetes mellitus

El evento patogénico central de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es la autodestrucción de las células beta pancreáticas, mientras que en la diabetes tipo 2 (DM2) ocurre una inflamación crónica de bajo grado, que provoca disfunción de las células beta y resistencia a la insulina ⁸². Las notables propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de las células madre atrajeron la atención de investigadores y clínicos, lo que explica los numerosos ensayos clínicos concluidos o en marcha, cuyo propósito ha sido evaluar la seguridad y la efectividad de las MSC en el tratamiento de la DM1 y DM2; así que muchos expertos consideran que la medicina regenerativa representa uno de los abordajes terapéuticos más prometedor en el tratamiento de la diabetes ⁸³.

En el año 2016 se publicó un ensayo clínico de pacientes con DM2, distribuidos en un grupo que recibió el tratamiento convencional y otro al que se le agregaron células madre. En el seguimiento por 3 años en el grupo que recibió células madre no se encontraron efectos adversos agudos ni crónicos y mejoraron la glicemia, la hemoglobina glicosilada, el péptido-C, la función de las células beta y la incidencia de complicaciones diabéticas (nefropatía, neuropatía y retinopatía). Los beneficios se empezaron a notar a los 3-6 meses ⁸⁴. Una revisión de 16 estudios clínicos publicados entre 2010 y 2018, de 426 pacientes con DM 1 o 2 y tiempo promedio de seguimiento de 16 meses, llegó a la siguiente conclusión: “pese a la heterogeneidad de las investigaciones, los resultados son positivos y, con excepción de uno, todos los estudios

reportaron disminución de los requerimientos de insulina y/o antidiabéticos orales”⁸⁵. Otra revisión de ensayos clínicos del uso de células madre para tratamiento de la DM1 (4 estudios) y DM2 (3 estudios) concluyó que “en DM1, a pesar de los resultados favorables, quedan dudas acerca de la efectividad. Por el contrario, los consistentes efectos metabólicos positivos dan una esperanza para el tratamiento de la DM2 con células madre”⁸⁶. Finalmente, un meta-análisis del año 2019, de 6 investigaciones con 266 pacientes con DM2 tratados con células madre, con edades entre 45 y 58 años y tiempo promedio de seguimiento de 16 meses, concluye que “la terapia con células madre tiene efectos benéficos en DM2”⁸⁷.

Insuficiencia renal crónica

Puesto que el fenómeno patológico clave de la insuficiencia renal crónica es la fibrosis renal, con disfunción endotelial, activación de fibroblastos, reacción inflamatoria y remodelación, se ha evaluado el mecanismo antifibrótico de las MSC, con resultados prometedores en la IRC, incluyendo la nefropatía lúpica y diabética⁸⁸⁻⁹¹.

Trastornos hemáticos malignos

El trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas ha sido el tratamiento curativo ya establecido para una variedad de enfermedades hemáticas malignas y no malignas, previa preparación del paciente con quimio y/o radioterapia. Las células madre infundidas provocan repoblación de la médula ósea y reconstituyen la hematopoyesis. Entre las enfermedades hemáticas malignas, en las cuales se sabe que el trasplante de células hematopoyéticas alogénicas reduce significativamente el riesgo de recaídas y el de muerte, se encuentran la leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin y síndrome mielodisplásico⁹².

Lamentablemente, muchos pacientes que necesitaban un trasplante de células madre alogénicas no encontraban un donante compatible (HLA-*matched*) o no tenían buena respuesta, por lo que había la necesidad de explorar otras fuentes. La sangre del cordón umbilical se convirtió en el primer candidato para el uso en el trasplante de células madre hematopoyéticas, por ser éstas menos inmunogénicas HLA, con tasas de sobrevida similares a las logradas con trasplante de médula ósea alelo-*matched*; sus principales desventajas son la baja cantidad de células madre por cada unidad de sangre y un riesgo bajo de rechazo. Comparado con la sangre del cordón, el tejido de cordón umbilical es una fuente más rica en células madre y con menor riesgo de inducir rechazo, lo que convierte a este subtipo de célula madre mesenquimal en la fuente más promisoría y segura para el trasplante con estas indicaciones ⁹³.

Enfermedad injerto contra huésped

La complicación más común en los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es la enfermedad injerto contra huésped (*graft versus host disease*: GVHD), que puede afectar cualquier órgano y es la primera causa de morbi-mortalidad, no atribuible a recaída de la enfermedad de base. La GVHD puede ocurrir en forma aguda (aGVHD) o crónica (cGVHD) y según la severidad se clasifica en grados I a IV: los pacientes con grados III y IV de aGVHD tienen tasas de sobrevida a 5 años de apenas 25% y 5%, respectivamente ⁹⁴. Aunque algunos medicamentos inmunosupresores pueden reducir la incidencia de GVHD, ésta sigue siendo alta, lo que hace necesario investigar nuevas alternativas terapéuticas.

La GVHD es el resultado de una compleja respuesta inmune que involucra los linfocitos B, T y otras células. El HLA-G (human leukocyte antigen G) es una molécula clase I con propiedades tolerogénicas, que favorece la tolerancia inmune en situaciones alogénicas, como el trasplante. En pacientes trasplantados se

ha encontrado una significativa correlación negativa entre las concentraciones de HLA-G y la presencia o severidad del rechazo (grado 0-I vs grado II-IV) ⁹⁵. Dado que las MSC tienen marcadas funciones inmunomoduladoras relacionadas con la capacidad de estas células para secretar HLA-G (95), se ha explorado el valor del co-trasplante de MSC con células madre hematopoyéticas, para prevenir el aGVHD, el cGVHD y para el tratamiento del cGVHD refractario a glucocorticoides ⁹⁶. Aunque la evidencia todavía no se considera concluyente, sí se marca una clara tendencia en favor de las MSC, con respecto al riesgo de recaídas y supervivencia de los pacientes ^{94,97,98}.

Enfermedades autoinmunes

A raíz del reconocimiento de la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de varias clases de células madre, se inició la exploración del impacto de dichas células sobre enfermedades autoinmunes, y el soporte preclínico y clínico de la seguridad y los beneficios de la terapia celular en este grupo de enfermedades es cada vez mayor.

Artritis reumatoide (AR). En algunos pacientes la terapia convencional de la AR se relaciona con poca respuesta o intolerancia; en tales casos las células madre se han convertido en una novedosa opción terapéutica. En un ensayo clínico controlado, publicado en el 2017, con 53 pacientes que sufrían AR refractaria, se evaluó la seguridad y tolerabilidad de diferentes dosis de células madre. A los 3 meses de seguimiento se reportó que la infusión intravenosa de células madre fue, en general, bien tolerada y sin evidencia de toxicidad relacionada con la dosis de células; además se observó tendencia a la mejoría clínica, razón por la cual los autores invitaron a seguir explorando el prometedor beneficio de las células madre en estos casos ⁹⁹.

En el año 2019, un estudio reportó los efectos de la administración intravenosa de células madre en nueve pacientes con AR refractaria, los cuales fueron monitorizados por 12 meses.

Los autores encontraron significativa reducción de marcadores de inflamación, incremento de células inmunomoduladoras y mejoría en las escalas clínicas de actividad y de síntomas de enfermedad ¹⁰⁰.

La capacidad de las células madre de restaurar en pacientes con AR el balance perdido entre células y factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios se confirma en una sistemática revisión publicada también en el año 2019 ¹⁰¹.

Espondilitis anquilosante (EA). Es una espondilo-artropatía crónica que compromete sobre todo la columna vertebral y también es provocada por un trastorno del sistema inmune; su tratamiento convencional es insatisfactorio y con alta incidencia de efectos indeseables. Desde el año 2014 se reportó la aplicación intravenosa de células madre a 31 pacientes con EA refractarios o intolerantes a la medicación convencional. Durante 20 semanas se evaluaron la seguridad y la condición clínica con base en escalas de actividad y estudios de resonancia magnética. Los autores concluyen que las células madre constituyen una opción factible, segura y prometedora en el tratamiento de la EA ¹⁰². Para este año 2019 se publica una extensa revisión de los posibles mecanismos involucrados en la EA, las alternativas actuales de tratamiento, el fundamento teórico del mecanismo de acción de las células madre, así como la evidencia clínica de su beneficio; los autores concluyen que hay evidencia de que las células madre pueden ser benéficas sobre signos y síntomas de la enfermedad, ya que ellas controlan los eventos que dan origen a la enfermedad y promueven la regeneración del tejido dañado ¹⁰³.

Lupus eritematoso sistémico (LES). Es una de las enfermedades autoinmunes que cuenta con mayor soporte de beneficio y seguridad en modelos animales y en humanos. Con la reserva que debe tenerse cuando la evidencia clínica es todavía limitada, los resultados de los estudios clínicos de seguridad y efectividad dan lugar a ser optimistas. Así lo indican los estudios

de los mecanismos moleculares por los cuales estas células pudieran ser benéficas, así como los reportes de supervivencia, mejoría clínica y tolerabilidad en pacientes con diversas enfermedades autoinmunes ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. En una investigación de los factores predictores de respuesta clínica a la administración de células madre a 69 pacientes con LES refractario al tratamiento estándar, los autores encontraron que hubo remisión clínica con disminución de la actividad de la enfermedad a los 1, 3, 6 y 12 meses de seguimiento ¹⁰⁷.

Esclerosis sistémica (ES). Es una rara enfermedad autoinmune, que ataca la piel y cualquier órgano interno y puede tener un curso severo; sus opciones de tratamiento son muy limitadas y los medicamentos que pueden ser útiles tienen un margen de seguridad estrecho. La terapia celular surge como una opción no solo segura sino capaz de corregir muchos de los trastornos inflamatorios y del sistema inmune, que caracterizan la enfermedad ¹⁰⁸. Se revisan los datos de 60 pacientes con ES, reportados en 8 estudios clínicos publicados entre 2008 y 2018. En todos ellos se confirmó la seguridad y se obtuvieron beneficios significativos con la aplicación de células madre, en algún caso con seguimiento hasta por 5 años ^{109,110}. Un estudio relacionado con las células madre y la ES, publicado en lo que va del año 2019, merece ser comentado. Se recolectó sangre de 6 pacientes (entre 23 y 58 años) con formas agresivas de ES, antes y hasta 14 meses después de aplicarles células madre, con el propósito de investigar cambios en su perfil inmune. Durante el periodo de seguimiento se encontraron cambios positivos en subpoblaciones de linfocitos y en la secreción de sustancias mediadoras de respuesta inmune, indicando inmunomodulación asociada a mejoría clínica ¹¹¹.

Trastornos del sistema nervioso central (SNC)

No existe tratamiento efectivo para condiciones asociadas con muerte de neuronas y células gliales, porque la capacidad regenerativa de las células nerviosas es muy débil, así que uno

de los focos de atención de la comunidad científica y clínica está en cómo reducir el daño, promover la reconstrucción del tejido nervioso y recuperar su estructura y función, tras una agresión de cualquier tipo. Dadas las capacidades de diferenciación y las propiedades paracrinas de las células madre, existe mucha esperanza en los tratamientos de lesiones del SNC basados en el trasplante de estas células, las cuales son potencialmente capaces de reemplazar las células muertas y sintetizar moléculas que estimulan la neuroregeneración ¹¹².

En la exploración del valor de las células madre en trastornos del SNC se ha encontrado que un factor limitante de su eficacia es el ingreso al tejido nervioso dañado, pues se ha partido de la base de que a mayores concentraciones de células madre en el SNC mayor capacidad neuro-reparativa: más producción de factores neurotróficos, mayor número de células requeridas para la diferenciación neural y para la interacción con las células nativas del SNC. Entre las diferentes vías de administración utilizadas (intralesional, intratecal, intraarterial, intravenosa), la aplicación intravenosa parece tener ventajas por ser una vía menos invasiva, logísticamente más sencilla y porque el paso inicial por el pulmón parece que potencia sus efectos inmunomoduladores, resultado de la interacción de las células madre con células inmunes del pulmón ¹¹³.

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual las células madre atraviesan la barrera hemato-encefálica, se sabe que después de la infusión intravenosa o aplicación intranasal se encuentran células madre en el SNC, donde permanecen por años, pero en cantidad limitada ^{114,115}. Para mejorar la concentración de dichas células en el SNC se investigan diferentes estrategias, tales como la modificación de su perfil de quimiocinas y de moléculas de adhesión, o mediante la llamada técnica de “reprogramación *in vivo*”, que consiste en que células gliales endógenas sean reprogramadas en neuronas funcionales, dentro del cerebro o

la médula espinal del propio paciente; el mayor riesgo de este procedimiento es, desde luego, su potencial oncogénico por falta de control del proceso ¹¹⁶.

El accidente cerebro vascular (ACV) es el trastorno neurológico más común en adultos y su incidencia aumenta debido sobre todo al envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de la enfermedad cardiovascular. Adicionalmente, las medidas actuales para superar el ataque agudo han disminuido la mortalidad del ACV, pero muchos pacientes sobrevivientes quedan con discapacidad residual de tipo cognitivo, sensorial y/o motora. Así que las intervenciones encaminadas a prevenir, tratar la fase aguda o las secuelas del ACV se necesitan con urgencia. La terapia celular representa una nueva opción para reducir la discapacidad provocada por el ACV. El primer paso fue demostrar seguridad y mejoría funcional asociada a angiogénesis, neurogénesis y control de la inflamación en modelos animales; posteriormente se documentó la seguridad y factibilidad de la terapia celular en cohortes de pacientes con ACV isquémico agudo y crónico; hasta ahora se ha confirmado que el trasplante de células madre es seguro y se asocia con mejoría de la función neurológica, en seguimientos hasta por cuatro años ¹¹⁷. Teniendo en cuenta estos resultados promisorios se encuentran en marcha ensayos clínicos controlados, mediante los cuales, además del riesgo/beneficio, es preciso dar respuesta a algunos de los interrogantes formulados en la **Tabla 3.4** ^{118,119}.

Enfermedades neurodegenerativas

Tradicionalmente se ha considerado que una serie de enfermedades neurodegenerativas (esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson) son incurables y la medicina sólo puede ofrecer tratamiento sintomático; un caso particular es el de las medicaciones modificadoras de enfermedad, que logran controlar el avance de las formas intermitentes de la esclerosis múltiple,

pero ninguna de ellas repara el daño ya instalado. En los últimos años ha habido gran interés por establecer el papel de las terapias con células madre en varias enfermedades neurodegenerativas y, más que en la diferenciación a neuronas y el reemplazo de las neuronas muertas, las investigaciones se enfocan actualmente en explotar las propiedades paracrinas de neuroprotección, control de la inflamación y modulación del sistema inmune por parte de las células madre trasplantadas ¹²⁰. *In vitro* y en diversos modelos animales se han confirmado las siguientes propiedades de diferentes tipos de células madre: re-mielinización, inhibición de la gliosis, inmunomodulación, angiogénesis y neuroprotección ¹²¹.

Aunque es necesario reforzar, a través de ensayos clínicos controlados actualmente en marcha, la evidencia de seguridad/eficacia, dosis, tipo de células, vías de administración, etc. La información disponible muestra enlentecimiento de la progresión de enfermedades como la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson. El tratamiento de la esclerosis múltiple con base en la medicina regenerativa ha alcanzado un nivel de evidencia tal, que recientemente la Sociedad Americana para el Trasplante de Sangre y Médula Ósea ha recomendado incluir las formas severas de esta enfermedad entre las indicaciones del trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas ¹²², con lo cual el mundo académico y científico abre las puertas de la clínica para explorar el rol de células madre de otros tipos, tales como las de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, cuya seguridad de la administración intratecal ya ha sido documentada ¹²³.

Por otro lado, una revisión de 19 estudios fases I/II sobre esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que incluye 380 pacientes, confirma la seguridad (no eventos adversos severos) y la factibilidad de la aplicación intravenosa e intracerebral de las células madre, aunque los resultados de efectividad todavía no pueden considerarse concluyentes ^{124,125}. Pero el interés de la

comunidad científica en este tópico es tal, que para mediados del año 2019 había ya 50 estudios registrados en *ClinicalTrials* sobre ELA + *stem cells*. La capacidad de las células madre de reparar el daño causado por la enfermedad de Parkinson (EP) ha sido demostrada *in vitro*, y los estudios de seguridad y efectividad del tratamiento con células madre en modelos animales de la enfermedad son concluyentes, al punto que se ha autorizado pasar a la investigación en seres humanos. Hasta ahora la evidencia clínica puede resumirse así: i) Los estudios de seguridad de la aplicación en seres humanos no dejan dudas: estamos frente a una herramienta terapéutica con una bajísima tasa de efectos indeseables y no relacionada con lo que pudieran considerarse efectos adversos serios; ii) La evidencia de los estudios de efectividad, si bien todavía no es decisiva, es cada vez más fuerte y las células madre se perfilan como una terapia asociada con mejoría de la condición clínica, de las imágenes radiológicas y de las puntuaciones neuropsicológicas de los pacientes con la EP ¹²⁶⁻¹²⁸.

Traumas del SNC

Sin duda las medidas médico-quirúrgicas actuales disminuyen la mortalidad asociada al trauma craneo encefálico; en consecuencia, a largo plazo aumenta la morbilidad, con déficit motor, sensorial o de las funciones mentales, debido a la destrucción de tejido cerebral. Las estrategias encaminadas a la reparación y a la regeneración celular son muy limitadas, de ahí que el potencial regenerativo de las células madre esté recibiendo toda la atención. En el trauma craneo encefálico prácticamente todos los tipos de células madre han sido evaluadas, acompañadas o no de biomateriales que hacen las veces de matriz extracelular, en estudios preclínicos y clínicos, en las fases aguda, subaguda o crónica del trauma, con significativa reducción del déficit neurológico y de las secuelas cognitivas. Aun así, todavía deben resolverse muchos problemas antes de que la terapia basada en células madre haga parte de los protocolos convencionales del manejo clínico del trauma craneo encefálico ¹²⁹.

En el trauma espinal la disrupción de circuitos neuronales provoca pérdida parcial o completa del control motor, del input sensorial y de las funciones autonómicas; las consecuencias crónicas comprenden la incontinencia de esfínteres, el dolor neuropático, la espasticidad, las úlceras por presión y las complicaciones cardio respiratorias, que deterioran la calidad y disminuyen la expectativa de vida del paciente. En humanos con trauma espinal parcial se ha confirmado, por un lado, que el trasplante de células madre con *scaffolds* de biomateriales proporciona un soporte físico y trófico para el re-crecimiento axonal ¹³⁰ y, por otro lado, que la administración de dosis repetidas de células madre autólogas resultó un procedimiento bien tolerado y capaz de conseguir mejoría en parámetros clínicos y de la calidad de vida de pacientes, a los 12 meses de control ¹³¹.

Trastornos neurológicos perinatales

La encefalopatía isquémico-hipóxica neonatal (EIH) es una condición neurológica con alta mortalidad y complicaciones a largo plazo. El daño es causado por condiciones maternas, fetales o placentarias, que alteran la perfusión y la oxigenación tisular, con la consecuente privación de fuentes energéticas, disfunción mitocondrial, excito-toxicidad y muerte celular en la región afectada. Si no resulta fatal, la gran mayoría de neonatos afectados padecerán déficit neurológico, tales como pérdida de la audición y la visión, retardo en el desarrollo, parálisis cerebral y epilepsia. La principal medida terapéutica actual es la hipotermia, la cual no está exenta de riesgos y su papel es neuroprotector, no neurorreparador. Todo este devastador panorama confirma la imperiosa necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el manejo de la EIH. Se sabe que las MSC, en el sistema nervioso central, tienen la capacidad de censar el microambiente del sitio de daño y secretar factores paracrinos con funciones reparadoras de tipo anti-apoptótico, anti-inflamatorio, anti-oxidante y anti-fibrótico. Estudios en modelos animales y de fase I-II en recién nacidos humanos han reportado que la aplicación de células

madre es segura y potencialmente efectiva para el tratamiento de este lamentable trastorno neonatal. Esta terapia se considera aún en fase experimental y su mecanismo de acción benéfico no se conoce con certeza, aunque parece que la capacidad neuroprotectora y neuroreparadora de la medicina regenerativa juegan un papel central en la respuesta terapéutica. Toda esta información respalda el inicio de ensayos clínicos controlados y randomizados ¹³².

Parálisis cerebral. También por su potencial de neuroprotección y neuroregeneración, en los últimos años el trasplante de células madre ha surgido como una alternativa terapéutica promisoría para mejorar el desempeño de varios componentes de la parálisis cerebral, acompañada de los programas de rehabilitación convencionales. Diferentes estudios clínicos (series de casos y ensayos clínicos controlados) han confirmado la seguridad y la efectividad de las células madre derivadas del cordón umbilical en centenares de pacientes con parálisis cerebral, por infusión intravenosa a la dosis de 50 millones de células/kg de peso. En los diferentes ensayos clínicos, en pacientes de 6 meses a 20 años, se han reportado beneficios variables en las áreas cognitiva, lenguaje, auto-cuidado, función motora, adaptabilidad social y, en general, en la calidad de vida ^{132,133}, aunque un meta-análisis del año 2016, de ensayos clínicos randomizados y controlados que usaron células madre en parálisis cerebral, concluyó que a los seis meses hubo un significativo beneficio en la función motora, pero no fue posible concluir acerca de la función cognitiva; la relación riesgo/beneficio se consideró aceptable ¹³⁴.

Trastornos oculares

Un creciente soporte investigativo apoya la aplicación de células madre en oftalmología y cirugía plástica ocular, para tratar condiciones como retinopatía, neuropatía óptica, degeneración macular, glaucoma, lesiones de la córnea (quemaduras, úlceras u opacificación), disfunción de la glándula lacrimal (ojo seco) y

cirugía reconstructiva periocular y de párpados ¹³⁵. El manejo de las lesiones de córnea con células madre y factores de crecimiento es probablemente uno de los avances más importantes de la medicina regenerativa, puesto que ya están definidas y aprobadas las técnicas de intervención ¹³⁶.

Fragilidad y envejecimiento

A medida que avanza la edad se produce una inevitable y progresiva pérdida de la capacidad de mantener la homeostasis tisular, con incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas debilitantes y dolorosas. Así que el envejecimiento y sus enfermedades asociadas representan un enorme costo al sistema de salud y, como evidentemente el problema crecerá, existe la necesidad de encontrar los mecanismos responsables del envejecimiento y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a controlarlo. El síndrome de fragilidad se caracteriza por reducción del volumen, del tono y de la fuerza muscular, enlentecimiento de la movilidad y reducción de la actividad física, pérdida de peso, fatigabilidad, declinación de las funciones fisiológicas y el llamado panel de marcadores de inflamación (IL-6, FNT-alfa, dímero-D, fibrinógeno, cuadro hemático y proteína C reactiva); es más frecuente en mujeres y en personas con enfermedades crónicas y es un importante factor predisponente a caídas, incapacidades y hospitalizaciones de personas ancianas ¹³⁷. Si bien los cuidados de salud oportunos (ejercicio, nutrición, fármacos) mejoran la calidad de vida y los costos de atención del paciente, no existe un tratamiento específico para el manejo del anciano frágil ¹³⁸.

Entre los marcadores biológicos presentes en el proceso de envejecimiento se encuentran la disfunción mitocondrial, la alterada comunicación intercelular, el acortamiento de telómeros, la acumulación de radicales libres y la pérdida de vitalidad de las células madre, todo lo cual provoca un estado inflamatorio crónico. Debido a los efectos regenerativos y antiinflamatorios de

las células madre, la medicina regenerativa ha despertado mucho interés, como opción para reparar los daños causados por la fragilidad senil ¹³⁹. La seguridad de las células madre alogénicas, provenientes de donante joven o de cordón umbilical, ya ha sido validada en numerosos estudios preclínicos y clínicos ¹³⁸.

A finales del año 2017 se publicó un estudio controlado de seguridad y eficacia en pacientes frágiles tratados con células madre. Se confirmó la seguridad del procedimiento y mejoría de la distancia de marcha a los seis minutos, de las pruebas de función pulmonar, de la cognición y el componente físico de la calidad de vida, y se redujeron las concentraciones de algunos marcadores de inflamación ¹⁴⁰. Una publicación del año 2019 hizo una revisión sistemática de los fenómenos que determinan la fragilidad, de los fundamentos del empleo de las células madre en esta condición y de los ensayos clínicos que evalúan el tratamiento de la fragilidad con células madre. De acuerdo con los reportes de 5 estudios clínicos concluidos o en marcha, que han incluido 208 pacientes entre 55 y 96 años, monitorizados durante aproximadamente 12 meses, los autores llegan a la siguiente conclusión: “La fragilidad urgentemente requiere atención. La terapia con células madre tiene gran potencial ya que, aunque persisten desafíos, una sola infusión intravenosa de células madre alogénicas ha probado ser segura, bien tolerada y efectiva para la modulación de la inmunidad y la inflamación, muestra tendencia a mejorar las funciones físicas y la calidad de vida” ¹⁴¹. Resulta interesante mencionar que en un simposio del Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA) de los Estados Unidos, encaminado a analizar el problema de la fragilidad senil en la práctica clínica, se discutió el rol de las células madre en la fragilidad; la disfunción de las células madre fue identificada como uno de los blancos biológicos ligados con el envejecimiento y, por tanto, debería ser objeto de intervención en la prevención o tratamiento de la fragilidad ¹⁴². Estas recomendaciones son respaldadas por una reciente revisión donde muestran que las células madre poseen propiedades capaces de controlar o revertir muchos de los fenómenos bioquímicos causantes de la fragilidad.

Aunque los autores reconocen que es necesario mejorar el nivel de evidencia clínica, con base en los datos presentados en esta revisión, la modulación de la inflamación crónica por parte de las células madre es una estrategia prometedora para prevenir y retardar no solo la fragilidad, sino algunas otras condiciones clínicas frecuentemente asociadas con ella, tales como la enfermedad pulmonar crónica, la enfermedad cardiovascular, la diabetes y la osteoartritis ¹⁴³.

Trastornos de la piel y medicina estética

La piel es una fuente de células madre de diversos tipos, tales como las epidérmicas, las del folículo piloso, las melanocíticas, las sebáceas y las mesenquimales. Tanto las epidérmicas como las foliculares contribuyen a la re-epitelialización de lesiones de la piel. El potencial terapéutico de las células madre y los factores de crecimiento ha sido ampliamente estudiado en una gran variedad de enfermedades cutáneas y lesiones provocadas por infecciones, traumas, quemaduras, cirugías, neuropatías e insuficiencia vascular, con resultados variables. La aplicación intralesional de células madre en el tratamiento de cicatrices es sencilla, segura y efectiva, no solo en términos clínicos sino histológicos. Inclusive, la aplicación intradérmica profiláctica de células madre en heridas quirúrgicas impide la formación de cicatrices posquirúrgicas exageradas, con conservación de la estructura y la función normales de la piel.

Un meta-análisis de los ensayos clínicos que han investigado el efecto de las células madre en el tratamiento de las úlceras del pie diabético encontró que la terapia con células madre fue un procedimiento seguro y se asoció con significativa mejoría, independiente del tamaño de la úlcera y de la edad del paciente. Esta es la razón por la que muchas autoridades consideran la terapia celular como una novedosa y efectiva alternativa de tratamiento, desde luego acompañada de las medidas médicas y quirúrgicas convencionales ¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

Medicina estética. La piel es un tejido con alta capacidad de renovación, pero como está expuesta continuamente a condiciones ambientales adversas, con el tiempo su vitalidad va decayendo, de modo que el envejecimiento es inevitable, aunque puede ser lentificado. La medicina regenerativa se ha venido convirtiendo en una nueva estrategia para el rejuvenecimiento facial y relleno de surcos y líneas de expresión no deseados, eliminación de cicatrices, señales de acné y vitiligo, entre otros ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

El minoxidil y el finasteride son los únicos medicamentos aprobados actualmente para el tratamiento de la alopecia androgénica, pero no solo su efectividad es limitada, sino que tienen frecuentes efectos indeseables. Dados los mecanismos regenerativos de las células madre y que se ha demostrado que ellas liberan factores que promueven el crecimiento del cabello, la regeneración capilar se ha convertido en un blanco de la medicina regenerativa, con resultados benéficos variables y mínimos efectos indeseables ¹⁵¹. Una revisión reciente sobre el tema señala que “la aplicación de células madre constituye una de las terapias más promisorias y potencialmente efectiva para el tratamiento de diferentes causas de alopecia” ¹⁵².

Plasma rico en plaquetas (PRP) y factores de crecimiento

Como se sabe, las plaquetas son células sanguíneas que no solo intervienen en la coagulación de la sangre sino también en la reparación tisular, ya que están repletas de los llamados “factores de crecimiento”, entre los cuales se han descrito decenas, cada uno de los cuales tiene actividad muy específica, encaminada a promover la regeneración de los tejidos.

El PRP se utiliza con propósitos regenerativos en humanos desde hace más de 30 años. Su popularidad se debe a que sus propiedades terapéuticas se basan en moléculas naturales, autólogas y seguras, por lo que se considera un producto biológico, cuya actividad reparadora se ha dividido en tres fases: cuando la

plaqueta se activa y libera citoquinas y factores de crecimiento, se inicia una respuesta inflamatoria que tarda algunos días, para dar paso a la fase proliferativa de la curación, que tarda varias semanas; finalmente aparece la fase de remodelación, que conduce a la formación del tejido natural y puede tardar cerca de seis meses.

El término “plasma rico en plaquetas” se refiere a una muestra de plasma con una concentración de plaquetas por encima de los valores basales. Con base en la concentración basal en sangre periférica, los PRP pueden ser de baja concentración (2,5 a 3 veces la concentración basal) o alta concentración (5 a 9 veces la concentración basal). Los “factores de crecimiento” son los mismos principios activos del plasma rico en plaquetas, de las cuales se aíslan, purifican y concentran hasta lograr una potencia regenerativa 100 veces mayor que el PRP y sin el inconveniente de aplicar restos celulares inútiles o potencialmente lesivos. De esta manera se reproducen en forma más intensa los procesos fisiológicos de reparación de los tejidos dañados en el lugar anatómico que interesa; son por consiguiente moléculas endógenas sometidas a un procedimiento de concentración y bioestimulación, para incrementar su capacidad regenerativa ¹⁵³. El PRP está categorizado por la FDA como un tejido mínimamente manipulado y como producto sanguíneo autólogo. Entre nosotros no existe normatividad que acredite el desempeño del PRP o los factores de crecimiento, pero su aplicación debe ser considerada una práctica médica, ya que el éxito y la seguridad del procedimiento requieren conocimientos acerca del diagnóstico, beneficios, riesgos, precauciones, contraindicaciones, métodos de preparación y administración, manejo de las complicaciones, así como paraclínicos requeridos y otras alternativas terapéuticas ¹⁵⁴.

Secretomas

Las células madre secretan al medio una gran cantidad de moléculas bioactivas, en forma libre o empacadas en bicapas lipídicas llamadas vesículas extracelulares (VE) las cuales, una vez liberadas, descargan su contenido dentro de las células vecinas,

o circulan por la sangre e interactúan con células a distancia, replicando los efectos de las células madre de las cuales provienen^{155,156}. Tanto los factores solubles como los encapsulados en las VE pueden ser aislados de los medios en los que se cultivan *in vitro* las células madre, purificados, caracterizados, cuantificados y empacados en productos con un inmenso potencial terapéutico, conocidos como secretomas (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5. Citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos presentes en los secretomas.

Ang 1	lncRNA
Angiogenin	MCP-1
BDNF	M-CSF
BMP	mRNA
COL5/RANTES	miRNA
Collagen XVIII	MMP-1
CXCL1	MMP-2
DKK-1	MMP-3
DNA (fragmentos)	MMP-7
EGF	mRNA
EPO	NGF
FGF-2	PDEGF
Fractalkine	PDGF-AA
GCSF	PDGF-AB/BBPGE2
GDNF	PIGF
GIF	piwi-RNA
GM-CSF	SCF
HEGF	SDF-1
HGF	small nucleolar RNA
ICAM	siRNA
IDO	TGF- α
IFN γ	TGF- β
IGFBP-1	Thrombospondin 1/2
IGFBP-2	TIMP-1
IGF-II	TMP-1
IL-6	TMP-2
IL-8	TSG-14
IL-10	TSP-1
IL-12p70	vaultRNA
IL-13	VCAM-1
IL-17E	VEGF
IL-1a	YRNA
IL-1b	
IL-27	
IL-6	
IL-8	
IL-9	
IP-10	
KGF	
Leptin	
LIF	

Fuente: elaboración propia.

Las más importantes VE son los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos. Los primeros (50-150 nm) se forman en los endosomas multivesiculares, se fusionan a la membrana plasmática, se liberan al espacio extracelular y viajan a distancia hasta ser captados por las células blanco, por endocitosis o fusión a la membrana, donde liberan su carga. Las microvesículas (100-1000 nm) se forman en la membrana plasmática y son liberadas extracelularmente, en respuesta a estímulos como injuria, hipoxia, irradiación. Tanto los exosomas como las microvesículas se originan en células sanas, mientras los cuerpos apoptóticos (1000-5000 nm) son producidos por células que están muriendo o en apoptosis y su función parece relacionada con el aclaramiento de células envejecidas y regulación inmune intercelular ¹⁵⁷.

El potencial terapéutico de los secretomas se debe a que contienen efectores paracrinos involucrados en una amplia variedad de respuestas tisulares, tales como: i) actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiapoptótica y citoprotectora; ii) restauración de la actividad angiogénica (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos) y energética; iii) transferencia intercelular de factores de transcripción y ácidos nucleicos (DNA, mRNA, miRNA y lncRNA, los cuales juegan un papel central en la comunicación intercelular, la diferenciación celular, el desarrollo de órganos y la reprogramación epigenética. Sin embargo, no se puede perder de vista que, según el método de aislamiento empleado, se obtienen diferentes contenidos de los secretomas y, por ende, diferentes funciones, aunque sean derivados de poblaciones celulares aparentemente homogéneas ¹⁵⁸⁻¹⁵⁹.

Existe abundante evidencia de que los secretomas conservan las propiedades regenerativas de las células madre de las cuales provienen y, por tanto, tienen potencial terapéutico similar y se constituyen en una alternativa terapéutica acelular, que podría llegar a sustituir ventajosamente la terapia celular ¹⁶⁰. En efecto, los secretomas derivados de las células madre tienen menos

inmunogenicidad y toxicidad, mayor estabilidad en la circulación y los tejidos, y ningún riesgo de mutaciones o diferenciación indeseada; puesto que no son células vivas, resulta más sencillo garantizar su estabilidad, integridad y actividad biológica durante su manufactura, almacenamiento, proceso de esterilización y administración; además, son más estables que las propias células al congelamiento y deshielo, y contienen complejos MHC que no se modifican, como sí se ha observado en células vivas que, después del deshielo, pueden generar nuevos complejos MHC, sin presencia de antígenos. Por último, los secretomas pueden ser selectivamente enriquecidos con moléculas cuyas actividades sean de interés terapéutico; por ejemplo, se puede aumentar su potencial cardioprotector sobrecargándolos con moléculas claves en la función cardíaca ¹⁶¹⁻¹⁶².

Si bien en el campo de la medicina regenerativa los secretomas aparecen como una promisoriosa terapia sin células, antes de que ellos puedan constituirse en una real alternativa a las células madre deben superarse algunos problemas, tales como la reproducibilidad en el proceso de manufactura, ya que de éste depende el contenido del secretoma y sus potenciales terapéuticos, condiciones para seleccionar y cuantificar su contenido, condiciones para mejorar su captación por las células recipientes, costos de producción, modo de empleo (dosis, vía y frecuencia de administración), influencia de las condiciones clínicas del paciente y su seguridad a largo plazo ^{158,163}.

La fuente y expansión de las células madre de las cuales se obtendrán los secretomas son asuntos críticos, ya que, por ejemplo, los secretomas producidos a partir de neonatos y en un ambiente hipóxico tienen mayor capacidad protectora y reparativa que los provenientes de adultos y cultivados en ambiente normóxico ¹⁵⁶.

Pese a que los secretomas constituyen una nueva clase de agentes biológicos, cuya producción no está todavía reglamentada por agencias regulatorias, para la implementación del uso en

humanos conviene tener presente que ellos no implican un riesgo alto porque: a) sus moléculas activas son fisiológicamente producidas por células, existen en forma natural y actúan por mecanismos naturales; b) hay suficiente evidencia del perfil de seguridad de las células madre, por tanto es plausible que sus secretomas no causen daño; c) el gran número de transfusiones de productos sanguíneos respalda que los secretomas alogénicos co-transfundidos tienen aceptable margen de seguridad. En conclusión, estos argumentos apoyan la presunción de que los secretomas aislados a partir de células humanas no entrañan un riesgo mayor que los que se producen en los tejidos. Adicionalmente, puesto que los secretomas median efectos en diferentes modelos animales, su especificidad de especie es muy baja, lo que facilita la extrapolación de resultados en animales a humanos.

Desde el punto de vista regulatorio, los secretomas tienen la categoría farmacéutica de productos biológicos medicinales (o biofarmacéuticos), en los que los principios activos no son moléculas definidas y, por tanto, no es necesario identificar, cuantificar y definir el mecanismo de acción de cada principio activo, puesto que la actividad terapéutica puede depender del contenido del secretoma, de las membranas vesiculares o de la combinación de ambos, y podría ser no definible ^{158,163}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development*. 2018; 145(2). pii: dev139691. doi:10.1242/dev.139691.
2. Beyret E, Martínez Redondo P, Platero Luengo A, Izpisua Belmonte JC. Elixir of Life: Thwarting Aging With Regenerative Reprogramming. *Circ Res*. 2018; 122(1):128-141. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311866.
3. Bardelli S, Moccetti M. Remodeling the Human Adult Stem Cell Niche for Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int*. 2017; 2017:6406025. doi: 10.1155/2017/6406025.
4. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*. 2019; 15:421-438. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004.
5. Isildar B, Ozkan S, Oncul M, Baslar Z, Kaleli S, Tasyurekli M, et al. Comparison of different cryopreservation protocols for human umbilical cord tissue as source of mesenchymal stem cells. *Acta Histochem*. 2019. doi: 10.1016/j.acthis.2019.02.008.
6. Le Blanc K, Davies LC. MSCs-cells with many sides. *Cytotherapy*. 2018; 20(3):273-278. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.01.009.
7. Musiał-Wysocka A, Kot M, Sułkowski M, Badyra B, Majka M. Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(8). pii: E1807. doi:10.3390/ijms20081807.
8. Qin H, Zhao A, Fu X. Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(19):3553-3575. doi: 10.1007/s00018-017-2586-x.

9. Cossu G, Birchall M, Brown T, De Coppi P, Culme-Seymour E, Gibbon S, et al. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet*. 2018; 391(10123):883-910. doi:10.1016/S0140-6736(17)31366-1.
10. Marks P, Gottlieb S. Balancing Safety and Innovation for Cell-Based Regenerative Medicine. *N Engl J Med*. 2018; 378(10):954-959. doi:10.1056/NEJMSr1715626.
11. Chisholm J, von Tigerstrom B, Bedford P, Fradette J, Viswanathan S. Workshop to address gaps in regulation of minimally manipulated autologous cell therapies for homologous use in Canada. *Cytotherapy*. 2017; 19(12):1400-1411. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.08.015.
12. Poulos J. The limited application of stem cells in medicine: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1):1. doi: 10.1186/s13287-017-0735-7.
13. Frati P, Scopetti M, Santurro A, Gatto V, Fineschi V. Stem Cell Research and Clinical Translation: A Roadmap about Good Clinical Practice and Patient Care. *Stem Cells Int*. 2017; 2017:5080259. doi: 10.1155/2017/5080259.
14. Choi JR, Yong KW, Nam HY. Current Status and Perspectives of Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:4762634. doi:10.1155/2019/4762634.
15. Lunyak VV, Amaro-Ortiz A, Gaur M. Mesenchymal Stem Cells Secretary Responses: Senescence Messaging Secretome and Immunomodulation Perspective. *Front Genet*. 2017; 8:220. doi: 10.3389/fgene.2017.00220.
16. Mahmoud M, Abu-Shahba N, Azmy O, El-Badri N. Impact of Diabetes Mellitus on Human Mesenchymal Stromal Cell Biology and Functionality: Implications for Autologous Transplantation. *Stem Cell Rev*. 2019. doi: 10.1007/s12015-018-9869-y.

17. Fafían-Labora JA, Morente-López M, Arufe MC. Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2019; 11(6):337-346. doi: 10.4252/wjsc.v11.i6.337.
18. Can A, Celikkan FT, Cinar O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy*. 2017; 19(12):1351-1382. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.08.004.
19. Bárcia RN, Santos JM, Teixeira M, Filipe M, Pereira ARS, Ministro A, et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells maintain immunomodulatory and angiogenic potencies after cryopreservation and subsequent thawing. *Cytotherapy*. 2017; 19(3):360-370. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.008.
20. Umezawa A, Hasegawa A, Inoue M, Tanuma-Takahashi A, Kajiwara K, Makino H, et al. Amnion-derived cells as a reliable resource for next-generation regenerative medicine. *Placenta*. 2019. pii: S0143-4004(19)30027-X. doi: 10.1016/j.placenta.2019.06.381.
21. Meng X, Sun B, Xiao Z. Comparison in transcriptome and cytokine profiles of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and cord blood. *Gene*. 2019. pii: S0378-1119(19)30132-5. doi: 10.1016/j.gene.2019.02.017.
22. Alanazi A, Munir H, Alassiri M, Ward LSC, McGettrick HM, Nash GB. Comparative adhesive and migratory properties of mesenchymal stem cells from different tissues. *Biorheology*. 2019. doi: 10.3233/BIR-180185.
23. Wu R, Hu X, Wang J. Concise Review: Optimized Strategies for Stem Cell-Based Therapy in Myocardial Repair: Clinical Translatability and Potential Limitation. *Stem Cells*. 2018. doi: 10.1002/stem.2778.

24. Thaweesapphithak S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, Tantikanlayaporn D, Roytrakul S, Manochantr S. Human serum enhances the proliferative capacity and immunomodulatory property of MSCs derived from human placenta and umbilical cord. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10(1):79. doi: 10.1186/s13287-019-1175-3.
25. Davies LB, Jones RH, Thornton CA. Maternal serum, an isolation and expansion tool for umbilical cord matrix mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019. doi: 10.1089/ten.TEC.2019.0008.
26. Pineault N, Abu-Khader A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol.* 2015; 43(7):498-513.
27. Oliver-Vila I, Coca MI, Grau-Vorster M, Pujals-Fonts N, Caminal M, Casamayor-Genescà A, et al. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. *Cytotherapy.* 2016;18(1):25-35. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.001.
28. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, Yan XY, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015; 13:162. doi: 10.1186/s12916-015-0399-z.
29. Banerjee MN, Bolli R, Hare JM. Clinical Studies of Cell Therapy in Cardiovascular Medicine: Recent Developments and Future Directions. *Circ Res.* 2018; 123(2):266-287.
30. Bassetti B, Nigro P, Catto V, Cavallotti L, Righetti S, Achilli F, et al. Cell Therapy for Refractory Angina: A Reappraisal. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:5648690. doi: 10.1155/2017/5648690.

31. Henry TD, Losordo DW, Traverse JH, Schatz RA, Jolicoeur EM, Schaer GL, et al. Autologous CD34+ cell therapy improves exercise capacity, angina frequency and reduces mortality in no-option refractory angina: a patient-level pooled analysis of randomized double-blinded trials. *Eur Heart J*. 2018. doi: 10.1093/eurheartj/ehx764.
32. Jones DA, Weeraman D, Colicchia M, Hussain MA, Veerapen D, Andiapen M, et al. Impact of Cell Therapy on Cardiovascular Outcomes in Patients With Refractory Angina: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Circ Res*. 2019. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314118.
33. Velagapudi P, Turagam M, Kolte D, Khera S, Hyder O, Gordon P, et al. Intramyocardial autologous CD34+ cell therapy for refractory angina: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cardiovasc Revasc Med*. 2019; 20(3):215-219. doi: 10.1016/j.carrev.2018.05.018.
34. Qi Z, Liu S, Duan F. Effects of bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel in patients with previous myocardial infarction and chronic heart failure: An echocardiographic study of left ventricular dyssynchrony. *J Clin Ultrasound*. 2018; 46(8):512-518.
35. Yang M, Xu Q, Liu B, Chen X, Li Y. Methodological exploration of bone marrow stem cell therapy in acute myocardial infarction - how to achieve greater benefit on cardiac outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Adv Clin Exp Med*. 2018; 27(1):21-37. doi: 10.17219/acem/66385.
36. Kandaswamy E, Zuo L. Recent Advances in Treatment of Coronary Artery Disease: Role of Science and Technology. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2). pii: E424. doi: 10.3390/ijms19020424.

37. Fernández-Avilés F, Sanz-Ruiz R, Bogaert J, Casado Plasencia A, Gilaberte I, Belmans A, et al. Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: A Multicenter Randomized, Double-Blind and Placebo-Controlled Clinical Trial. *Circ Res*. 2018. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312823.

38. Nicolau JC, Furtado RHM, Silva SA, Rochitte CE, Rassi A Jr, Moraes JBMC Jr, et al. MiHeart/AMI Investigators. Stem-cell therapy in ST-segment elevation myocardial infarction with reduced ejection fraction: A multicenter, double-blind randomized trial. *Clin Cardiol*. 2018 Mar;41(3):392-399. doi: 10.1002/clc.22882.

39. Michler RE. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. *J Card Surg*. 2018 Sep;33(9):520-531. doi: 10.1111/jocs.13789.

40. Lalu MM, Mazzarello S, Zlepzig J, Dong YYR, Montroy J, McIntyre L, et al. Safety and Efficacy of Adult Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction and Ischemic Heart Failure (SafeCell Heart): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med*. 2018; 7(12):857-866.

41. Wen Y, Ding J, Zhang B, Gao Q. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy for nonischemic dilated cardiomyopathy-A meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48(4). doi: 10.1111/eci.12894.

42. Wang C, Li J, Zhang B, Li Y. Safety and efficacy of bone marrow-derived cells therapy on cardiomyopathy: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):137. doi: 10.1186/s13287-019-1238-5.

43. Fan M, Huang Y, Chen Z, Xia Y, Chen A, Lu D, et al. Efficacy of mesenchymal stem cell therapy in systolic heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):150. doi: 10.1186/s13287-019-1258-1.

44. Wang YH, Wu DB, Chen B, Chen EQ, Tang H. Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1):227. doi: 10.1186/s13287-018-0972-4.
45. Zhang J, Zhao X, Liang L, Li J, Demirci U, Wang S. A decade of progress in liver regenerative medicine. *Biomaterials.* 2018; 157:161-176. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.027.
46. Lin BL, Chen JF, Qiu WH, Wang KW, Xie DY, Chen XY, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: A randomized controlled trial. *Hepatology.* 2017; 66(1):209-219. doi: 10.1002/hep.29189.
47. Zhou C, Wang W, Mu Y. Allogeneic mesenchymal stem cells therapy for the treatment of HBV related acute-on-chronic liver failure. *Hepatology.* 2018. doi: 10.1002/hep.30181.
48. Guo C, Guo G, Zhou X, Chen Y, Han Z, Yang C, et al. Long-term Outcomes of Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients with Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018. doi: 10.1016/j.cgh.2018.10.034.
49. Lee CW, Chen YF, Wu HH, Lee OK. Historical Perspectives and Advances in Mesenchymal Stem Cell Research for the Treatment of Liver Diseases. *Gastroenterology.* 2018; 154(1):46-56. doi: 10.1053/j.gastro.2017.09.049.
50. Yu YB, Song Y, Chen Y, Zhang F, Qi FZ. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2018; 18(2):2009-2016.
51. Ma XR, Tang YL, Xuan M, Chang Z, Wang XY, Liang XH. Transplantation of autologous mesenchymal stem cells for end-stage liver cirrhosis: a meta-analysis based on seven

controlled trials. *Gastroenterol Res Pract.* 2015; 2015:908275. doi:10.1155/2015/908275.

52. Fang XQ, Zhang JF, Song HY, Chen ZL, Dong J, Chen X, Pan JJ, Liu B, Chen CX. Effect of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on immune function and prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2016 Dec 20; 24(12):907-910. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.12.006. (abstract).

53. Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, et al. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis. *Hepatology.* 2016; 64(6):2185-2197. doi: 10.1002/hep.28693.

54. Esmailzadeh A, Ommati H, Kooshyar MM, Jarahi L, Akhavan Rezayat K, Saberi S, et al. Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation in Liver Cirrhosis after Correcting Nutritional Anomalies, A Controlled Clinical Study. *Cell J.* 2019; 21(3):268-273. doi: 10.22074/cellj.2019.6108.

55. Kong LZ, Chandimali N, Han YH, Lee DH, Kim JS, Kim SU, et al. Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(11). pii: E2712. doi: 10.3390/ijms20112712.

56. Ranmuthu CDS, Ranmuthu CKI, Khan WS. Evaluating the Current Literature on Treatments Containing Adipose-Derived Stem Cells for Osteoarthritis: a Progress Update. *Curr Rheumatol Rep.* 2018; 20(11):67. doi: 10.1007/s11926-018-0776-7.

57. Cianca JC, Jayaram P. Musculoskeletal Injuries and Regenerative Medicine in the Elderly Patient. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2017; 28(4):777-794. doi: 10.1016/j.pmr.2017.06.010.

58. Yubo M, Yanyan L, Li L, Tao S, Bo L, Lin C. Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175449. doi: 10.1371/journal.pone.0175449.

59. Awad ME, Hussein KA, Helwa I, Abdelsamid MF, Aguilar-Perez A, Mohsen I, et al. Meta-Analysis and Evidence Base for the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Knee Cartilage Repair: Methodological Guidelines and Quality Assessment. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:3826054. doi: 10.1155/2019/3826054.

60. Xing D, Wang Q, Yang Z, Hou Y, Zhang W, Chen Y, Lin J. Mesenchymal stem cells injections for knee osteoarthritis: a systematic overview. *Rheumatol Int*. 2017. doi: 10.1007/s00296-017-3906-z.

61. Fernández-Jaén T, Rey GÁ, Angulo F, Cuesta JA, Loureda RA, España FÁ, Ayala J, et al. Spanish Consensus Statement: Clinical Management and Treatment of Tendinopathies in Sport. *Orthop J Sports Med*. 2017; 5(10):2325967117734127. doi: 10.1177/2325967117734127.

62. Lee SY, Kim W, Lim C, Chung SG. Treatment of Lateral Epicondylitis by Using Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study. *Stem Cells*. 2015; 33(10):2995-3005. doi: 10.1002/stem.2110.

63. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, Oh S, Kim PS, Yoon JY, et al. Intratendinous Injection of Autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells for the treatment of rotator cuff disease: A first-in-human trial. *Stem Cells*. 2018. doi: 10.1002/stem.2855.

64. Smith LJ, Silverman L, Sakai D, Le Maitre CL, Mauck RL, Malhotra NR, et al. Advancing cell therapies for intervertebral disc regeneration from the lab to the clinic: Recommendations of

the ORS spine section. *JOR Spine*. 2018; 1(4): e1036. doi: 10.1002/jsp2.1036.

65. Noriega DC, Ardura F, Hernández-Ramajo R, Martín-Ferrero MÁ, Sánchez-Lite I, Toribio B, et al. Intervertebral Disc Repair by Allogeneic Mesenchymal Bone Marrow Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation*. 2017; 101(8):1945-1951. doi: 10.1097/TP.0000000000001484.

66. Kumar H, Ha DH, Lee EJ, Park JH, Shim JH, Ahn TK, et al. Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8(1):262. doi: 10.1186/s13287-017-0710-3.

67. Comella K, Silbert R, Parlo M. Effects of the intradiscal implantation of stromal vascular fraction plus platelet rich plasma in patients with degenerative disc disease. *J Transl Med*. 2017; 15(1):12. doi: 10.1186/s12967-016-1109-0.

68. Migliorini F, Rath B, Tingart M, Baroncini A, Quack V, Eschweiler J. Autogenic mesenchymal stem cells for intervertebral disc regeneration. *Int Orthop*. 2019; 43(4):1027-1036. doi: 10.1007/s00264-018-4218-y.

69. Verboket R, Leiblein M, Seebach C, Nau C, Janko M, Bellen M, et al. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects: from bench to bedside. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018. doi: 10.1007/s00068-018-0906-y.

70. Hostettler KE, Gazdhar A, Khan P, Savic S, Tamo L, Lardinois D, et al. Multipotent mesenchymal stem cells in lung fibrosis. *PLoS One*. 2017; 12(8): e0181946. doi: 10.1371/journal.pone.0181946.

71. Ding XF, Liang HY, Yuan B, Li LF, Wang T, Kan QC, et al. Efficacy of stem cell therapy for pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10(1):55. doi: 10.1186/s13287-019-1162-8.
72. Glassberg MK, Minkiewicz J, Toonkel RL, Simonet ES, Rubio GA, DiFede D, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial. *Chest.* 2017; 151(5):971-981. doi: 10.1016/j.chest.2016.10.061.
73. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest.* 2013; 143(6):1590-1598. doi: 10.1378/chest.12-2094.
74. Antunes MA, Lapa E Silva JR, Rocco PR. Mesenchymal stromal cell therapy in COPD: from bench to bedside. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017; 12:3017-3027. doi: 10.2147/COPD.S146671.
75. Janczewski AM, Wojtkiewicz J, Malinowska E, Doboszyńska A. Can Youthful Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Bring a Breath of Fresh Air for COPD? *Int J Mol Sci.* 2017; 18(11). pii: E2449. doi: 10.3390/ijms18112449.
76. Armitage J, Tan DBA, Troedson R, Young P, Lam KV, Shaw K, et al. Mesenchymal stromal cell infusion modulates systemic immunological responses in stable COPD patients: a phase I pilot study. *Eur Respir J.* 2018; 51(3). pii: 1702369. doi: 10.1183/13993003.02369-2017.
77. Lightner AL, Wang Z, Zubair AC, Dozois EJ. A Systematic Review and Meta-analysis of Mesenchymal Stem Cell Injections for the Treatment of Perianal Crohn's Disease: Progress Made and Future Directions. *Dis Colon Rectum.* 2018; 61(5):629-640. doi: 10.1097/DCR.0000000000001093.

78. Lightner AL. Stem Cell Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2019; 21(4):16. doi: 10.1007/s11894-019-0672-y.
79. Lazebnik LB, Kniazev OV, Konopliannikov AG, Parfenov AI, Ruchkina IN, Mikhailova ZF, et al. Allogeneic mesenchymal stromal cells in patients with ulcerative colitis: two years of observation. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2010; (11):3-15.
80. Turse EP, Dailey FE, Naseer M, Partyka EK, Bragg JD, Tahan V. Stem cells for luminal, fistulizing, and perianal inflammatory bowel disease: a comprehensive updated review of the literature. *Stem Cells Cloning.* 2018 Nov 27; 11:95-113. doi: 10.2147/SCCAA.S135414.
81. Giuffrida P, Cococcia S, Delliponti M, Lenti MV, Di Sabatino A. Controlling Gut Inflammation by Restoring Anti-Inflammatory Pathways in Inflammatory Bowel Disease. *Cells.* 2019; 8(5). pii: E397. doi: 10.3390/cells8050397.
82. Peng BY, Dubey NK, Mishra VK, Tsai FC, Dubey R, Deng WP, et al. Addressing Stem Cell Therapeutic Approaches in Pathobiology of Diabetes and Its Complications. *J Diabetes Res.* 2018; 2018:7806435. doi: 10.1155/2018/7806435.
83. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Approach for Diabetes and Pancreatic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(9). pii: E2783. doi: 10.3390/ijms19092783.
84. Hu J, Wang Y, Gong H, Yu C, Guo C, Wang F, et al. Longterm effect and safety of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 2 diabetes. *Exp Ther Med.* 2016; 12(3):1857-1866.
85. Páth G, Perakakis N, Mantzoros CS, Seufert J. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus - focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism.* 2018. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.005.

86. Cho J, D'Antuono M, Glicksman M, Wang J, Jonklaas J. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Stem Cells*. 2018; 7(4):82-93.
87. Guo XJ, Li FJ, He YZ, Hou SF, Zhu HB, Cheng Y, et al. Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus: An Updated Meta-Analysis. *Diabetes Ther*. 2019. doi: 10.1007/s13300-019-0578-6.
88. Zhuang Q, Ma R, Yin Y, Lan T, Yu M, Ming Y. Mesenchymal Stem Cells in Renal Fibrosis: The Flame of Cytotherapy. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:8387350. doi: 10.1155/2019/8387350.
89. Li H, Rong P, Ma X, Nie W, Chen C, Yang C, Zhang J, Dong Q, Wang W. Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy. *Life Sci*. 2018; 215:113-118.
90. Barbado J, Tabera S, Sánchez A, García-Sancho J. Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis. *Lupus*. 2018; 27(13):2161-2165.
91. Villanueva S, González F, Lorca E, Tapia A, López G V, Strodthoff R, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in patients with chronic kidney disease: A pilot study assessing safety and clinical feasibility. *Kidney Res Clin Pract*. 2019. doi: 10.23876/j.krcp.18.0139.
92. Zhang Y, Zhang Y, Chen Q, Tang G, Zhang W, Yang J, et al. Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation improves the survival of intermediate-risk acute myeloid leukemia patients aged less than 60 years. *Ann Hematol*. 2019. doi: 10.1007/s00277-018-3584-2.

93. Gonzaga VF, Wenceslau CV, Lisboa GS, Frare EO, Kerkis I. Mesenchymal Stem Cell Benefits Observed in Bone Marrow Failure and Acquired Aplastic Anemia. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:8076529. doi: 10.1155/2017/8076529.
94. Kallekleiv M, Larun L, Bruserud Ø, Hatfield KJ. Co-transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* 2016; 18(2):172-85. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.11.010.
95. Kordelas L, da Silva Nardi F, Wagner B, Ditschkowski M, Liebregts T, Lindemann M, et al. Elevated soluble human leukocyte antigen G levels in patients after allogeneic stem cell transplantation are associated with less severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2018. doi: 10.1038/s41409-018-0145-1.
96. Gao L, Zhang Y, Hu B, Liu J, Kong P, Lou S, et al. Phase II Multicenter, Randomized, Double-Blind Controlled Study of Efficacy and Safety of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in the Prophylaxis of Chronic Graft-Versus-Host Disease After HLA-Haploidentical Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2016; 34(24):2843-50. doi: 10.1200/JCO.2015.65.3642.
97. Goto T, Murata M, Terakura S, Nishida T, Adachi Y, Ushijima Y, et al. Phase I study of cord blood transplantation with intrabone marrow injection of mesenchymal stem cells: A clinical study protocol. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(17): e0449. doi: 10.1097/MD.0000000000010449.
98. Wang L, Zhu CY, Ma DX, Gu ZY, Xu CC, Wang FY, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Hematol.* 2018; 97(10):1941-1950.

99. Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, et al. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(1):196-202. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208918.

100. Ghoryani M, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Ghasemi A, Poursamimi J, Mohammadi M. Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A successful clinical trial in Iran. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109:1834-1840. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.056.

101. Luque-Campos N, Contreras-López RA, Jose Paredes-Martínez M, Torres MJ, Bahraoui S, Wei M, Espinoza F, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. *Front Immunol.* 2019; 10:798. doi: 10.3389/fimmu.2019.00798.

102. Wang P, Li Y, Huang L, Yang J, Yang R, Deng W, et al. Effects and safety of allogeneic mesenchymal stem cell intravenous infusion in active ankylosing spondylitis patients who failed NSAIDs: a 20-week clinical trial. *Cell Transplant.* 2014; 23(10):1293-303. doi: 10.3727/096368913X667727.

103. Abdolmohammadi K, Pakdel FD, Aghaei H, Assadiasl S, Fatahi Y, Rouzbahani NH, et al. Ankylosing spondylitis and mesenchymal stromal/stem cell therapy: a new therapeutic approach. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109:1196-1205. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.137.

104. Wang S, Zhu R, Li H, Li J, Han Q, Zhao RC. Mesenchymal stem cells and immune disorders: from basic science to clinical transition. *Front Med.* 2018. doi: 10.1007/s11684-018-0627-y.

105. Wang D, Zhang H, Liang J, Wang H, Hua B, Feng X, et al. A Long-Term Follow-Up Study of Allogeneic Mesenchymal Stem/Stromal Cell Transplantation in Patients with Drug-Resistant Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cell Reports*. 2018 Mar 13; 10(3):933-941.

106. Liang J, Zhang H, Kong W, Deng W, Wang D, Feng X, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1):312. doi: 10.1186/s13287-018-1053-4.

07. Wen L, Labopin M, Badoglio M, Wang D, Sun L, Farge-Bancel D. Prognostic Factors for Clinical Response in Systemic Lupus Erythematosus Patients Treated by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:7061408. doi: 10.1155/2019/7061408.

108. Peltzer J, Aletti M, Frescaline N, Busson E, Lataillade JJ, Martinaud C. Mesenchymal Stromal Cells Based Therapy in Systemic Sclerosis: Rational and Challenges. *Front Immunol*. 2018; 9:2013. doi: 10.3389/fimmu.2018.02013.

109. Rozier P, Maria A, Goulabchand R, Jorgensen C, Guilpain P, Noël D. Mesenchymal Stem Cells in Systemic Sclerosis: Allogenic or Autologous Approaches for Therapeutic Use? *Front Immunol*. 2018; 9:2938. doi: 10.3389/fimmu.2018.02938.

110. Pawlak-Buś K, Schmidt W, Olejarz M, Czyż A, Komarnicki M, Leszczyński P. Autologous hematopoietic stem cell transplant for progressive diffuse systemic sclerosis: procedural success and clinical outcome in 5-year follow-up. *Reumatologia*. 2019; 57(1):50-54. doi: 10.5114/reum.2019.83240.

111. Gernert M, Tony HP, Schwaneck EC, Gadeholt O, Schmalzing M. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic

sclerosis induces long-lasting changes in B cell homeostasis toward an anti-inflammatory B cell cytokine pattern. *Arthritis Res Ther.* 2019; 21(1):106. doi: 10.1186/s13075-019-1889-8.

112. Huang L, Wang G. The Effects of Different Factors on the Behavior of Neural Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:9497325. doi: 10.1155/2017/9497325.

113. Wilson JJ, Foyle K, Foeng J, Norton T, McKenzie DR, Payne N, et al. Redirecting adult mesenchymal stromal cells to the brain: a new approach for treating CNS autoimmunity and neuroinflammation? *Immunol Cell Biol.* 2018. doi: 10.1111/imcb.12014.

114. Scolding NJ, Pasquini M, Reingold SC, Cohen JA. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Brain.* 2017; 140(11):2776-2796. doi: 10.1093/brain/awx154.

115. McDonald CA, Djuliannisaa Z, Petraki M, Paton MCB, Penny TR, Sutherland AE, et al. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stromal Cells Protects against Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(10). pii: E2449. doi: 10.3390/ijms20102449.

116. Tamanini S, Comi GP, Corti S. In Vivo Transient and Partial Cell Reprogramming to Pluripotency as a Therapeutic Tool for Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2018. doi: 10.1007/s12035-018-0888-0.

117. Fang J, Guo Y, Tan S, Li Z, Xie H, Chen P, et al. Autologous Endothelial Progenitor Cells Transplantation for Acute Ischemic Stroke: A 4-Year Follow-Up Study. *Stem Cells Transl Med.* 2018. doi: 10.1002/sctm.18-0012.

118. Kenmuir CL, Wechsler LR. Update on cell therapy for stroke. *Stroke Vasc Neurol.* 2017; 2(2):59-64. doi: 10.1136/svn-2017-000070.

119. Deng L, Peng Q, Wang H, Pan J, Zhou Y, Pan K, et al. Intrathecal Injection of Allogenic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Treatment of Patients with Severe Ischemic Stroke: Study Protocol for a Randomized Controlled Observer-Blinded Trial. *Transl Stroke Res.* 2019; 10(2):170-177. doi: 10.1007/s12975-018-0634-y.
120. Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, Bahrami S, Niknejad H. Potential Therapeutic Features of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Immunomodulation, Inflammation Suppression, Angiogenesis Promotion, Oxidative Stress Inhibition, Neurogenesis Induction, MMPs Regulation, and Remyelination Stimulation. *Front Immunol.* 2019; 10:238. doi: 10.3389/fimmu.2019.00238.
121. Watanabe TK. A Review of Stem Cell Therapy for Acquired Brain Injuries and Neurodegenerative Central Nervous System Diseases. *PM R.* 2018; 10(9S2): S151-S156.
122. Cohen JA, Baldassari LE, Atkins HL, Bowen JD, Bredeson C, Carpenter PA, et al. Autologous hematopoietic cell transplantation for treatment-refractory relapsing multiple sclerosis: position statement from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.02.014.
123. Barczewska M, Grudniak M, Maksymowicz S, Siwek T, Ołdak T, Jezierska-Woźniak K, et al. Safety of intrathecal injection of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Neural Regen Res.* 2019; 14(2):313-318.
124. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Stem Cells Int.* 2019; 3675627. doi: 10.1155/2019/3675627.

125. Nabavi SM, Arab L, Jarooghi N, Bolurieh T, Abbasi F, Mardpour S, et al. Safety, Feasibility of Intravenous and Intrathecal Injection of Autologous Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Open Label Phase I Clinical Trial. *Cell J.* 2019; 20(4):592-598. doi: 10.22074/cellj.2019.5370.

126. Takahasi J. Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen Med.* 2019. doi: 10.2217/rme-2018-0158).

127. Stoddard-Bennett T, Reijo Pera R. Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells.* 2019; 8(1). pii: E26. doi: 10.3390/cells8010026.

128. Madrazo I, Kopyov O, Ávila-Rodríguez MA, Ostrosky F, Carrasco H, Kopyov A, et al. Transplantation of Human Neural Progenitor Cells (NPC) into Putamina of Parkinsonian Patients: A Case Series Study, Safety and Efficacy Four Years after Surgery. *Cell Transplant.* 2018: 963689718820271. doi: 10.1177/0963689718820271.

129. Weston NM, Sun D. The Potential of Stem Cells in Treatment of Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018; 18(1):1. doi: 10.1007/s11910-018-0812-z.

130. Liu S, Schackel T, Weidner N, Puttagunta R. Biomaterial-Supported Cell Transplantation Treatments for Spinal Cord Injury: Challenges and Perspectives. *Front Cell Neurosci.* 2018; 11:430. doi: 10.3389/fncel.2017.00430.

131. Vaquero J, Zurita M, Rico MA, Bonilla C, Aguayo C, Fernández C, et al. Repeated subarachnoid administrations of autologous mesenchymal stromal cells supported in autologous plasma improve quality of life in patients suffering incomplete

spinal cord injury. *Cytotherapy*. 2017; 19(3):349-359. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.12.002.

132. Huang L, Zhang C, Gu J, Wu W, Shen Z, Zhou X, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Infusion for Children With Cerebral Palsy. *Cell Transplant*. 2018; 27(2):325-334. doi: 10.1177/0963689717729379.

133. Nguyen TL, Nguyen HP, Nguyen TK. The effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on the quality of life of children with cerebral palsy. *Health Qual Life Outcomes*. 2018; 16(1):164. doi: 10.1186/s12955-018-0992-x.

134. Novak I, Walker K, Hunt RW, Wallace EM, Fahey M, Badawi N. Concise Review: Stem Cell Interventions for People With Cerebral Palsy: Systematic Review With Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5(8):1014-25. doi:10.5966/sctm.2015-0372.

135. Wu AY, Daniel MG. Using stem cell biology to study and treat ophthalmologic and oculoplastic diseases. *Taiwan J Ophthalmol*. 2017; 7(2):77-81. doi: 10.4103/tjo.tjo_16_17.

136. Yin J, Jurkunas U. Limbal Stem Cell Transplantation and Complications. *Semin Ophthalmol*. 2018; 33(1):134-141. doi: 10.1080/08820538.2017.1353834.

137. Schulman IH, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Aging Frailty. *Front Nutr*. 2018; 5:108. doi: 10.3389/fnut.2018.00108.

138. Golpanian S, DiFede DL, Khan A, Schulman IH, Landin AM, Tompkins BA, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Infusions for Aging Frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 72(11):1505-1512. doi: 10.1093/gerona/glx056.

139. Sun X, Hao Q, Tang R, Xiao C, Ge M, Dong B. Frailty and Rejuvenation with Stem Cells: Therapeutic Opportunities and Clinical Challenges. *Rejuvenation Res.* 2019. doi: 10.1089/rej.2017.2048.
140. Tompkins BA, DiFede DL, Khan A, Landin AM, Schulman IH, Pujol MV, et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Aging Frailty: A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72(11):1513-1522. doi: 10.1093/gerona/glx137.
141. Sun XL, Hao QK, Tang RJ, Xiao C, Ge ML, Dong BR. Frailty and Rejuvenation with Stem Cells: Therapeutic Opportunities and Clinical Challenges. *Rejuvenation Res.* 2019. doi: 10.1089/rej.2017.2048.
142. Walston J, Bandeen-Roche K, Buta B, Bergman H, Gill TM, Morley JE, et al. Moving Frailty Toward Clinical Practice: NIA Intramural Frailty Science Symposium Summary. *J Am Geriatr Soc.* 2019. doi:10.1111/jgs.15928.
143. Florea V, Bagno L, Rieger AC, Hare J. Attenuation of frailty in older adults with mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev.* 2019:111120. doi: 10.1016/j.mad.2019.111120.
144. Guo J, Dardik A, Fang K, Huang R, Gu Y. Meta-analysis on the treatment of diabetic foot ulcers with autologous stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1):228. doi: 10.1186/s13287-017-0683-2.
145. Jiang X, Zhang H, Teng M. Effectiveness of Autologous Stem Cell Therapy for the Treatment of Lower Extremity Ulcers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(11): e2716. doi: 10.1097/MD.0000000000002716.

146. Chen Y, Ma Y, Li N, Wang H, Chen B, Liang Z, et al. Efficacy and long-term longitudinal follow-up of bone marrow mesenchymal cell transplantation therapy in a diabetic patient with recurrent lower limb bullous diabeticorum. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1):99. doi:10.1186/s13287-018-0854-9.
147. Golchin A, Farahany TZ, Khojasteh A, Soleimanifar F, Ardeshiryajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019; 14(1):22-33. doi: 10.2174/1574888X13666180913123424.
148. Niezgoda A, Niezgoda P, Nowowiejska L, Białecka A, Męcińska-Jundziłł K, Adamska U, Czajkowski R. Properties of skin stem cells and their potential clinical applications in modern dermatology. *Eur J Dermatol.* 2017; 27(3):227-236. doi: 10.1684/ejd.2017.2988.
149. Taub AF, Pham K. Stem Cells in Dermatology and Anti-aging Care of the Skin. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018; 26(4):425-437.
150. Liang ZJ, Lu X, Li DQ, Liang YD, Zhu DD, Wu FX, Yi XL, et al. Precise Intradermal Injection of Nanofat-Derived Stromal Cells Combined with Platelet-Rich Fibrin Improves the Efficacy of Facial Skin Rejuvenation. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 47(1):316-329.
151. Semsarzadeh N, Khetarpal S. Platelet-Rich Plasma and Stem Cells for Hair Growth: A Review of the Literature. *Aesthet Surg J.* 2019. pii: sjz146. doi: 10.1093/asj/sjz146.
152. Epstein GK, Epstein JS. Mesenchymal Stem Cells and Stromal Vascular Fraction for Hair Loss: Current Status. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018; 26(4):503-511.

153. Zamani M, Yaghoubi Y, Movassaghpour A, Shakouri K, Mehdizadeh A, Pishgahi A, et al. Novel therapeutic approaches in utilizing platelet lysate in regenerative medicine: Are we ready for clinical use? *J Cell Physiol.* 2019; 234(10):17172-17186. doi: 10.1002/jcp.28496.

154. International Cellular Medicine Society (ICMS). Platelet Rich Plasma (PRP) Guidelines, 2011.

155. Grange C, Iampietro C, Bussolati B. Stem cell extracellular vesicles and kidney injury. *Stem Cell Investig.* 2017; 4:90. doi: 10.21037/sci.2017.11.02

156. Barile L, Milano G, Vassalli G. Beneficial effects of exosomes secreted by cardiac-derived progenitor cells and other cell types in myocardial ischemia. *Stem Cell Investig.* 2017; 4:93. doi: 10.21037/sci.2017.11.06.

157. Bian X, Ma K, Zhang C, Fu X. Therapeutic angiogenesis using stem cell-derived extracellular vesicles: an emerging approach for treatment of ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10(1):158. doi: 10.1186/s13287-019-1276-z

158. Lener T, Gimona M, Aigner L, Borger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials—an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015; 4:30087. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.30087>

159. Jafari D, Malih S, Eslami SS, Jafari R, Darzi L, Tarighi P, et al. The relationship between molecular content of mesenchymal stem cells derived exosomes and their potentials: opening the way for exosomes based therapeutics. *Biochimie.* 2019. pii: S0300-9084(19)30200-7. doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.009

160. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome:

Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol.* 2018; 9:2837. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837.

161. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells.* 2019; 8(5). pii: E467. doi: 10.3390/cells8050467.

162. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, Movassaghpour A, Yousefi M. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A novel therapeutic paradigm. *J Cell Physiol.* 2019 Jun 28. doi: 10.1002/jcp.29004.

163. Rohde E, Pachler K, Gimona M. Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. *Cytotherapy.* 2019. pii: S1465-3249(19)30008-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.12.006

Biomateriales y su aplicación en el campo de la Salud

Heidy Catalina Navia, Augusto Zuluaga-Vélez, Diego Fernando Combita-Merchán, Yeidy Viviana Arias, Lina Marcela Orozco, Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

Para los próximos diez años, se espera que la industria de los biomateriales tenga un gran crecimiento productivo y económico debido a sus potenciales usos en el campo de la salud. Un biomaterial se define como una sustancia de origen natural (cómo el colágeno u otra proteína) o sintético (cómo algún metal o cerámica) que puede ser implantado en el cuerpo, con el objetivo de reemplazar o reparar un tejido u órgano alterados. Además, pueden ser usados en componentes, piezas o aparatos, como los marcapasos, lentes o miembros artificiales. Para cumplir estas funciones requiere cumplir con ciertas características:

- *Compatibilidad biológica (biocompatibilidad)*: Que el cuerpo no los rechace ni le cause daño.
- *Estabilidad química*: Que no se degrade rápido y que los productos de degradación no se conviertan en sustancias tóxicas.
- *Resistencia mecánica*: Que no se fracture fácilmente.
- *Carecer de toxicidad*: Que no dañe otras partes del cuerpo.

Al principio, eran casi en su totalidad de origen sintético, y eran seleccionados con criterios menos rigurosos en cuanto a compatibilidad biológica, sin embargo, actualmente la gran mayoría son diseñados, procesados y sintetizados con el único fin de aplicarse en el campo de la salud. Hoy en día son muchas las personas en el mundo que de una u otra manera hacen uso de los

biomateriales en su cuerpo, lo que ha permitido mejorar alguna función en el organismo o incluso la sustitución de algún órgano, con una consecuente mejora en su calidad de vida.

Un ejemplo muy común de su aplicación es cuando un tejido u órgano se daña, como en el caso de una válvula cardíaca enferma y es posible restaurarla o reemplazarla con una válvula elaborada en algún biomaterial, que puede asumir su función de manera similar. Sin embargo, cabe aclarar que hay tejidos u órganos cuya función no puede reemplazarse ni con un biomaterial. Existen dos clases de injertos dónde los biomateriales pueden estar presentes, los bio-inertes que no tienen ninguna influencia o una muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean, y los bioactivos que pueden enlazarse a los tejidos vivos e interactuar con ellos. En este capítulo, daremos un vistazo general sobre la medicina regenerativa que es de dónde nace la necesidad de los biomateriales en el campo de la salud para luego centrarnos en el uso de los biomateriales en el Sector Salud.

Medicina regenerativa

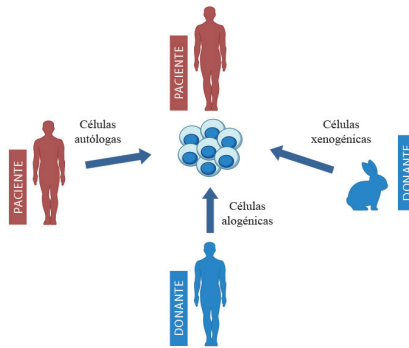
Cuando los tejidos de nuestro cuerpo sufren daños podría pensarse que, para ayudar a repararlos y obtener una buena cicatrización o regeneración del mismo, sería suficiente tomar células del mismo tejido e insertarlas directamente en el sitio de la lesión o simplemente esperar a que el cuerpo cicatrice sólo. Se podría realizar alguna acción de estas, pero ello no asegura ningún éxito, pues la posibilidad de mantener células vivas en el área afectada depende de la clase de célula y el ambiente propio del tejido ¹, cómo su ubicación y el tipo de lesión. En su estado natural, las células se ubican en un medio adecuado, rodeadas de otras células y de su entorno exterior llamado la matriz extracelular, un entorno que soporta a las células, les permite proliferar (reproducirse y expandirse) y mantener su función.

Con el conocimiento sobre las células y los tejidos y gracias a los avances en biología, medicina e ingeniería, existe un campo que abarca muchas disciplinas llamado medicina regenerativa, que se enfoca en reemplazar los tejidos perdidos u órganos dañados con el objetivo de restaurar su función ^{2,3}. Por lo regular, la aplicación de la medicina regenerativa se lleva a cabo en 5 pasos:

1. Una muestra de células se extrae del cuerpo del paciente.
2. Las células se cultivan en el laboratorio, para obtener más células.
3. Las células obtenidas se transfieren a unas estructuras especiales que tienen poros, llamadas soportes, junto con diferentes moléculas, que las ayudan a unirse al soporte y facilitan su división celular.
4. Se vuelve a realizar un cultivo para aumentar el número de células ahora dentro de los soportes.
5. Por último, el soporte que ya se asemejaría bastante al tejido que se pretende regenerar, se implanta en el sitio de la lesión para que se integre con el tejido natural ⁴.

Los tejidos representan la unión estructural y funcional de un grupo de células, las cuales son responsables de su mantenimiento, recuperación y regeneración, además de cumplir las funciones propias en el organismo. Estas pueden obtenerse de diversas fuentes (**Figura 3.8**), aunque para las terapias se prefiere que las células provengan del mismo paciente (se les llaman células autólogas), o en caso contrario pueden provenir de otros pacientes (células alogénicas o heterólogas) e incluso de otros animales (células xenogénicas), sin embargo, estas dos últimas podrían ser rechazadas por el sistema inmune del paciente.

Figura 3.8. Origen de las células para el tratamiento en medicina regenerativa.

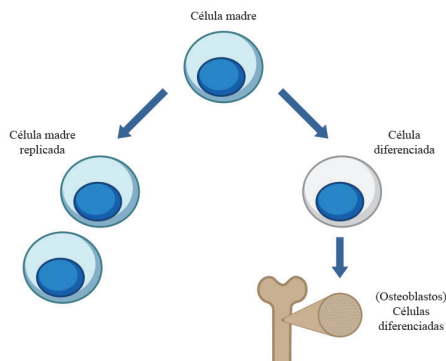


Fuente: elaboración propia.

Las células empleadas pueden ser de dos grandes tipos (**Figura 3.9**):

1. *Células madre*: Son la base de la formación de todos los órganos y tejidos de nuestro cuerpo. Pueden auto-replicarse (hacer copias de ellas mismas) y diferenciarse (convertirse en células especializadas)
2. *Células diferenciadas*: son células madre que se convierten en células especializadas con una función específica.

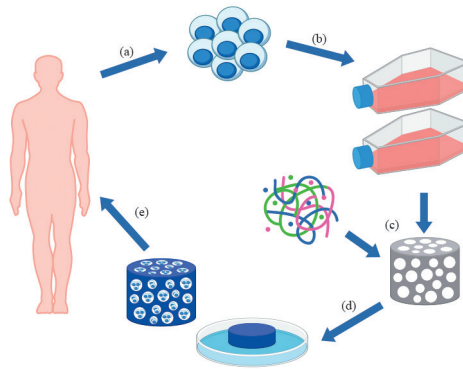
Figura 3.9. Representación de una célula madre y una célula diferenciada a hueso.



Fuente: elaboración propia.

En medicina regenerativa se prefieren emplear células madre gracias a que son capaces de dar origen a diferentes tipos de células, en un proceso conocido como *diferenciación celular* donde las células adquieren una forma y función determinada, pueden crecer sobre un soporte adecuado y finalmente implantarse en el sitio requerido con el fin de regenerar el tejido u órgano (**Figura 3.10**).

Figura 3.10. Ciclo típico en medicina regenerativa. (a) Una pequeña cantidad de células se aíslan del cuerpo humano. (b) Las células se cultivan para producir más células. (c) Estas células se siembran sobre los soportes porosos junto con moléculas que ayudan a su crecimiento. (d) Los soportes se cultivan a su vez para incrementar el número de células. (e) Finalmente, el tejido regenerado se implanta en el sitio del defecto para integrarse con el tejido natural.



Adaptado de Mi y colaboradores ⁵.

Las biomoléculas (moléculas presentes únicamente en los seres vivos) modifican el funcionamiento y el comportamiento de las células que se ubican sobre el soporte. Son determinantes para lograr el éxito del trasplante al ayudar a ejecutar funciones como la adhesión (La capacidad de las células para unirse con otras moléculas), migración (el movimiento de algunas células en cualquier medio) y la proliferación celular (multiplicación y reproducción de las células). Algunas de las biomoléculas conocidas en medicina son las hormonas, los factores de crecimiento, los ácidos nucleicos (como el ADN) y algunas

moléculas de la matriz extracelular y de la superficie celular. A continuación, estudiaremos los biomateriales y su relación con el sector salud.

Biomateriales

En términos simples un biomaterial es un material de origen sintético o natural que está en contacto con un sistema biológico (como el cuerpo), bien sea en forma de implante o dispositivo. Específicamente en medicina regenerativa son utilizados como soportes, proporcionando a las células la superficie necesaria para fijarse, migrar, proliferar y mantener sus funciones ⁶.

El desarrollo de los biomateriales como soportes se ha dado en tres etapas a las que suele llamarse también generaciones:

La *primera generación de biomateriales* surgió en los años 60s. Se basa en el uso de materiales que no generen una respuesta inflamatoria en el cuerpo cuando son implantados, pero que a su vez tengan una gran resistencia química y mecánica¹². Por tanto, lo que busca este tipo de biomateriales es la recuperación de la función del tejido y que éste intente regenerarse. Sin embargo, esto sería una solución temporal y poco satisfactoria dado que las células que rodean al implante estarían en un proceso de envejecimiento que conduce a su muerte (apoptosis). En esta clase de biomateriales se incluyen metales como el titanio y polímeros inertes (un polímero es una estructura que está formada por muchas repeticiones de un mismo compuesto llamados monómeros), tales como el poliuretano (material que se encuentra en las esponjas de cocina) y la silicona ¹³.

La *segunda generación de biomateriales* apareció en los años 80s. Se enfoca en el uso de polímeros de origen natural debido a que pueden ser degradados por enzimas (proteínas especiales que entre sus funciones incluye la degradación de compuestos) producidas por las células del tejido nativo. Los métodos de

obtención de los biomateriales de segunda generación son rápidos y eficientes, ya que los monómeros que forman los polímeros tienen diversos compuestos llamados grupos funcionales que les permiten interactuar con múltiples sustancias, lo cual le permite al polímero ajustarse al tejido lesionado de manera fácil. Los biomateriales de esta generación deben también cumplir las demandas de la primera generación, como son la resistencia mecánica y la compatibilidad. De igual forma, empiezan a ser importantes otros aspectos como que el polímero no se contamine (esterilización), la resistencia a la temperatura y la evaluación de posibles agentes patógenos (que causan enfermedades) presentes en los polímeros. Algunos ejemplos de estos polímeros son:

- Polietileno, relacionado con catéteres, hilos de sutura, y se emplea como componente en los reemplazos de cadera y rodilla, entre otros.
- Polipropileno, empleado en funciones similares al anterior.
- Nylon, usado principalmente en suturas.

La *tercera generación de biomateriales* nació en el siglo XXI y se encuentra en auge actualmente. Tiene características estructurales y fisicoquímicas relevantes de las dos generaciones anteriores de biomateriales, pero busca modificar sus propiedades manipulando su interacción en una escala nanométrica (1000000 veces más pequeño que 1 centímetro) de materiales con distinta naturaleza, los sintéticos y naturales y algunos materiales inorgánicos. Esta generación tiene en cuenta que los biomateriales son hechos única y exclusivamente para los tejidos, no cómo ocurría en las anteriores generaciones que estos mismos materiales pueden ser usados para otras aplicaciones, por ejemplo: el titanio puede ser usado también para las naves espaciales, y el nylon para la pesca; cosa que no pasa en los de tercera generación. Algunos ejemplos de este tipo de moléculas son:

- Vitronectina¹⁴: Proteína abundante en el hueso.
- Péptido RGD¹⁵

- Factor de crecimiento de fibroblastos (FCF)¹⁶: es el encargado de estimular el crecimiento de células de la dermis que es una capa que se encuentra en la piel y es la responsable de la secreción de elastina y colágeno.
- Proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs)¹⁷
- Sustancias antioxidantes ¹⁸.

Además de las características de los biomateriales mencionadas en la introducción del presente capítulo, hay otras más que influyen en la calidad del injerto⁷, por tanto, los soportes deben cumplir lo siguiente:

1. Ser elaborados en diferentes formas y tamaños buscando que se ajusten al sitio de la lesión⁸
2. Estar libre de agentes infecciosos y sustancias tóxicas que puedan ser peligrosas para el paciente.
3. Brindar un beneficio terapéutico a los pacientes^{2,11}, si no, no se consideran biomateriales

A continuación, se hará una descripción de los principales tipos de biomateriales empleados en medicina regenerativa, que pertenecen a la segunda y tercera generación; no se va a tener en cuenta la primera generación dado que no buscan la regeneración de los tejidos, sino apenas la recuperación de la función reemplazando por otro material y no el tejido.

En la siguiente sección se describirán las principales materias primas que forman los biomateriales, los diferentes tipos de estructuras en que estos se encuentran habitualmente y las técnicas más relevantes de evaluación, *in vitro* (en el laboratorio) e *in vivo* (en su estado natural), de los biomateriales.

Principales tipos de biomateriales

La investigación en los biomateriales que pueden ser degradados por el organismo afectado, promovió el uso de una gran variedad de polímeros provenientes de recursos naturales o

biológicos. Los polímeros naturales son macromoléculas, como los azúcares o carbohidratos, grasas o lípidos y las proteínas, que están formadas por la repetición de bloques más pequeños denominados monómeros. Las proteínas, cuyos monómeros son los aminoácidos; y los polisacáridos, cuyos monómeros son los carbohidratos, son los polímeros naturales más empleados debido a que son similares a las macromoléculas que se encuentran en el organismo, y por esto poseen bajo riesgo de rechazo por el cuerpo y permiten fabricarse en diferentes formas que se pueden ajustar a los sitios de la lesión. Estos polímeros tienen mayor complejidad estructural que los polímeros sintéticos lo que hace complicada su manipulación, especialmente por su inestabilidad térmica por lo que los procesos de esterilización (que usan altas temperaturas) los dañan fácilmente. A continuación, se describen algunos de los biomateriales de origen biológico más utilizados en medicina regenerativa, los tienen interesantes características:

Colágeno: Es una de las principales proteínas del cuerpo humano, dado que constituye entre el 25 y el 30% del total de proteínas. Se encuentra en la piel, los huesos, el cartílago y los ligamentos, en donde contribuye a mantener la estructura tridimensional rígida del cuerpo. Existen al menos 16 tipos de colágeno, pero cerca del 80-90 % está dado por los tipos I, II y III¹⁹. Se encuentra típicamente en forma de tiras y hojas como fibras. Es de fácil obtención y procesamiento, y tiene buena adherencia. Las fibras de colágeno procesadas tienen ciertas desventajas que perjudican la recuperación del paciente como son la rápida colonización con poblaciones de bacterias, las pobres propiedades mecánicas y la elevada velocidad de degradación al momento de injertarse. Por lo regular, los biomateriales a base de colágeno se han aplicado como sustitutos de piel pues promueve una adecuada regeneración de esta.

Queratina: Es una proteína insoluble en agua, que se constituye en fibras y que puede conservar su estructura gracias a una gran cantidad de enlaces y puentes de hidrógeno que se

forman entre sus aminoácidos. En la naturaleza existen dos tipos de queratinas llamadas *alfa* y *beta*-queratina, que se diferencian por su composición. La queratina conforma estructuras como el pelo, la lana, las garras, las uñas, etc. En general la queratina tiene una alta proporción de cisteína, un aminoácido que contiene sulfuro, que le proporciona una buena resistencia mecánica y estabilidad en su estructura.

Fibroína: Es una proteína de estructura fibrilar, producida por algunos artrópodos como el gusano de seda y las arañas, que está compuesta principalmente por los aminoácidos glicina, alanina y serina, y a su vez por tres proteínas: dos tipos de fibroínas de cadena pesada y de cadena ligera y la proteína P25^{20,21}. La fibroína ha sido ampliamente utilizada en la industria textil y como elemento de sutura, sin embargo, ha generado gran interés por su relación en la regeneración de cartílago, hueso, tejido endotelial vascular, tejido epitelial y tejido nervioso, dado que es un material que tiene una gran biocompatibilidad, lenta biodegradabilidad, con gran resistencia a la tensión, es de sencilla producción y de alta resistencia térmica que le permite ser procesada en un amplio intervalo de temperaturas. Puede ser procesada fácilmente en diferentes estructuras como fibras, películas, esponjas, hidrogeles y partículas, lo que ha promovido su combinación con polímeros sintéticos para generar materiales con propiedades fisicoquímicas y biológicas similares a los tejidos diana, que son tejidos u órganos íntegros²².

Polihidroxialcanoatos (PHAs): Son biopolímeros de ácidos grasos producidos por bacterias y arqueas. Estos polímeros tienen alta biocompatibilidad y alto grado de cristalinidad (60-80%). Exhiben propiedades térmicas y mecánicas semejantes a los termoplásticos como el polietileno que es el material de los catéteres y el polipropileno que es similar al polietileno, con lo que su adición a otros materiales mejora las propiedades mecánicas y los tiempos de degradación. Estos polímeros son utilizados para la elaboración de suturas, barreras de adhesión y material

de soporte en cartílago articular, hueso, tejido cardiovascular y nervioso²³. A pesar de las grandes ventajas de los PHAs, su uso está limitado por su bajo rendimiento en la producción, dado a esto que se plantean nuevas estrategias como el uso de organismos genéticamente modificados y la exploración de nuevas especies productoras como las bacterias.

Almidón: Es un polisacárido que sirve como reserva alimenticia de las plantas. Puede llegar a ser obtenido con bajos costos de producción a partir de tubérculos como la papa y la yuca o de cereales como el trigo, el arroz y el maíz. La producción de materiales a partir del almidón requiere la combinación de temperatura, fuerte agitación y adición de agentes plastificantes para conferir una buena flexibilidad. El material resultante, conocido como almidón termoplástico (TPS) ha sido empleado en soportes en regeneración de tendones²⁴ y cartílago articular²⁵, en los medicamentos como tabletas y pastillas, y de igual forma el material del cual están hechas cápsulas.

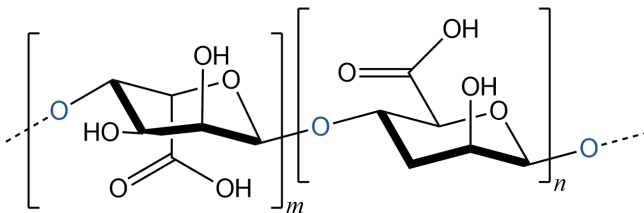
Quitano: Es un polisacárido de muchas características en especial la rigidez y su poca solubilidad en agua. Se obtiene a través de ciertos procesos biológicos que sufre la quitina, la cual hace parte de la pared celular de los hongos y del exoesqueleto de los crustáceos e insectos. El quitano cuenta con ciertas características que lo hacen interesante en la medicina regenerativa como son una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, aunque posee ciertas debilidades en sus propiedades mecánicas e inestabilidad en altas concentraciones de agua, lo que dificulta emplearlo para formar hidrogeles. A partir del quitano se han preparado andamios altamente porosos que permiten la formación de hueso²⁶.

Celulosa: Es un polisacárido rígido e insoluble en agua y compuesto por miles de unidades de glucosa. Debido a que se encuentra en la pared celular de las plantas, la celulosa es considerada el polisacárido más abundante en la naturaleza.

Aunque sus aplicaciones se han concentrado en la industria papelería y en la textil, también se han diseñado soportes para la formación de hueso a base de este polímero. Dentro de sus desventajas están su limitada capacidad de degradación y el uso de solventes que son tóxicos en su proceso de purificación. Para una adecuada regeneración ósea, los soportes de celulosa requieren de periodos muy largos de tiempo.

Alginato: Es un polisacárido natural que se extrae de las algas marinas pardas (**Figura 3.11**), sus aplicaciones son de gran importancia para la industria alimenticia, farmacéutica y química, debido a su capacidad de hidratarse para formar soluciones viscosas. Por su gran versatilidad para formar hidrogeles y micropartículas estables con una adecuada biodegradabilidad y baja toxicidad, en la actualidad estos materiales se han utilizado en cultivos celulares, en encapsulación celular y en la liberación controlada de moléculas con actividad biológica. Sin embargo, exhiben una poca adherencia celular y una limitada resistencia a la tensión, características que impactan negativamente en el injerto y dificultan su implementación en ciertos tejidos.

Figura 3.11. Estructura de los alginatos.

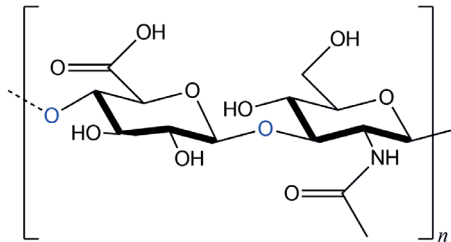


Fuente: elaboración propia.

Ácido hialurónico: Este polímero (**Figura 3.12**) es un componente fundamental de la matriz extracelular y se encuentra abundantemente en el cordón umbilical, las articulaciones, en el humor vítreo del ojo, el fluido sinovial y en el tejido conectivo de numerosos organismos. Es un biopolímero capaz de retener grandes cantidades de agua, utilizada ampliamente en fármacos de la vía nasal, pulmonar, dérmica y parenteral. En medicina

regenerativa se ha aplicado principalmente en cartílago y hueso con buenos resultados, gracias a que proporciona una buena adhesión celular, promueve la comunicación celular y muestra una adecuada resistencia mecánica.

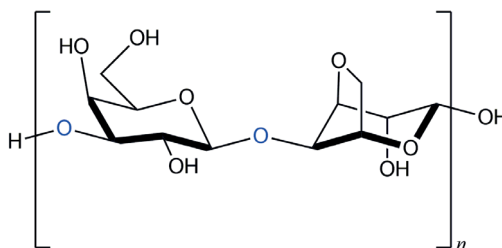
Figura 3.12. Estructura del ácido hialurónico.



Fuente: elaboración propia.

Agarosa: Es un polisacárido lineal (**Figura 3.13**) que se extrae de la pared celular de varias especies de algas rojas. Su polimerización (proceso en el que se induce la formación de polímeros mediante la unión de monómeros) se produce en agua a temperaturas superiores a 65°C, dado a esto tiene la capacidad de formar geles con resistencia térmica y con gran estabilidad además de poseer resistencia mecánica. Debido a sus características, la agarosa es utilizada en muchas técnicas de biología molecular, bioquímica, cultivos celulares y en microbiología. Las principales aplicaciones de la agarosa en medicina regenerativa son la encapsulación celular y la liberación controlada de moléculas en el sitio de la lesión.

Figura 3.13. Estructura de la agarosa.



Fuente: elaboración propia.

Fibrina: Además de su papel fundamental en el sistema de coagulación, la fibrina sirve como un soporte para la reparación de los tejidos que sufrieron una lesión, gracias a que péptidos (proteínas pequeñas) derivados de esta, promueven la división y comunicación celular, al igual que la formación de vasos sanguíneos²⁹.

La fibrina se caracteriza por tener una estructura espacial única y características como diámetro de fibras, porosidad, elasticidad y rigidez, que la hacen interesante como biomaterial en medicina generativa. Su proceso de formación, permeabilidad y composición química son algunos parámetros que se buscan comprender mejor a la hora de producirla como biomaterial ³⁰.

Gelatina: Es una proteína producida mediante cambios en la temperatura del colágeno. El colágeno utilizado en la obtención de gelatina proviene en su gran mayoría de tejido bovino y porcino, sin embargo, otras fuentes se han estudiado en los últimos años, como piel, huesos y aletas de pescado. La gelatina ha sido ampliamente estudiada como soporte en medicina regenerativa gracias a sus buenas capacidades como aglomerante y a su alta estabilidad fisicoquímica.

Albúmina: Es la proteína que se encuentra en el suero sanguíneo de animales vertebrados, en la clara de huevo, leche y en plantas. Es soluble en agua y tiene muchas funciones importantes en el organismo, sobre todo ayuda a mantener la presión osmótica en el torrente sanguíneo y al transporte de grandes moléculas orgánicas. Se ha establecido que influye en la unión de células a los biomateriales de soporte de una manera similar al colágeno. Los tipos de albúmina más comunes utilizados como soportes incluyen la albúmina de suero humano, la albúmina de suero bovino, la albúmina del huevo y la albúmina de suero porcino.

Ácido poli-láctico (PLA): Aunque es de origen sintético, el ácido poli-láctico proviene del ácido láctico (común en los lácteos), un producto natural obtenido por procesos de fermentación

de múltiples fuentes. Es un polímero fácilmente biodegradable, biocompatible y puede encontrarse en varios estados como el cristalino. En los tejidos vivos, el PLA se puede degradar totalmente, por lo que es ampliamente utilizado en la producción de hilo para sutura, implantes y cápsulas de medicamentos.

Hidroxiapatita (HAP): Constituye el 90 % de la matriz extracelular de los huesos y los dientes, en forma de cristales asociados al colágeno para dar dureza y compactación a los tejidos. Es un bio-cristal que pertenece a una familia de minerales llamadas apatitas, formada por calcio, fósforo e hidrógeno con una fórmula química típica de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2^{31-33}$. La hidroxiapatita es biocompatible y puede ser usada como sustituto de hueso para la regeneración ósea, gracias a su alta resistencia mecánica, a la presencia de poros en su estructura y a que promueve la difusión de nutrientes y el crecimiento de vasos sanguíneos.

Adicional a estos biomateriales de origen natural, existen otros materiales que resultan de la fusión de polímeros naturales y artificiales, llamados materiales híbridos orgánicos-inorgánicos, en el siguiente apartado veremos con más detalle este tipo de biomateriales perteneciente a la tercera generación.

Materiales híbridos orgánicos-inorgánicos

Este tipo de materiales están compuestos de sustancias orgánicas (cuya base es el Carbono) e inorgánicas (cuya base son elementos distintos del Carbono) en íntima interacción a una escala nanométrica. Su composición hace que resulten materiales multifuncionales que exhiban las propiedades tanto del material inorgánico por ejemplo resistencia mecánica y térmica, como del orgánico, por ejemplo, biocompatibilidad, biodegradabilidad, flexibilidad, etc. La fuente de estos materiales puede ser natural o sintética, aunque cuando el material se compone de biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y de sólidos inorgánicos con estructura nanométrica, se les denomina materiales bionanhíbridos ³⁵.

Este tipo de materiales por los cuales se componen los biomateriales de la tercera generación, surge del estudio de los sistemas biológicos, por ello se les ha denominado también materiales bio-inspirados. En la naturaleza existen materiales como el nácar, el hueso y la dentina que son uniones orgánicas-inorgánicas, en los cuales biopolímeros suaves como el colágeno y la quitina, se combinan con minerales frágiles como la hidroxiapatita y el aragonito, para formar materiales con estructuras superiores a las de los conforman. Este efecto es particularmente notable en el nácar, el cual se compone en un 95% de plaquetas de aragonito (carbonato de calcio) apiladas una sobre otra en donde cada placa está rodeada por una capa delgada de proteínas como la quitina, la lustrina y otras proteínas, presentando una resistencia a la fractura que es tres mil veces más alta que la resistencia del aragonito puro³⁶.

Además de sus características de resistencia mecánica, los materiales bionanohíbridos se caracterizan por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Adicionalmente, estos materiales evitan el empleo de polímeros sintéticos derivados del petróleo, reemplazándolos por polímeros de origen natural, abundantes y de bajo costo.

Materiales bionanohíbridos en medicina regenerativa

Gracias a las propiedades de los materiales bionanohíbridos que resultan a partir de las mismas propiedades de los elementos orgánicos e inorgánicos que los componen, resultan una gran cantidad de aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa, en donde las propiedades de los soportes influyen poderosamente la proliferación y la diferenciación de las células encargadas de recuperar los tejidos afectados.

A través de la incorporación de diferentes tipos de minerales que se encuentran de manera natural en tejidos animales, tales como la hidroxiapatita y algunos compuestos de silicatos, se busca

mejorar las características mecánicas y biológicas de los soportes basados en biopolímeros. Un buen ejemplo de las mejoras que se pueden conseguir puede ser la modificación de soportes de quitosano con cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico. En ejemplo sencillo es que al adicionar un 1% en peso de partículas de hidroxiapatita a los soportes de quitosano, se hace más difícil deformarlo con respecto al quitosano sin ninguna mejora. Un requisito importante de los biomateriales es que deben tener conformaciones especiales que les permitan adaptarse al tipo de tejido al cuál se va a incorporar, ya que hay diferencias entre los tejidos receptores.

Conformación de los biomateriales

Cada tejido posee características individualizadoras, en el tipo de células que los conforman y las macromoléculas (proteínas, polisacáridos y lípidos) que constituyen su matriz extracelular, por lo que los biomateriales se deben ajustar a necesidades del tejido en su estructura, su mecánica y la capacidad que tiene para difundir nutrientes o desechos, de modo que proporcionen un ambiente óptimo para llegar a recuperar la función completa del órgano o tejido afectado.

Las tres conformaciones estructurales que mejores resultados han aportado son: las películas, los hidrogeles y las esponjas. Cada una de estas formas tiene ventajas, desventajas y tejidos en los cuales se prefieren, por lo que además de elegir el tipo de biomaterial es necesario realizar una adecuada selección de la conformación.

Películas

Son recubrimientos delgados formados por uno o más componentes. Sus características más representativas son su elasticidad, baja densidad, alta resistencia a la tensión y torsión, resistencia a la humedad y baja permeabilidad a algunos elementos

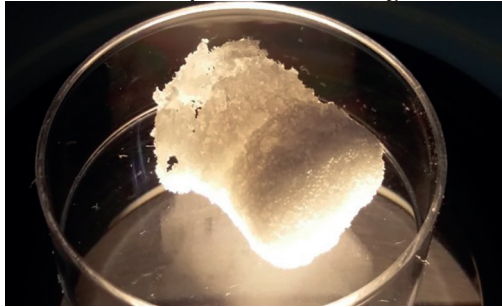
gaseosos. Existe una amplia variedad de tecnologías que permiten elaborar las películas delgadas, por mencionar algunos: deposición química en fase vapor, deposición física en fase vapor, deposición electroforética y proceso de pulverización; estos procesos tienen distintas bases químicas y físicas, pero la mayoría usan el calor para cambiar la estructura de los compuestos y dar como resultado las películas. Algunos estudios muestran que la combinación de estas tecnologías permite la rápida fijación del implante en los tejidos y mejorar las interacciones entre la célula, el biomaterial y el tejido. Sin embargo, aún existen dificultades a la hora de su obtención, pues su producción es costosa, y en ocasiones no hay adecuada combinación de los componentes.

Espojas

Un gran número de materiales con estructuras moleculares y superficies controladas están siendo desarrollados para la reconstrucción de tejidos³⁹⁻⁴¹. La estrategia general consiste en usar materiales que imiten las características biológicas y así controlar y simular el ambiente natural de las células que se insertarán en el biomaterial.

Las esponjas son biomateriales porosos (**Figura 3.14**), formadas por estructuras tridimensionales que se interconectan ampliamente y que se usan en medicina regenerativa. Estas deben interactuar con las células permitiendo su adhesión y la comunicación con otras células, al igual que el transporte de nutrientes. Las esponjas deben ser biodegradables, y producir una baja o ninguna respuesta negativa y no tener efectos tóxicos hacia las células^{42,43}.

Figura 3.14. Fotografía de esponjas obtenidas a partir de biomateriales para medicina regenerativa.



Fotografía tomada por Heidy Catalina Navia.

Hidrogeles

Los hidrogeles son compuestos de uno o varios polímeros entrecruzados, estos se encuentran dentro de determinada proporción de agua de manera que no disuelva, pero que a la vez pueda absorberla y por tanto el compuesto se hinche aumentando apreciablemente su volumen⁴⁴. El uso de hidrogeles en medicina regenerativa se ha extendido ampliamente, gracias a características como la baja tasa de rechazo por parte de los tejidos y la compatibilidad con células y proteínas⁴⁵. Una desventaja que tienen los hidrogeles es que las células no tienden a adherirse muy bien al material, lo que impacta de manera negativa la proliferación de las células y la efectividad del implante⁴⁶. Por lo anterior se realizan grandes esfuerzos para aumentar la adherencia del hidrogel a través de la mezcla con otras moléculas o polímeros.

Uno de los tipos de materiales más empleados en aplicaciones biológicas y biomédicas son los hidrogeles obtenidos de fuentes naturales, tales como el quitosano, el ácido hialurónico, la gelatina, el colágeno, el alginato, la elastina, entre otros. Estos materiales son ampliamente usados debido a su biodegradabilidad y excelente biocompatibilidad con tejidos biológicos. Sin embargo, el uso de estos hidrogeles está restringido debido a problemas de degradación del material, bajas propiedades mecánicas y a las

variaciones en la reproducibilidad de síntesis de estos materiales⁴⁷. Recientemente, se han hecho considerables esfuerzos para incorporar varias clases de nanopartículas en hidrogeles, con el fin de diseñar nuevos nanomateriales con propiedades superiores a los geles obtenidos inicialmente.

A continuación, se describen algunos ejemplos que muestran las aplicaciones nanotecnológicas en el uso de nanomateriales vistos como interesantes candidatos para el desarrollo de soportes celulares en la ingeniería de tejidos.

Nanomateriales

La ingeniería de los nanomateriales se originó en Estados Unidos como una iniciativa de científicos que trabajaban en el área de la química y de los materiales a principio del siglo XXI. El interés fundamental de estos materiales está enfocado en las propiedades físicas y el comportamiento único que exhiben algunos materiales con tamaños entre 1 - 100 nanómetros, cuyas unidades más pequeñas son conocidas como nanopartículas. Estas nanopartículas entran al cuerpo humano por inyección, inhalación, ingestión o a través de la piel. Una vez invaden un medio biológico, estas nanopartículas inevitablemente entran en contacto con una gran variedad de biomoléculas presentes en los fluidos corporales o en la sangre, tales como azúcares, proteínas y lípidos. De esta manera, la biodistribución e internalización de nanopartículas a través de células específicas está determinada por las propiedades fisicoquímicas de éstas, como son las propiedades hidrofílicas, lipofílicas, características superficiales y de forma y tamaño de las nanopartículas⁴⁸.

Actualmente, el panorama de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa se ha visto influenciada por las investigaciones realizadas en el campo de las células madre y de la nanotecnología. En la última década, se ha demostrado que los

nanomateriales o las nanopartículas con diferentes tamaños son atractivos para el control, diferenciación y proliferación celular⁴⁹.

Nanomateriales basados en grafeno

Los materiales inorgánicos como el grafeno y sus derivados han atraído un gran interés al ser clasificados como nanomateriales de la “próxima generación” empleados en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. En esencia, el grafeno está hecho de carbono, al igual que el diamante o el grafito, pero está conformado por átomos de carbono ubicados en una estructura hexagonal plana en dos dimensiones⁵⁰.

De todos los nanomateriales usados para el control de células madre, los nanomateriales basados en grafeno, tales como las nano hojas de grafeno son los más populares desde su descubrimiento. Recientes estudios han demostrado que el grafeno es un material interesante que sirve como plataforma para el cultivo celular. Se ha observado que este material es capaz de mejorar el crecimiento de células como los fibroblastos y promueve el cultivo de osteoblastos y células madre mesenquimales⁵¹. Dado que este material promueve la viabilidad, adhesión y migración celular, se ha considerado que es un material con un gran potencial para la formación de soportes biocompatibles capaces de guiar la diferenciación celular y regenerar tejidos⁵².

Nanomateriales basados en silicio

Un tipo de material inorgánico empleado para preparar compuestos nanohíbridos con propiedades y funciones únicas, son aquellos basados en nanopartículas de silicio. Estas partículas incluyen nanopartículas de sílica u óxido de silicio (SiO₂), nanopartículas de sílice mesoporosa y varias clases de nano-arcillas como la montmorillonita, laponita y la halosita. La mayoría de nanopartículas basadas en silicio o las nano-arcillas están presentes en el cuerpo humano y son necesarias para el

funcionamiento normal de los tejidos humanos. El silicio es muy importante en el desarrollo del esqueleto al promover la síntesis de colágeno tipo I y estimular la diferenciación hacia hueso de células madres humanas⁵³.

En particular la fuerza mecánica de las nanopartículas basadas en silicio y las nano-arcillas es de gran interés para desarrollar hidrogeles nano híbridos para reparar y regenerar los tejidos y funciones del cuerpo. Se han sintetizado hidrogeles que responden a la degradación proteolítica y presentan un incremento en la rigidez del material a través de la incorporación de nanopartículas de silicio. La incorporación de estas nanopartículas en alta densidad dentro de un hidrogel polimérico puede no solo generar fortaleza mecánica, favorecer la adhesión de hidrogel a los tejidos, sino también fabricar un material que responda a estímulos ambientales y sea útil en aplicaciones biomédicas⁵⁴.

En el campo de la ingeniería de tejidos se ha encontrado que los hidrogeles conformados por nanopartículas de silicio y quitosano, tiene un efecto positivo en la viabilidad celular e induce la mineralización no solo en la superficie sino en el volumen completo del material, características importantes para promover la reparación del hueso⁵⁵.

Nanomateriales basados en partículas metálicas

Los metales y las nanopartículas metálicas poseen características únicas que no son frecuentemente encontradas en los materiales poliméricos, por tanto, varios tipos de metales o nanopartículas de óxidos metálicos han sido integrados dentro de materiales poliméricos para fabricar materiales nanohíbridos. Si la incorporación de tales nanopartículas dentro del biomateriales se hace de manera covalente se generará una interacción relativamente fuerte entre el polímero y las nanopartículas, generando un cambio en las propiedades mecánicas del biomaterial⁵⁶.

Una gran variedad de nanopartículas metálicas, tales como oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu) y una serie de nanopartículas de óxidos metálicos que incluyen óxido de hierro (Fe_2O_4 , Fe_2O_3), óxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO_2), óxido de cobre (CuO_2), arcillas metálicas, entre otros, han sido combinados con polímeros sintéticos y naturales para sintetizar biomateriales con aplicaciones farmacéuticas que incluyen separación celular, transporte de fármacos y tratamiento de enfermedades⁵⁷.

Para la preparación de hidrogeles nanohíbridos, las nanopartículas más empleadas son las de plata (Ag), oro (Au) y de óxido de hierro (Fe_3O_4). Una de las características más importantes de las nanopartículas de Ag es su de amplio espectro antimicrobiano junto con su baja toxicidad en tejidos humanos. La incorporación de estas nanopartículas dentro de los hidrogeles proporciona materiales con alta actividad antibacteriana y además genera un cambio en la capacidad de respuesta a estímulos, en propiedades mecánicas como dureza e hinchamiento. De manera similar, las nanopartículas de Au son ampliamente usadas en el campo de la biomédica. Una de las características más interesantes de estas nanopartículas es que pueden absorber luz y convertir energía óptica en energía térmica⁵⁸. Es así como las nanopartículas de Au embebidos en hidrogeles empleados en combinación con radiación laser tiene interés como agente terapéutico contra el cáncer y en la regeneración de tejidos.

Diferente a las nanopartículas de metales nobles, las nanopartículas basadas en metales de transición, tales como el hierro (Fe), cobalto (Co) y el níquel (Ni) exhiben propiedades magnéticas. Los óxidos de hierro como la maghemita (Fe_2O_3) y la magnetita (Fe_3O_4) son los nanomateriales magnéticos más comunes en aplicaciones biomédicas⁵⁹.

A continuación, se describirán los métodos empleados para evaluar la interacción de los biomateriales y nanomateriales

con un animal o el cuerpo humano, tejidos y células, de tal manera que éstos no representen ningún riesgo en la salud de las personas.

Evaluación de los biomateriales en medicina regenerativa

Modelos celulares

Para entender bien esta sección es importante hablar primero de los *cultivos in vitro*, que son cultivos celulares que crecen en un ambiente controlado en el laboratorio; las células, luego de ser removidas de algún tipo de tejido se deben mantener vivas, para ello se emplean incubadoras especiales que imiten la temperatura corporal, medios nutritivos y frascos con cultivos especiales, con el fin de controlar las condiciones de crecimiento celular y así obtener un número deseado de células.

Para la evaluación de los biomateriales se trabaja con cultivos primarios de células que se originan a partir del aislamiento de las células del tejido y su proliferación por primera vez en condiciones de laboratorio. Muchos investigadores prefieren realizar experimentos con estas células primarias ya que conservan las características propias del tejido del cual se extraen. Hay otra clase de cultivos que son las líneas celulares, que son cultivos primarios que ya han sido expandidos o multiplicados, con una alta tasa de crecimiento. Algunas líneas celulares poseen cambios genéticos respecto a los cultivos primarios. Estas células son empleadas en ensayos con biomateriales pues pueden convertirse en modelos para estudiar enfermedades, ya que su mantenimiento y multiplicación es simple.

Los ensayos con cultivos celulares son muy importantes pues permiten evaluar, a corto plazo, factores como:

- i. Nivel de toxicidad del biomaterial frente a las células de los tejidos (citotoxicidad).
- ii. La probabilidad de multiplicación celular sobre los biomateriales.

iii. Capacidad de diferenciación de las células en el biomaterial (ver: capítulo de células madre).

iv. Capacidad de degradación del biomaterial en un ambiente celular controlado

En la literatura existen varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* encargados de estudiar la biología molecular y celular de los factores anteriormente descritos y de ciertas condiciones médicas, cada uno de ellos con sus respectivas ventajas y desventajas. Esto se realiza como paso previo para la experimentación en humanos, realizándose en otros organismos o en cultivos en el laboratorio, y a esto se llama un *modelo*. En cuanto a los biomateriales, puede haber dos modelos:

Modelos organotípicos (modelo *in vitro*)

El cultivo organotípico consiste en cultivar en el laboratorio una fracción de un tejido, contribuyendo al entendimiento de la habilidad de las células para regenerar un tejido cuando están en un biomaterial. Los modelos organotípicos permiten un análisis integral de varios factores como células, componentes inflamatorios y aspectos que regulan la reparación o regeneración de los tejidos, sin la interferencia de variables externas como actividad física, ciclos hormonales y tipo de alimentación. Este tipo de cultivo tridimensional, es bioquímica y fisiológicamente similar al tejido vivo pues posee la misma proporción de poblaciones celulares propias del organismo. Sin embargo, se tienen dificultades a la hora de seleccionar el medio de cultivo propicio que garantice la supervivencia y crecimiento de todas las células en su estado nativo, además es susceptible a la posible contaminación y/o deterioro en la extracción del tejido de interés.

Modelos animales (modelo *in vivo*)

La investigación científica con animales ha desempeñado un papel esencial en los avances científicos, médicos y veterinarios, debido a que existen especies animales que comparten procesos

biológicos similares a los del ser humano. Dado lo anterior, se ha podido obtener el conocimiento necesario para prevenir, curar y/o controlar muchas enfermedades, evaluar la eficacia de los antibióticos y vacunas, y desarrollar los procedimientos para el trasplante o sustitución de órganos y evaluar características específicas de los biomateriales.

Los modelos animales, permiten llevar a cabo ensayos con mayor rapidez, debido a que tienen tiempos de generación y ciclos de vida más cortos que los de los humanos, permitiendo determinar la efectividad de un tratamiento de medicina regenerativa y evaluar aspectos fundamentales como durabilidad, seguridad, eficacia, biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad a largo término.

Perspectivas de producción de biomateriales en el departamento de Risaralda

Cada vez son mayores los avances tecnológicos de la ciencia médica en el mundo, y en la región de Risaralda la visión investigativa en esta área no se queda corta, ya que desde hace unos años se ha estado estudiando la generación de nuevos y mejores biomateriales aplicados a la medicina regenerativa, con el fin de contribuir al mejoramiento de la salud de miles de pacientes con estas necesidades.

Investigaciones tales como la evaluación de la fibroína de seda como biomaterial de soporte para el crecimiento y diferenciación de células madre mesenquimales, células madre derivadas de pulpa dental o células madre derivadas de tejido adiposo, trabajo realizado en la Universidad Tecnológica de Pereira, sugiere el uso de la Fibroína como biomaterial dada su capacidad para promover el crecimiento celular. De hecho, se logró fabricar y caracterizar hidrogeles a partir de la Fibroína obtenida del gusano de seda híbrido Colombiano “Pílamo 2” y se observó que dichos hidrogeles son adecuados para el desarrollo

de nuevos andamios con potencial uso en medicina ingeniería de tejidos⁶⁰. Existe además una alianza del sector público-privado como es el caso del Laboratorio CEMAB y la Universidad Tecnológica de Pereira en apoyo con otras entidades nacionales e internacionales como lo son MinCiencias, Sistema General de Regalías y Euroespes, entre otras, que han contribuido a la formación de estudiantes de pregrado y posgrado en carreras afines con el área de la salud, aportando resultados prometedores encaminados a la implementación de tecnologías innovadoras aplicadas a la regeneración de tejidos.

Para finalizar, se puede establecer que en este capítulo se realizó una descripción de los principales biomateriales de origen biológico con importancia en medicina regenerativa, sus conformaciones más utilizadas y algunos materiales avanzados como los bio-nano híbridos. También se expusieron las principales características biológicas que debe tener un biomaterial para su aplicación exitosa en medicina regenerativa y los modos en que se deben evaluar en modelos celulares, organotípicos y animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 2014; 10:1502–14.
2. Roseti L, Desando G, Cavallo C, Petretta M, Grigolo B. Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells.* 2019; 8(11):1305.
3. Kaul H, Ventikos Y. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015; 21:203–17.
4. Rahmati M, Pennisi CP, Budd E, Mobasheri A, Mozafari M. Biomaterials for Regenerative Medicine: Historical Perspectives and Current Trends. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1119:1-19.
5. Mi, HY, Jing X, Turng L-S. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *J. Cell. Plast.* 2015; 51:165–196.
6. Silva R., Fabry B, Boccaccini AR. Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation. *Biomaterials.* 2014; 35:6727–38.
7. Hendriks JA, Moroni L, Riesle J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. The effect of scaffold-cell entrapment capacity and physico-chemical properties on cartilage regeneration. *Biomaterials.* 2013; 34:4259–65.
8. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001; 12(1):107-24.
9. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer, R. Tissue Engineering by Cell Transplantation Using Degradable Polymer Substrates. *J Biomech Eng.* 1991; 113(2):143-51.

10. Kweon HY, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24(5):801-8.
11. Keane TJ, Badylak SF. Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin Pediatr Surg*. 2014; 23(3):112-8.
12. Lemons JE. Introduction: Properties of Materials: The Palette of the Biomaterials Engineer. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials*. 3rd Ed. Academic Press, MA. Vol. 1. 5-6. 2013.
13. Bhattacharjee M, Coburn J, Centola M, Murab S, Barbero A, Kaplan DL, et al. Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 84:107-22.
14. Petrie TA, Raynor JE, Dumbauld DW, Lee TT, Jagtap S, Templeman KL, et al. Multivalent Integrin-Specific Ligands Enhance Tissue Healing and Biomaterial Integration. *Sci Transl Med*. 2010; 2(45):45ra60.
15. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*. 2011; 32(18):4205-10.
16. Zhao S, Zhao J, Dong S, Huangfu X, Li B, Yang H, et al. Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9:2373-85.
17. Huang B, Yuan Y, Li T, Ding S, Zhang W, Gu Y, et al. Facilitated receptor-recognition and enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 on magnesium-substituted hydroxyapatite surface. *Sci Rep*. 2016; 6:24323.
18. Li C, Luo T, Zheng Z, Murphy AR, Wang X, Kaplan DL. Curcumin-functionalized silk materials for enhancing adipogenic

differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 2015; 11:222-32.

19. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th Ed. W. H. Freeman, NJ. Vol. 1. 217-220. 2000.

20. Nazarov R, Jin H, Kaplan DL. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules.* 2004; 5(3):718-26.

21. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc.* 2011; 6(10):1612-31.

22. Suzuki Y. Structures of silk fibroin before and after spinning and biomedical applications. *Polym J.* 2016; 48:1039-44.

23. Ali I, Jamil N. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Front Biol.* 2016; 11:19-27.

24. Gonçalves AI, Rodrigues MT, Carvalho PP, Bañobre-López M, Paz E, Freitas P, et al. Exploring the Potential of Starch/Polycaprolactone Aligned Magnetic Responsive Scaffolds for Tendon Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5(2):213-22.

25. Nasri-Nasrabadi B, Mehrasa M, Rafienia M, Bonakdar S, Behzad T, Gavanji S. Porous starch/cellulose nanofibers composite prepared by salt leaching technique for tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2014; 108:232-8.

26. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011; 17(5):331-47.

27. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview. *Mar Drugs.* 2010; 8(8):2252-66.

28. Deepthi S, Venkatesan J, Kim S-K, Bumgardner JD, Jayakumar R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2016; 93(Pt B):1338-53.
29. Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol*. 2017; 60-61:110-23.
30. Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater*. 2014; 10(4):1502-14.
31. Manso M, Ogueta S, Herrero-Fernández P, Vázquez L, Langlet M, García-Ruiz JP. Biological evaluation of aerosol-gel-derived hydroxyapatite coatings with human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2002; 23(19):3985-90.
32. Behera S, Naskar D, Sapru S, Bhattacharjee P, Dey T, Ghosh AK, et al. Hydroxyapatite reinforced inherent RGD containing silk fibroin composite scaffolds: Promising platform for bone tissue engineering. *Nanomedicine*. 2017; 13(5):1745-59.
33. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater*. 2013; 9(8):7591-621.
34. Garrett PR. *The Science of Defoaming. Theory, Experiment and Applications*. 1st Ed. CRC Press, NY. Vol. 1. 1-32. 2015.
35. Ruiz-Hitzky E, Fernandes FM. Progress in bionanocomposites: From green plastics to biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 1st Ed. Elsevier. Vol. 10-11. 1391-1392. 2013.
36. Tritschler U, Cölfen H. Self-assembled hierarchically structured organic-inorganic composite systems. *Bioinspir Biomim*. 2016; 11(3):035002.

37. Nudelman F, Gotliv BA, Addadi L & Weiner S. Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J Struct Biol.* 2006; 153(2):176-87.
38. Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009; 5(4):1182-97.
39. Unalan I, Colpankan O, Albayrak AZ, Gorgun C, Urkmez AS. Biocompatibility of plasma-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofiber mats modified by silk fibroin for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 68:842-50.
40. Lawrence BD. Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 1st Ed. Elsevier. Vol 1. 78-99. 2014.
41. Armstrong JPK, Shakur R, Horne JP, Dickinson SC, Armstrong CT, Lau K. et al. Artificial membrane-binding proteins stimulate oxygenation of stem cells during engineering of large cartilage tissue. *Nat Commun.* 2015; 6:7405.
42. Pati F, Song T-H, Rijal G, Jang J, Kim SW, Cho D-W. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. *Biomaterials.* 2015; 37:230-41.
43. Gaharwar AK, Arpanaei A, Andresen TL, Dolatshahi-Pirouz A. 3D Biomaterial Microarrays for Regenerative Medicine: Current State-of-the-Art, Emerging Directions and Future Trends. *Adv Mater.* 2016; 28(4):771-81.
44. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013; 2013(3):316-42.

45. Guzewicz N, Best A, Perez-Ramirez B & Kaplan DL. Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. *Biomaterials*. 2011; 32(10):2642-50.
46. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011; 8(5):607-26.
47. Li Y, Rodrigues J & Tomás H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(6):2193-221.
48. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology*. 2014; 12:5.
49. Davis ME, Chen Z. (Georgia) & Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(9):771-82.
50. Ruoff R. Graphene: calling all chemists. *Nat Nanotechnol*. 2008; 3(1):10-1.
51. Mooney E, Dockery P, Greiser U, Murphy M, Barron V. Carbon Nanotubes and Mesenchymal Stem Cells: Biocompatibility, Proliferation and Differentiation. *Nano Lett*. 2008; 8(8):2137-43.
52. Ryoo S-R, Kim Y-K, Kim M-H, Min D-H. Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies. *ACS Nano*. 2010; 4(11):6587-98.
53. Götz W, Tobiasch E, Witzleben S, Schulze M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics*. 2019; 11(3):117.

54. Hoppe A, Güldal NS & Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011; 32(11):2757-74.
55. Lewandowska-Łańcucka J, Fiejdasz S, Rodzik Ł & Nowakowska MKM. Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: a potential injectable scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2015; 10(1):015020.
56. Schexnailder P & Schmidt G. Nanocomposite polymer hydrogels. *Colloid Polym Sci*. 2009; 287: 1–11.
57. Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th Anniversary Article: Rational Design and Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater*. 2014; 26(1):85-123.
58. Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(6):2256-82.
59. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3995-4021.
60. Zuluaga-Vélez A, Cómbita-Merchan DF, Buitrago-Sierra R, Santa JF, Aguilar-Fernández E, Sepúlveda-Arias JC. Silk fibroin hydrogels from the Colombian silkworm *Bombyx mori* L: Evaluation of physicochemical properties. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213303.

Metagenómica y Metabolómica: Generalidades y Potencial en Salud Humana

Carlos Andrés Toro, Juan Carlos Sepúlveda-Arias. Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción

Los avances de las técnicas experimentales en áreas como la biología, medicina, química y genética, entre otras, nos han dado la capacidad de estudiar y entender mejor la complejidad de la vida desde una perspectiva molecular, lo cual es importante para satisfacer la necesidad del humano por entender la naturaleza del mundo en el que vive, además de tener grandes aplicaciones en importantes áreas como la salud, el medio ambiente, los alimentos, combustibles, etc. Con frecuencia, las diferentes áreas de las ciencias se unen, creando campos multidisciplinarios como las ciencias ómicas, que permiten la comprensión de los procesos biológicos fundamentales de la vida, y que arrojan gran cantidad de datos que muestran la enorme complejidad de los organismos vivos, haciendo necesario el surgimiento de ciencias como la bioinformática, para permitir, mediante software y computadores, el ordenamiento y análisis de esta cantidad de datos ¹.

En este capítulo se discutirán los fundamentos y principales aplicaciones en salud humana de dos importantes ciencias ómicas, la metagenómica y la metabolómica, pero para entenderlas debemos primero comprender algunos procesos biológicos y bioquímicos fundamentales que acontecen dentro de todos los seres vivos que conocemos en nuestro planeta tierra, incluyendo al humano.

Evolución de las especies y las relaciones Filogenéticas

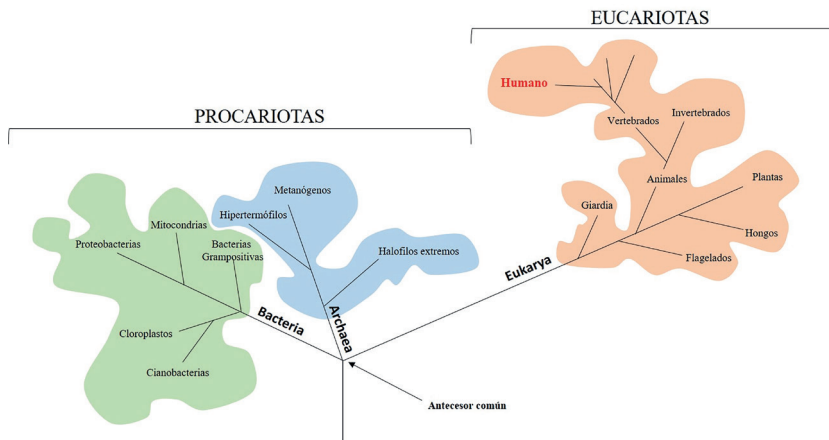
Como es bien sabido, la célula, sea procariota o eucariota, es la unidad fundamental de la vida y todo organismo vivo está conformado por células, las cuales extraen materia (nutrientes) y energía (lumínica o química) para sus operaciones básicas como crecer, multiplicarse y mantenerse un tiempo determinado hasta finalmente morir.

La teoría de la evolución de las especies, formulada por Charles Darwin en 1859, predice que todos los organismos proceden de la evolución de una especie antecesora común, es decir, en algún punto de la historia se originó la vida, una célula primitiva que se transformó, mutó y ramificó a diferentes especies que continuaron su camino evolutivo, entre las cuales algunas se adaptaron a las diferentes condiciones existentes en la tierra y otras se extinguieron, hasta formar la basta cantidad de especies que conocemos hoy en día, unas más complejas que otras, entre ellas el humano. Es difícil decir exactamente el número de especies existentes en la tierra, pues algunas investigaciones estiman que hay alrededor de 8.7 millones ², mientras que otras predicen de 1 a 6 billones ³. Sin embargo, hay descritas tan solo alrededor de 1.5 millones, las cuales están clasificadas en 3 dominios, Bacteria, Archaea y Eukarya, o 5 reinos, conocidos como el reino monera, protista, de los hongos, de las plantas y los animales ⁴. Algunas especies están formadas por una única célula llamadas organismos unicelulares; y otras, de mayor complejidad, están formados por varias células eucariotas, conocidas como organismos pluricelulares.

La diversidad de especies que se originó debido a la evolución se debe fundamentalmente a la diversidad genética, que como se verá más adelante, da origen a la diversidad fenotípica, es decir, a las características observables como la morfología, adaptabilidad, hábitat, funciones, etc. Sin embargo, aunque cada organismo posee muchas características propias que lo diferencian

de otros, existen características conservadas o que han variado poco a lo largo de la evolución, lo que ha permitido mapear y predecir la relación evolutiva entre las diferentes especies, en el llamado árbol filogenético (**Figura 3.15**).

Figura 3.15. Árbol filogenético. La evolución y diversificación dio paso a la gran variedad de especies, compuestas por células procariotas y eucariotas, clasificadas en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, representadas en el árbol filogenético.



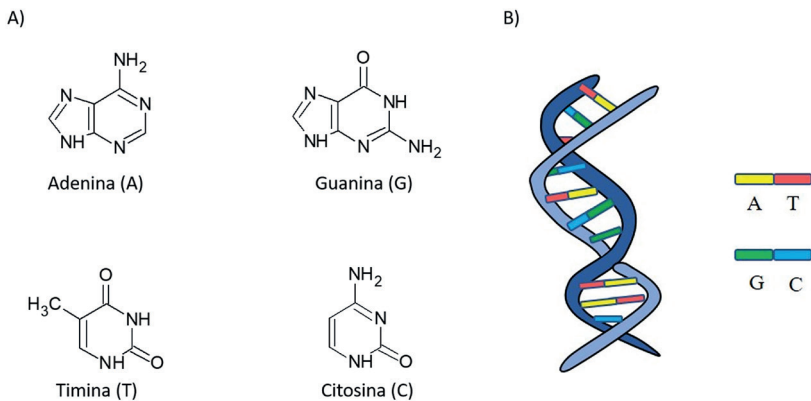
Fuente: elaboración propia.

Generalidad de biología molecular y bioquímica

Una característica importante de toda célula es que posee material genético, el cual es una macromolécula llamada ácido desoxirribonucleico (ADN), a excepción de algunos virus que poseen ácido ribonucleico (RNA), la cual posee toda la información necesaria para que una célula ejerza sus procesos biológicos, e inherentemente provee características que la hacen única y la distinguen de otras especies. Esta macromolécula se duplica, a través del proceso de replicación, y transmite su información (herencia genética) de la célula madre a una célula hija, en el que al final ambas células poseen el mismo material genético o genotipo.

El ADN está compuesto por dos hebras, que giran helicoidalmente alrededor de un eje común, y están compuestas por 4 bases nitrogenadas diferentes; Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G), que se pueden combinar de formas diferentes, dando lugar a grandes y variadas moléculas (**Figura 3.16**), en las cuales la secuencia de estas bases es sumamente importante, pues de este orden dependen todas las características fenotípicas de un organismo como el color, la forma, tamaño, etc.

Figura 3.16. Componentes y estructura del ADN. A) La parte variable y que contiene la información genética está compuesta por 4 nucleótidos; Adenina, Timina, Guanina y Citosina. B) El ADN es una molécula compuesta por dos hebras helicoidales girando sobre un eje común, las cuales contienen los nucleótidos unidos por puentes de hidrogeno.

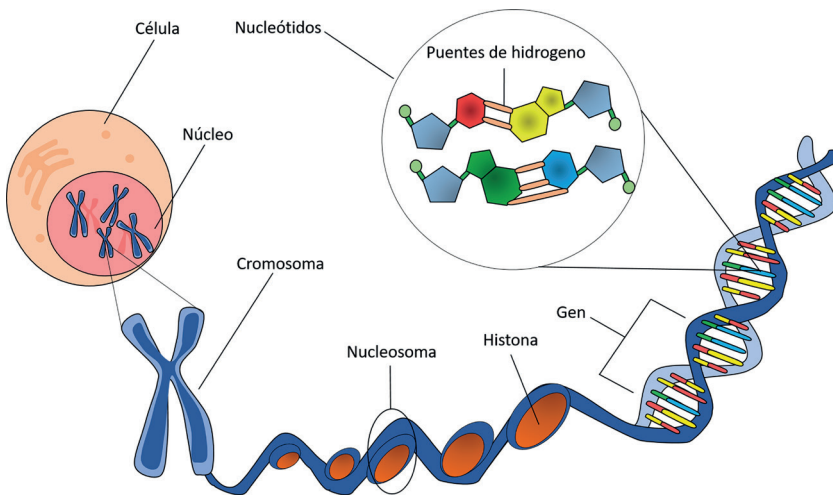


Fuente: elaboración propia.

El material genético en organismos superiores como los animales se encuentra enrollado junto con otras proteínas llamadas histonas, conformando estructuras altamente compactas, conocidas como cromosomas (**Figura 3.17**). Entre las diferentes especies hay diferentes números de cromosomas y su longitud también es diferente. El humano, por ejemplo, contiene 23 pares de cromosomas (46 cromosomas) en cada una de sus células, de los cuales 23 son heredados de la madre y 23 del padre. Mientras

que el ratón (*Mus musculus*) contiene 20 pares de cromosomas. Otras especies, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), tienen 12 pares cromosomas (24 en total) ⁵. Organismos más simples como la bacteria *E. coli* posee un solo cromosoma ⁶.

Figura 3.17. Representación del empaquetamiento de los genes y su ubicación. Los genes están envueltos junto a proteínas histonas, formando densas estructuras denominadas cromosomas, las cuales están contenidas dentro del núcleo celular de eucariotas.



Fuente: elaboración propia.

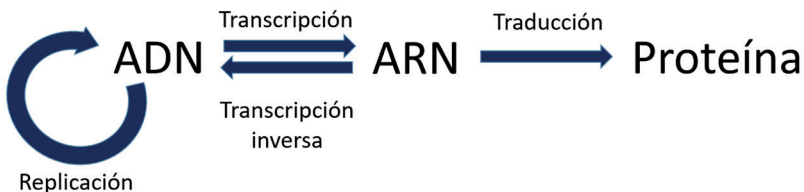
Dentro de los organismos hay otro importante tipo de biomoléculas conocidas como proteínas, las cuales tienen variadas e importantes funciones dentro y fuera de las células; están definidas por la combinación de 20 aminoácidos diferentes, y la secuencia de estos es fundamental tanto para su estructura como para su función. Cada una de las proteínas es codificada por segmentos de ADN, conocidos como genes, que se ubican y distribuyen en lugares específicos dentro de los cromosomas de cada célula en el organismo. La hemoglobina, por ejemplo, es una proteína presente en el humano y otros mamíferos. Está formada por 4 partes, dos cadenas α , cada una con 141 aminoácidos, codificados por 871 pares de bases, ubicadas en el cromosoma 16

⁷; y dos cadenas β , cada una con 146 aminoácidos, codificados por 1605 pares de bases ubicadas en el cromosoma 11 ⁸. La proteína en total contiene 574 y tiene la importante función de transportar el oxígeno que respiramos a los diferentes tejidos a través de la sangre.

El conjunto de genes dentro de un organismo se denomina genoma, y el conjunto de diferentes proteínas dentro de un organismo se conoce como proteoma, y son estudiadas por dos ciencias ómicas, la genómica y la proteómica, respectivamente.

Es importante recordar que la secuencia de aminoácidos de una proteína depende de la secuencia de bases nitrogenadas de un segmento de ADN, o gen. Este paso de ADN a proteína requiere un paso intermedio, el cual consiste en una secuencia de RNA, también un ácido nucleico, pero con características un poco diferentes a las del DNA, y en el cual su secuencia depende también de la secuencia de DNA. El paso de DNA a RNA mensajero (mRNA) se conoce como transcripción, y el paso de mRNA a proteína se conoce como traducción. Estos dos procesos se conocen en conjunto como el dogma central de la biología molecular (**Figura 3.18**) y representan un hito dentro del conocimiento pues ha permitido entender gran variedad de procesos dentro de los organismos, con múltiples aplicaciones en todos los ámbitos de la ciencia.

Figura 3.18. Dogma central de la Biología Molecular.

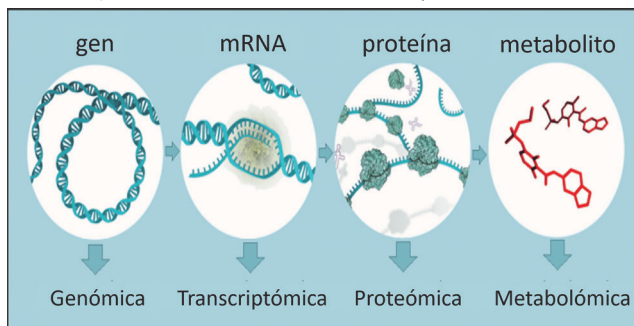


Fuente: elaboración propia.

¿Que son las ciencias Ómicas?

Las ciencias ómicas son todas aquellas como la genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica, epigenómica, entre otras, que se encargan del estudio del conjunto o repertorio de genes, proteínas, metabolitos, transcritos (mRNA), señales epigenéticas, respectivamente, dentro de un organismo (**Figura 3.19**). Estas ciencias permiten medir el nivel de un conjunto de analitos en un organismo, tejido o célula, en un determinado momento y en un determinado estado fisiológico, y compararlos con otros estados fisiológicos, y de esta manera entender la relación, complejidad y funciones de varios analitos con procesos y estados biológicos.

Figura 3.19. Ciencias ómicas y sus analitos.



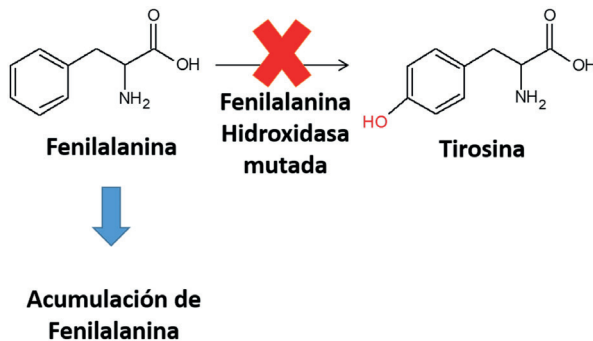
Adaptado de <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-metabolomics/what-metabolomics>⁹.

Genómica y Metagenómica

La genómica se encarga de estudiar el repertorio de genes dentro de un organismo (genoma) y cuales proteínas codifica o expresa. Esta ciencia permitió concluir mediante el proyecto del genoma humano, completado en 2003, que el humano (*Homo sapiens*) posee alrededor de 30.000 genes diferentes compuestos por más de 3000 millones de pares de bases, situadas a lo largo de sus 23 pares de cromosomas contenido en cada una de sus células¹⁰. Otros organismos más simples, como la bacteria *E. coli*, poseen alrededor de 4.400 genes contenidos en un solo cromosoma¹¹.

Este conocimiento posee múltiples aplicaciones, como por ejemplo la identificación de genes y mutaciones que están asociados a determinadas enfermedades genéticas, y nos da un punto de partida para el desarrollo de terapias para el tratamiento de la enfermedad causada por la mutación de un gen específico. La fenilcetonuria, por ejemplo, es una enfermedad genética, en la que la enzima fenilalanina deshidrogenasa no puede convertir la fenilalanina en tirosina y como consecuencia hay una acumulación tóxica de fenilalanina en el organismo, con graves efectos tóxicos en el cerebro (**Figura 3.20**). La mutación más frecuente es el cambio del aminoácido arginina por el triptófano, en la posición 488. Sin embargo, se han identificado alrededor de 550 mutaciones diferentes en el ADN que codifican para la fenilalanina deshidrogenasa, que conllevan a esta enfermedad ¹². Hoy en día, aunque no existe tratamiento para esta enfermedad, los pacientes fenilcetonúricos cuidan de su salud mediante una dieta baja en fenilalanina, sin embargo, nuevas tecnologías de manipulación genética están emergiendo y están siendo mejoradas como la del sistema CRISP/Cas9, que posiblemente podrá ser empleada en un futuro para corregir mutaciones asociadas a enfermedades. Recientes investigaciones ya han mostrado potencial de esta técnica para reparar mutaciones asociadas a la fenilcetonuria ¹³.

Figura 3.20. Mecanismo molecular de la fenilcetonuria. Los fenilcetonúricos poseen mutaciones en el ADN que codifica para una enzima fenilalanina hidroxilasa ineficiente, lo que conlleva a la acumulación de fenilalanina en el cuerpo.



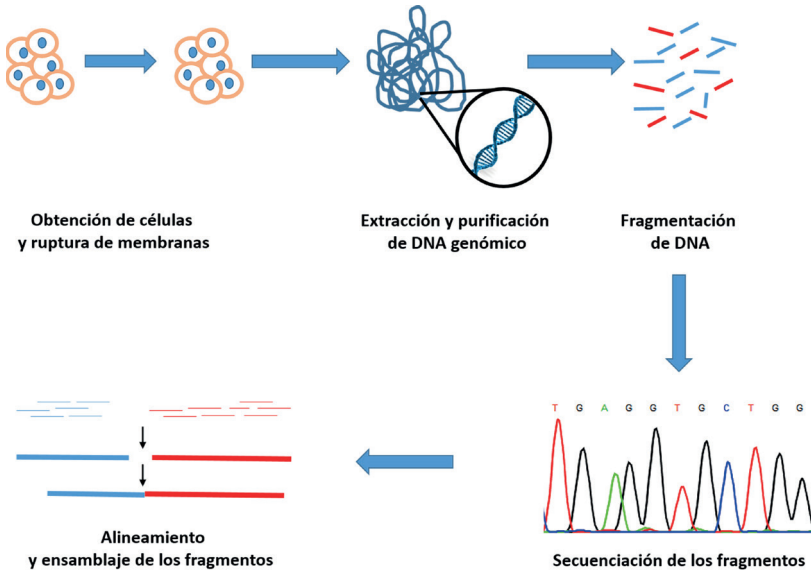
Fuente: elaboración propia.

La genómica permite estudiar también cualquier otro organismo, y hoy han sido secuenciados los genomas de múltiples organismos como algunas bacterias, virus, plantas, hongos, el humano, entre otros. De la genómica han surgido otras áreas como la filogenética, que como se explicó anteriormente permite observar las relaciones evolutivas entre diferentes especies como el humano y otros organismos, para responder preguntas como: ¿a partir de que organismos evolucionamos?, ¿cuánto tiempo llevó nuestra evolución hasta nuestro estado actual?, ¿de dónde provienen las diferentes etnias humanas? y ¿cuál es nuestro ancestro común? Adicionalmente el conocimiento de las secuencias de los genes y su correspondiente proteína, en varios organismos, ha permitido que mediante la biología molecular se desarrollen tecnologías como la de ADN recombinante, que permite la producción de proteínas y péptidos recombinantes con potencial en salud humana (ver capítulo dos).

¿Cómo se hace un análisis genómico?

Para hacer el análisis genómico de un organismo, primero se deben romper varias de sus células mediante métodos físicos o químicos y extraer la totalidad de su ADN que compone todos sus cromosomas. Posteriormente se procede a secuenciar el orden de las bases nitrogenadas. Como se mencionó anteriormente, la bioinformática cumple un papel esencial en la obtención y análisis de los datos arrojados por las ciencias ómicas; en genómica por ejemplo, mediante el uso de diferentes programas de computación se analizan las secuencias de varios fragmentos de ADN para luego ensamblarlos como un rompecabezas y de esta manera juntar todas las piezas para determinar la secuencia de grandes segmentos de ADN o el genoma en su totalidad, además nos dirá que proteínas codifican esos genes y permite observar si existen mutaciones en algunas de estas secuencias (**Figura 3.21**).

Figura 3.21. Esquema de un análisis genómico. Las membranas de las células a analizar serán rotas y se extraerá el DNA genómico, el cual será partido en pequeños fragmentos que serán secuenciados, alineados y ensamblados, para la elucidación de fragmentos mayores hasta conocer la totalidad de la secuencia del genoma.



Fuente: elaboración propia.

El proceso de secuenciación de genomas ha mejorado en los últimos años, debido a técnicas como el pirosecuenciamiento, Ion Torrent, entre otras, denominadas en conjunto como los secuenciadores de próxima generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*), las cuales son tecnologías que permiten secuenciar de forma más eficiente, económica y precisa regiones de DNA o genomas enteros, comparados con técnicas más antiguas como el secuenciamiento de Sanger, con el que fue secuenciado años atrás el genoma humano ¹⁴.

Ecosistemas y metagenómica

Un ecosistema es un conjunto de especies (parte biótica) que interactúan entre ellas en su respectivo ambiente (parte abiótica). Existen entonces ecosistemas de varios animales,

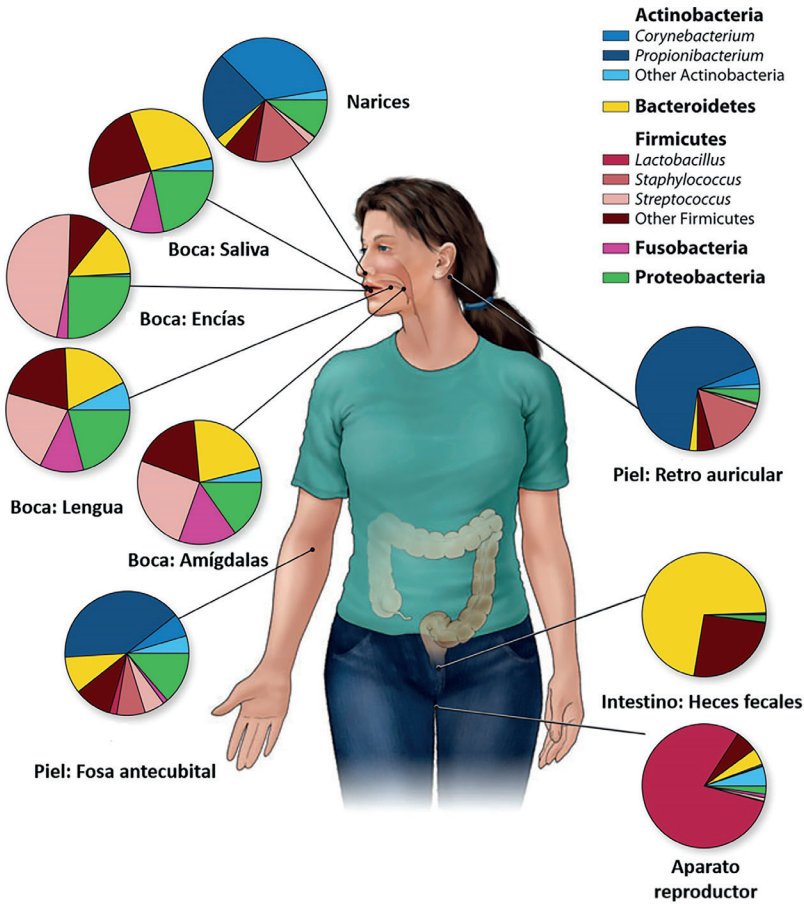
plantas e insectos, en las selvas, por ejemplo, ecosistemas marinos, compuestos por peces, corales, algas y otros, y ecosistemas microbianos, compuestos por bacterias, hongos, virus, en partes abióticas como el agua o la tierra de un determinado lugar, o inclusive dentro de organismos como es por ejemplo el caso del intestino del hombre o de los animales.

Las raíces griegas “meta” significa trascendente o más allá, y “genómica” es el estudio del conjunto de genes o genoma. La palabra metagenómica entonces significa el estudio de los genomas de más de un organismo, dentro de un ecosistema, por ejemplo, donde conviven simultáneamente varias especies diferentes. Mediante esta técnica se pueden conocer los componentes de una población microbiana sin necesidad de verlas o cultivarlas en el laboratorio.

Los microorganismos están literalmente presentes en todo lugar y la diversidad y cantidad de estos en un determinado ecosistema es muy importante, porque a pesar de que son organismos microscópicos tienen gran influencia e impacto en las condiciones físicas y químicas de un lugar. Bacterias fotosintéticas, o mejor conocidas como cianobacterias, por ejemplo, son los principales organismos, que se sospecha, fueron los causantes de enriquecer la atmósfera con el oxígeno que todos los organismos aerobios respiramos ¹⁵. Bacterias fijadoras de nitrógeno, conocidas como diazótrofos, son también otro ejemplo de la gran capacidad de estos seres, pues fijan el nitrógeno atmosférico a la tierra, en forma de amonio, el cual es importante para el crecimiento de las plantas ¹⁶.

Interesantemente en el cuerpo humano hay 10 veces más microorganismos que células propias, conformadas por varias especies de bacterias, hongos y virus, los cuales residen en varias partes del cuerpo como la piel, las mucosas, el intestino, etc. ¹⁷. Es por esto que el humano es considerado hoy en día como un meta-organismo ¹⁸ (**Figura 3.22**).

Figura 3.22. Microbiota de varias áreas del cuerpo humano.



Adaptado de Grice EA et al ¹⁹.

Somos entonces un ecosistema en el que residen múltiples especies de microorganismos, de los cuales algunos son benéficos y otros no, desarrollando entonces con nosotros relaciones de parasitismo, mutualismo, comensalismo, etc. Cada día es más evidente la importancia y el alto impacto que el repertorio de microorganismos (microbioma) tiene en nuestro cuerpo, ya que influyen varios aspectos de nuestra fisiología, determinando estados de salud o enfermedad ²⁰.

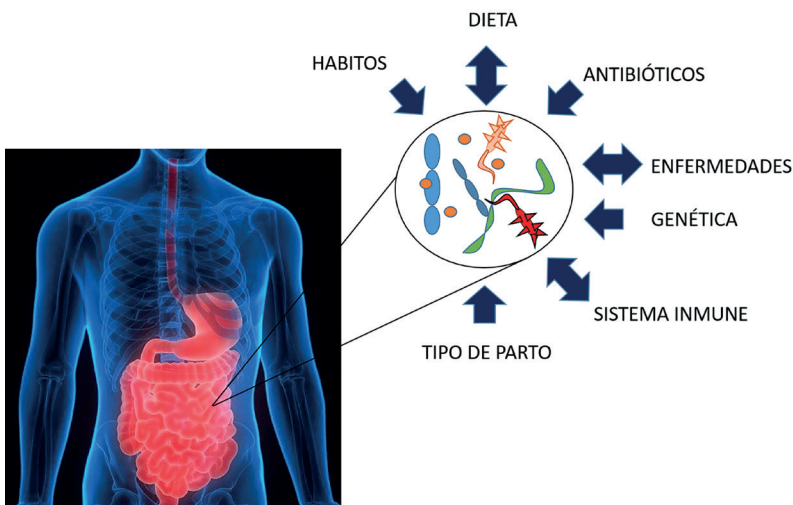
La microbiota del tracto gastrointestinal, por ejemplo, ha sido extensamente estudiada y se ha evidenciado que tiene gran importancia fisiológica y metabólica, pues de ella depende la utilización de múltiples nutrientes presentes en los alimentos. De igual manera sucede con otros organismos como los rumiantes, las cuales poseen comunidades microbianas en áreas específicas de sus estómagos, como el rumen, en el cual se encargan de digerir y hacer disponible los nutrientes presentes en las plantas que comen para la obtención de energía. Además de esto, la microbiota puede influir también negativamente en nuestras vidas, pues hay varios estudios que demuestran que un desbalance en la composición de algunas bacterias, o disbiosis, en el tracto gastrointestinal, puede llevar al desarrollo de enfermedades como el síndrome del intestino irritable, enfermedad celiaca o enfermedades metabólicas como resistencia a la insulina u obesidad ^{20, 21}.

Tradicionalmente los estudios de composición de especies microbianas en diferentes ecosistemas se han realizado gracias a las técnicas de cultivo microbiológico y análisis microscópico y bioquímico, sin embargo, es ampliamente aceptado que tan solo 0.1 al 1% de las especies microbianas conocidas son susceptibles de ser cultivadas con los tradicionales protocolos de cultivo microbiano, por lo que la metagenómica ha surgido como una importante herramienta que facilita el estudio del repertorio de microorganismos en cualquier nicho sin necesidad de cultivos ²², lo cual ha permitido conocer mucho más a fondo las comunidades bacterianas, incluyendo el microbioma de muchas personas para relacionarlo con estados fisiológicos o patológicos. Gracias a los nuevos avances en la ciencia se están develando la complejidad de las interacciones entre las células de nuestro cuerpo y los diferentes microorganismos que residen allí, lo cual permite idear abordajes que permitan el tratamiento de enfermedades o el mejoramiento de la calidad de la vida.

La microbiota en el tracto gastrointestinal de cada individuo está compuesta por más de 1000 especies diferentes de microorganismos, dentro de los cuales destacan los filos

Bacteroidetes y Firmicutes ²³. Esta composición es moldeable y dinámica, pues está influenciada por múltiples parámetros tanto genéticos como ambientales, además puede ser alterada por procedimientos quirúrgicos o tratamientos con antibióticos, pero inicialmente es influenciada por la microbiota de la madre y el tipo de parto (vía vaginal o vía cesárea). Adicionalmente, la microbiota del tracto gastrointestinal también es afectada por el tipo de alimentación del recién nacido (leche materna versus fórmulas sintéticas) o los hábitos alimenticios (gastronomía) de los habitantes de una determinada región ²⁴. Por lo tanto, la microbiota difiere dependiendo de la comunidad o etnia donde se analice ²⁵. Además de esto, la microbiota puede alterarse por procedimientos quirúrgicos, que inducen inflamación, o por tratamiento con antibióticos (**Figura 3.23**). Aún más interesante son las conclusiones de algunos estudios que indican que la microbiota influye de vuelta en la dieta por la que sentimos gusto, lo cual explica porque es a veces tan difícil cambiar los hábitos alimenticios.

Figura 3.23. La microbiota del tracto gastrointestinal y las diferentes variables que afectan su composición.



Fuente: elaboración propia.

Es interesante observar que la microbiota de los organismos carnívoros es menos diversa que la de los organismos herbívoros, lo cual puede estar relacionado con la alta complejidad de polisacáridos presentes en los vegetales, los cuales son más difíciles de procesar.

Una persona que se habitúa a tener una dieta saludable posee una microbiota diferente a la que tiene una persona con una dieta no saludable. Se ha comprobado que las personas obesas tienen una microbiota que extrae más eficientemente energía de los alimentos que una persona no obesa, lo que está directamente relacionado con la formación de tejido adiposo y extracción de energía de los alimentos ²⁶. Experimentos realizados con ratones han demostrado que, en ratones obesos, la tasa de especies Bacteroidetes es mayor que la de Firmicutes, cuando se compara con ratones delgados, y que la microbiota se puede trasplantar de un ratón delgado a uno obeso para evitar la ganancia de masa corporal. Además de esto, se ha observado que el adelgazamiento o incremento de peso de los ratones es regulado mediante la coprofagia, es decir que la alimentación en ratones con heces permite el intercambio de microbiota de unos ratones a otros y por ende la regulación de la textura y estado fisiológico ^{27, 28}.

Otro nicho ecológico importante en el humano es la piel, donde residen diferentes bacterias, virus y hongos. El balance de estas comunidades microbianas es también importante, pues se ha observado que el desbalance debido a la proliferación de algunos microorganismos específicos conlleva a enfermedades o desordenes cutáneos. La dermatitis seborreica por ejemplo está relacionada con la alta proliferación del hongo *Malassezia spp*, el cual mediante su metabolismo deposita diferentes lípidos en la piel, lo cual ocasiona inflamación y descamación. Otros desordenes como el acné es causado por la bacteria *Propionibacterium. acnes* (actualmente denominada *Cutibacterium acnes*) después de la pubertad ^{29, 30}.

Investigaciones recientes han establecido también que hay una relación importante entre la microbiota del aparato gastrointestinal y el cerebro, es decir, entre los microorganismos y la salud mental. Aunque este campo es relativamente nuevo, parece ser que situaciones de estrés mental o diferentes enfermedades mentales y cognitivas pueden alterar la microbiota, y viceversa ³¹.

La metagenómica y los ejemplos de investigaciones mencionadas anteriormente han brindado las bases para el entendimiento de la relación entre la composición microbiana y el estado fisiológico, lo que ha permitido diseñar algunas bacterioterapias para la modificación de estos nichos mediante la introducción de algunas bacterias beneficiosas mediante la dieta, como es el caso del consumo de alimentos prebióticos como los lácteos con *Lactobacillus*, o mediante el trasplante de microbiota fecal desde las heces de una persona donadora a el aparato gastrointestinal de una persona receptora con fines terapéuticos ^{31, 32}. Con respecto al campo de la relación microbiota del aparato intestinal-cerebro, han surgido un nuevo tipo de tratamientos conocidos como psicobióticos, los cuales son probióticos con determinados microorganismo que alteren de forma beneficiosa la salud mental ³³.

¿Cómo se hace un análisis metagenómico?

Debido a los avances en las técnicas de secuenciación y en el entendimiento del gran impacto que la microbiota tiene en el humano, en 2005 se inició el proyecto microbioma humano (HMP, del inglés *Human Microbiome Project*) el cual es un análisis metagenómico de la microbioma del tracto gastrointestinal de numerosas personas sanas, lo que permite determinar el perfil microbiológico de estas y ver diferencias con personas que sufren determinada enfermedad que puede ser causada por disbiosis ^{34, 35}.

Un análisis metagenómico consiste en secuenciar simultáneamente el genoma entero o un fragmento específico de los organismos presentes en un nicho. Secuenciar total o parcialmente depende del objetivo de estudio. La secuenciación parcial permite identificar los organismos presentes allí y su taxonomía, mientras que la secuenciación de los genomas completos, permite, además de identificar y cuantificar los organismos presentes allí, también conocer las posibles funciones de sus genes, las implicaciones y su potencial metabólico. Para la secuenciación parcial que permite la identificación de microorganismos se hace uso de la secuencia del fragmento pequeño 16S del ribosoma: una secuencia de ADN que codifica para una molécula de ARN ribosomal, que está presente en el ribosoma de células procariotas (organismos del dominio Archae y Bacteria) y que está altamente conservado. Los análisis metagenómicos permiten la identificación de diferentes microorganismos mediante la secuenciación e identificación de las pequeñas diferencias en la secuencia del 16S rARN, así pues, secuencias específicas localizadas en la llamada zona hipervariable, dentro de esta molécula altamente conservada permite la correlación con la secuencia de una especie microbiana específica, almacenada en una base de datos ^{22, 36}.

Para empezar el análisis, las muestras a analizar se deben recolectar, por ejemplo, muestras de saliva, sangre, heces, aguas, tierra, etc., y posteriormente se rompen las membranas celulares y se extrae el ADN total de todos los tipos de células contenidas allí. Para secuenciación parcial o completa, los fragmentos de ADN se deben amplificar, es decir, generar múltiples copias de los fragmentos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y a continuación los fragmentos se deben secuenciar, lo cual se puede hoy en día realizar eficazmente gracias a las actuales técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS), los datos obtenidos se analizan mediante el uso de diferentes software bioinformáticos que permiten identificar las secuencias analizadas como parte de un microorganismo u otro ²².

Metabólica

Las proteínas, son macromoléculas formadas por aminoácidos, con funciones muy importantes en los procesos celulares, como por ejemplo el metabolismo, que es el conjunto de procesos de transformación de la materia dentro de un organismo, para la construcción de componentes dentro de una célula (anabolismo) o la destrucción de componentes para la obtención de energía (catabolismo).

La glicólisis, por ejemplo, es un proceso metabólico, asistido por diez enzimas (proteínas) diferentes, en el que una molécula de glucosa (un metabolito), después de ingerida en los alimentos, es transformada a dos moléculas de piruvato y 2 de ATP, dos metabolitos de los cuales se puede extraer energía requerida posteriormente por la célula. Cabe recalcar que, así como la glicólisis existe una amplia gama de rutas metabólicas, como el ciclo de Krebs, ciclo de Cori, ruta de las pentosas, etc, mediadas por enzimas diferentes, y que sirven para la transformación de una gran cantidad de metabolitos diferentes, importantes para el funcionamiento de la célula³⁷. El conjunto de metabolitos, que son compuestos e intermediarios químicos de bajo peso molecular, dentro de una célula en un determinado momento, es el resultado de todas las rutas metabólicas y se conoce como metaboloma.

Debemos tener en cuenta que algunas rutas metabólicas están presentes en unos organismos, pero no en otros. El humano por ejemplo, gracias a su material genético, posee la información necesaria en su ADN que codifica para varias enzimas que son importantes en algunas vías anabólicas, como la construcción de algunos aminoácidos que posteriormente serán utilizados en la construcción de varias proteínas, es decir, la propia célula humana puede sintetizar estos aminoácidos; sin embargo, el ADN humano no posee la información genética que codifica para algunas otras enzimas importantes en otras rutas anabólicas de otros aminoácidos, por lo que se hace necesario la ingesta de

estos compuestos, llamados aminoácidos esenciales. Se sabe que algunos otros organismos menos evolucionados poseen las rutas anabólicas de los aminoácidos esenciales de las cuales el humano carece, por lo que se especula que el humano perdió el ADN que codifica para estas enzimas a lo largo de la evolución.

Así como para las enzimas que sintetizan los aminoácidos esenciales, existen innúmeros ejemplos que muestran diferencias en el material genético entre el humano y otras especies, y por consiguiente hay diferencias en la variedad de proteínas que expresan, y por consiguiente hay diferencias en rutas metabólicas. La vitamina B12, por ejemplo, es una sustancia importante para nuestro funcionamiento. Debido a que no poseemos la información genética para producirla y es una sustancia importante en nuestra fisiología, la debemos obtener de fuentes externas consumiéndola en su forma natural mediante la ingesta de plantas que conviven en simbiosis con bacterias que la producen, o consumirla como suplemento vitamínico, producido por fermentaciones bacterianas en la industria biotecnológica ³⁸.

El metaboloma permite conocer el estado fisiológico en el que se encuentra una célula en determinado momento. Por ejemplo, una célula que está altamente activa, como por ejemplo las células de los músculos de un deportista, deben poseer grandes cantidades de ATP para utilizarlo como energía para la contracción muscular y poca glucosa, debido a su alto metabolismo para la obtención de del ATP, comparado con una persona en reposo, el cual está metabolizando menos la glucosa, por lo que debe tener más glucosa y menos ATP ³⁷.

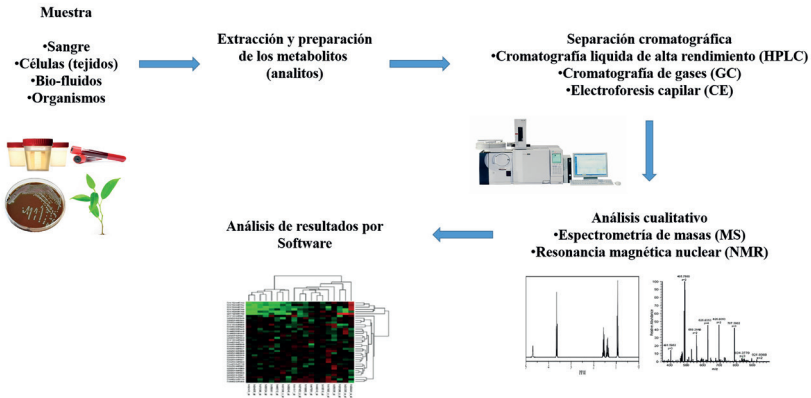
El metabolismo no solo depende del estado fisiológico de una célula, sino también del tipo de célula, lo cual es importante en especies más complejas como los animales, los cuales poseen diferentes tipos de células, que componen diferentes tejidos que a su vez componen los diferentes órganos. Es importante tener en cuenta que a pesar de que cada célula dentro de un organismo como el humano, posee el mismo material genético (ADN),

las proteínas que se expresan en células de diferentes tejidos y órganos son diferentes en parte, es decir, cada tipo de célula tiene el mismo ADN, pero posee programas de expresión génica diferentes. La alcohol deshidrogenasa, por ejemplo, a pesar de estar codificada en el ADN de cada una de las células del cuerpo humano, es expresada preferencialmente en las células del hígado y de la mucosa gástrica, lo que genera un proteoma diferente y por consiguiente un metaboloma diferente, a pesar de tener el mismo genoma.

¿Cómo se hace un análisis metabolómico?

Inicialmente se debe obtener la muestra que se debe analizar y se debe tener en cuenta si es un organismo unicelular o multicelular, si posee tejidos diferentes o no. En el humano por ejemplo se puede analizar el metaboloma de células de la piel o algún otro órgano, el suero obtenido de la sangre, o la orina por ejemplo (la cual no posee células, pero si productos de desecho de órganos como los riñones). Posteriormente se deben extraer los metabolitos de la muestra; si se trata de una muestra acelular como los bio-fluidos (orina o plasma sanguíneo), se realiza una extracción con solventes, pero si es una muestra celular (células o un tejido), se debe inicialmente romper la membrana plasmática de las células y a seguir se extraen los metabolitos contenidos en su interior. Los metabolitos son en este caso los analitos, es decir, las especies químicas o moléculas que serán examinadas cuantitativa y cualitativamente. Por su gran número y complejidad se necesitan inicialmente técnicas como la cromatografía de gases (GC, del inglés *Gas Chromatography*), cromatografía líquida de alta rendimiento (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) o electroforesis capilar (CE, del inglés *Capillary Electrophoresis*), que permiten separar los diferentes componentes de una mezcla y su posterior identificación mediante otras técnicas como la espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) o la resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*)³⁹ (**Figura 3.24**).

Figura 3.24. Esquema de un análisis metabolómico. Después de obtener las muestras para analizar, se realiza una extracción de los metabolitos que serán inicialmente separados por técnicas cromatográficas y después identificados por técnicas como MS y NMR. Finalmente, un análisis computacional (bioinformático) se realiza para analizar los datos.



Fuente: elaboración propia.

PERSPECTIVAS EN EL DEPARTAMENTO

En la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira, se han realizado análisis metabolómicos en algunas investigaciones. Junto con los análisis metagenómicos, estas dos técnicas pretenden ser la base de futuros proyectos con impacto en el área agroalimentaria y de la salud en departamento de Risaralda.

Como es sabido, los pesticidas, usados para el control de plagas en el cultivo de frutas y hortalizas, pueden tener efectos negativos en la salud del consumidor, por lo que en la Facultad se han realizado análisis metabolómicos mediante experimentos *in vitro* con el fin de evaluar el efecto de algunos pesticidas organoclorados como el Aldrin, DDT, Lindano y Endosulfan, sobre el metabolismo hepático y por consiguiente en el metaboloma⁴⁰. Los resultados han permitido determinar la existencia de

potenciales biomarcadores que podrían emplearse en el futuro para el diagnóstico de la intoxicación por pesticidas organoclorados. Adicionalmente, se están iniciando estudios encaminados al estudio de la diversidad microbiana presente en suelos de cultivos de plátano en diversas regiones del Departamento de Risaralda, con el fin de establecer el papel de las comunidades microbianas presentes en el suelo en el control de agentes infecciosos.

CONCLUSIONES

La evolución de las especies es un proceso que comenzó desde el surgimiento de la vida en el planeta y ha permitido la aparición de una gran variedad de organismos unicelulares y pluricelulares, cada uno con su propio material genético, el cual les confiere la habilidad de adaptarse a diferentes nichos y ecosistemas, y un metabolismo que les permite realizar transformaciones bioquímicas fundamentales para los diferentes procesos biológicos. Los microorganismos, aunque invisibles a nuestros ojos, tienen una gran influencia en las condiciones químicas y físicas en ecosistemas como los bosques, o dentro de un organismo como el humano. Las ciencias ómicas como la metagenómica y la metabolómica son importantes porque permiten entender la complejidad de las especies presentes en un lugar determinado y la influencia que ejercen unas especies sobre otras. El entendimiento de dichas relaciones permitirá afrontar la búsqueda de soluciones a problemas en diferentes áreas como la agricultura, la medicina y las ciencias ambientales, entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berger B, Peng J, Singh M. Computational solutions for omics data. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(5):333-46.
2. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 2011; 9(8):e1001127.
3. Larsen BB, Miller EC, Rhodes MK, Wiens JJ. Inordinate Fondness Multiplied and Redistributed: the Number of species on Earth and the New Pie of Life. *Q Rev Biol.* 2017; 92(3):229-65.
4. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87(12):4576-9.
5. Barone A, Chiusano ML, Ercolano MR, Giuliano G, Grandillo S, Frusciante L. Structural and functional genomics of tomato. *Int J Plant Genomics.* 2008:820274. 10.1155/2008/820274
6. National Center Biotechnology Information (NCBI). [Internet]. [1 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>.
7. Genetics Home Reference - HBA1 gene [Internet]. [17 de Agosto de 2020; 1 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HBA1#sourcesforpage>.
8. Genetics Home Reference - HBB gene [Internet]. [17 de Agosto de 2020; 1 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HBB#location>.
9. EMBL-EBI. What is metabolomics? [Internet]. [1 de Octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-metabolomics/what-metabolomics>.

10. Michael R. Cummings y William S. Klug. Conceptos de Genética. 10 ed. Pearson Education. Madrid. 2013
11. National Center Biotechnology Information (NCBI). *Escherichia coli* [Internet]. [1 de Octubre del 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=escherichia%20coli>.
12. PAH: Phenylalanine hydroxylase locus knowledgebase [Internet]. [1 de Octubre del 2020]. Disponible en: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>
13. Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, Betzen C, Hoffmann GF, Hoheisel JD, et al. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. *Sci Rep*. 2016; 6:35794.
14. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Res Int*. 2012; 2012:251364.
15. Madigan M.T MJM, Dunlap P.V. and Clark D.P. *Brook - Biología de microorganismos*: 12 ed. Pearson Education. Madrid. 2009.
16. Shridhar BS. Nitrogen fixing microorganisms. *Int J Microbiol Res*. 2012; 3:46-52.
17. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res*. 2009; 16(1):1-12.
18. Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P. Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age*. 2012; 34(1):247-67.
19. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012; 13:151-70.

20. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; 31(1):69.
21. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 2013;62(10):3341-9.
22. de Raimondi SG. Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos. *Bitácora Digital*. 2013;1(2):1-6.
23. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012; 489(7415):220-30.
24. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26(1):26050.
25. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2014; 7(1):17-44.
26. John GK, Mullin GE. The gut microbiome and obesity. *Curr Oncol Rep*. 2016;18(7):45.
27. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013; 341(6150):1241214.
28. Kulecka M, Paziewska A, Zeber-Lubecka N, Ambrozkiwicz F, Kopczyński M, Kuklińska U, et al. Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutr. Metab*. 2016; 13(1):57.
29. Sanford JA, Gallo RL, editors. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol*. 2013; 25(5): 370–377.

30. Zisova LG. *Malassezia* species and seborrheic dermatitis. *Folia Med.* 2009; 51(1):23.
31. MacQueen G, Surette M, Moayyedi P. The gut microbiota and psychiatric illness. *J Psychiatry Neurosci.* 2017; 42(2):75.
32. Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO. Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therap Adv Gastroenterol.* 2016; 9(2):229-39.
33. Deans E. Microbiome and mental health in the modern environment. *J Physiol Anthropol.* 2017; 36:1.
34. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis.* 2015; 26(1):26191.
35. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464(7285):59-65.
36. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, et al. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Front Microbiol* 2016; 7. 459.
37. Jeremy Mark Berg LS, John L. Tymoczko. *Bioquímica* 6 ed. Editorial Reverté. 2007.
38. Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B 12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact.* 2017; 16(1):15.
39. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst.* 2012; 137(2):293-300.

40. Zuluaga M, Melchor JJ, Tabares-Villa FA, Taborda G, Sepúlveda-Arias JC. Metabolite Profiling to Monitor Organochlorine Pesticide Exposure in HepG2 Cell Culture. *Chromatographia*. 2016; 79(17-18):1061-8.

Plantas Medicinales

Jenny Marcela Vélez-Gómez¹; Luz Ángela Veloza¹; Juan Carlos Sepúlveda Arias². ¹Grupo Polifenoles. Escuela de Química, Facultad de Tecnología. ² Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción y generalidades

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado las plantas con diversos fines; como fuente de madera y fuego, para la regulación del clima, producción de oxígeno, como decorativas, para aplicaciones industriales (textiles, cosméticos, perfumes, alimentos, entre otras) y por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (plantas aromáticas y medicinales); siendo éste último uno de los usos más importantes y con mayor trascendencia a través del tiempo ¹.

Los sumerios hace 4000 años aportaron el primer registro escrito sobre plantas medicinales citando entre otras plantas el laurel, tomillo y comino; los egipcios en el año 1.500 a.C. desarrollaron más de 700 preparados, utilizando adormidera, ajo, aceite de ricino, cilantro, menta, añil y otras plantas medicinales; en el papiro de Ebers, plasmaron las fórmulas magistrales para el tratamiento de diferentes enfermedades. El primer libro chino sobre plantas, el *Shennong Bencao Jing*, compilado durante la dinastía Han, lista 365 plantas medicinales y sus usos, incluyendo ma-huang, el arbusto del que se obtuvo originalmente la efedrina. En la India, en el *Sushruta Samhita*, del siglo VI a. C., se describen 700 plantas medicinales, 64 preparaciones que provienen de fuentes minerales, y 57 provenientes de animales. Los griegos usaron las plantas aromáticas por razones terapéuticas y nutricionales; Hipócrates, el padre de la medicina recomendaba el ejercicio físico, el aire fresco y el uso de hierbas para tener buena

salud. Los médicos griegos escribieron el primer tratado sobre propiedades y usos de las plantas medicinales, *De materia médica*, en el siglo I d. C ¹.

Para los siglos XV, XVI y XVII se conocen nuevas especies de plantas aromáticas y medicinales, a través de libros escritos en castellano, inglés y otros idiomas en lugar de latín o griego. Los tiempos de exploración e intercambio con América introdujeron nuevas plantas medicinales en Europa, un ejemplo es el *Badianus Manuscript*, libro azteca sobre plantas traducido al latín en el siglo XVI.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce y estimula el valor de las plantas medicinales en la atención primaria de millones de personas y considera que el 80% de la población mundial usa la medicina alternativa y tradicional para el cuidado primario de su salud. En los últimos 35 años, aproximadamente el 70% de los medicamentos empleados en el tratamiento del cáncer y de las enfermedades infecciosas son de origen natural. A pesar que la literatura científica seria y confiable sobre la eficacia y seguridad de las plantas empleadas de manera empírica con fines medicinales es escasa, en los últimos cinco años se han publicado diversos estudios evaluando primordialmente los productos empleados por la medicina tradicional china y la medicina ayurvédica india ². Los avances en el estudio de las plantas en nuestro medio incluye la búsqueda de nuevas especies vegetales con actividades biológicas promisorias, estudio fitoquímico de especies ya conocidas y sus usos medicinales, y la comprobación científica de las propiedades que por factores ancestrales se han atribuido a distintas plantas ³. Sin embargo, existe todavía una gran cantidad de información comercial sin validación científica sobre el uso de las plantas medicinales.

En el mundo hay aproximadamente 500.000 especies vegetales, de estas 50.000 a 70.000 pertenecen a las plantas medicinales y aromáticas. En Colombia se ubica el 10% de las

especies vegetales del mundo, haciendo parte de más de 200 familias botánicas, entre ellas: Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae, Piperaceae y Rosaceae. Existen 2404 plantas con reportes de uso medicinal en Colombia, esto hace que el país sea considerado mega biodiverso, ubicándose en las primeras posiciones de biodiversidad en el mundo y convirtiéndose en una fuente potencial de nuevos compuestos activos provenientes de plantas, ayudando a contribuir con aportes médicos valiosos para la prevención, tratamiento y curación de enfermedades de manera más eficaz, segura y a bajos costos ⁴.

Con relación a la legislación colombiana relacionada con productos de origen natural, el Ministerio de Salud y Protección Social mediante el Decreto 1156 de 2018 reglamenta el régimen de registro sanitario de productos fitoterapéuticos y define que son las preparaciones farmacéuticas con base en plantas medicinales y los productos fitoterapéuticos ⁵, además, para el registro sanitario de productos fitoterapéuticos los clasifica en tres categorías: 1. Preparaciones farmacéuticas con base en plantas medicinales (PFM), 2. Producto fitoterapéutico de uso tradicional (PFT), 3. Producto fitoterapéutico de uso tradicional importado (PFTI).

El Decreto 1156 también define las características de los establecimientos distribuidores, expendedores y fabricantes de preparaciones farmacéuticas con base en recursos naturales. Deja constancia que la Licencia Sanitaria de Funcionamiento es una autorización para que un establecimiento fabrique productos, previa verificación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) o de las Normas Técnicas de Fabricación. Es decir, estos productos deben ser fabricados en laboratorios que cumplan normas higiénicas adecuadas, control de calidad, áreas estériles, etc. y que en ellos sólo se podrán fabricar y vender los productos aprobados por el INVIMA (Instituto nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). Sin embargo y a pesar de las reglamentaciones existentes, aún existe demasiada comercialización de productos sin control alguno, de venta libre, formulados por personas que no

han tenido ninguna capacitación en estos campos. También hay que anotar que existen herbolarios y conocedores que conservan la tradición oral del uso empírico de las plantas medicinales en el campo, pueblos y ciudades y prestan una ayuda muy valiosa en la atención primaria en salud en regiones muy apartadas donde no llega la medicina occidental, además, contribuyen al mantenimiento de una cultura etnobotánica y etnofarmacológica ².

Los siguientes son ejemplos de algunas investigaciones llevadas a cabo en diferentes regiones del país sobre diferentes tipos de plantas medicinales y sus respectivos usos. Una investigación realizada en Sogamoso-Boyacá, con campesinos de la región que mantienen una cultura de saberes tradicionales y emplean las plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas animales, se evaluaron 178 especies pertenecientes a 55 familias con relación a sus propiedades, usos medicinales, parte de la planta usada y formas de preparación. Las especies más utilizadas fueron: Caléndula (Asteraceae) en un 90% seguida de Yerbabuena (Lamiaceae) en un 85% y Toronjil (Lamiaceae) en un 80%. En general las plantas fueron empleadas para calmar dolores de estómago, nervios, golpes, dolor de cabeza, dolor de muela y quemaduras ⁶.

Otro estudio realizado en 61 herbolarios de la plaza Samper Mendoza de Bogotá, mostró que el conocimiento sobre las plantas medicinales fue transmitido principalmente por los padres, que el nivel de educación alcanzado en casi todos los casos fue la primaria y que ninguno tuvo formación universitaria. Las plantas más citadas fueron Caléndula, Manzanilla y Cola de Caballo, seguidas por Diente de León, Yerbabuena, Ajenjo y Parietaria. Así mismo, se encontró que las familias más utilizadas fueron Lamiaceae y Asteraceae. Para el tratamiento de las infecciones urogenitales usaron Cola de Caballo, para respiratorias la Mora, para las gastrointestinales Yerbabuena y para las infecciones de piel y ojos emplearon la Caléndula ⁷.

Es importante saber que existen en el país cuatro iniciativas de política de interés sobre las especies de plantas medicinales, las cuales se relacionan a continuación.

Política Nacional de Biodiversidad

Fue creada por el Ministerio del Medio Ambiente y el Departamento de Planeación Nacional, con apoyo del Instituto Humboldt, y aprobada en el año de 1995 por el Consejo Nacional Ambiental, con el objeto de promover la conservación, el conocimiento y el uso sostenible de la biodiversidad, así como la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de su utilización.

Plan Nacional de Colecciones (2002)

Es un instrumento complementario de la Publicación del Plan Nacional de Jardines Botánicos y de la Estrategia para la Conservación de Plantas; el cual puede definirse como el conjunto de acciones propositivas encaminadas a lograr en las colecciones de los jardines botánicos la mayor representatividad de la flora nativa para su conservación, educación, investigación y uso sostenible, a través del fortalecimiento, reorientación, priorización y proyección de las colecciones articuladas con las necesidades de conservación regionales y nacionales.

Política Nacional de Investigación Ambiental (2001)

Tiene por objetivo “fortalecer la capacidad nacional y regional en la generación y utilización oportuna de conocimientos relevantes para el desarrollo sostenible, para lograr el mejoramiento, la calidad ambiental y las condiciones de vida de la población colombiana, conforme a la diversidad natural y cultural del país y en armonía con la Política Nacional Ambiental”.

Lineamientos para la Consolidación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas

Las áreas protegidas del territorio colombiano poseen la mayor parte de la riqueza natural de todo el país representada en la biodiversidad y grupos culturales. Por lo anterior, Colombia reservó zonas de su territorio con el fin de proteger y manejar de la mejor manera los recursos naturales, agrupando una de las más relevantes estrategias de conservación, de igual manera, el Sistema de Parques Nacionales Naturales conllevó la conformación posterior de un Sistema Nacional de Áreas Protegidas.

El Conpes 3680 de 2010 tiene como objetivo primordial establecer las pautas y orientaciones para avanzar en la consolidación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Colombia como un sistema completo, ecológicamente representativo y eficazmente gestionado, de forma que se contribuya al ordenamiento territorial, al cumplimiento de los objetivos nacionales de conservación y al desarrollo sostenible en el que está comprometido el país ⁸.

Con relación a las plantas medicinales, las especies vegetales que hacen parte de este grupo son de prioritaria conservación en el SINAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas). De esta forma los principios del Conpes 3680 se enlazan con elementos de la ENCP (Estrategia Nacional para la Conservación de las Plantas), por lo que ambos convergen para contribuir al cumplimiento de las disposiciones del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) en la región colombiana ⁴.

Es importante destacar también el VADEMÉCUM COLOMBIANO DE PLANTAS MEDICINALES, publicado por el Ministerio de Protección Social; el cual es un compendio que aporta información científica sobre las plantas: nombre común

y científico, parte de la planta que se utiliza, usos tradicionales, principales constituyentes, actividad farmacológica, etc. El vademécum debe ser una guía utilizada tanto por los profesionales de la medicina como por los herbolarios puesto que la información que contiene es científicamente comprobada⁹.

Clasificación de las plantas según su efecto sobre la salud humana

• Plantas Medicinales.

Se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir de precursores para la hemisíntesis de nuevos fármacos (OMS, 2009). Existen diferentes tipos de plantas que se consideran medicinales e incluyen, árboles, arbustos y herbáceas. Forman aproximadamente la séptima parte de las todas especies vegetales.

• Plantas Aromáticas.

Las plantas aromáticas contienen cantidades apreciables de compuestos químicos que se pueden percibir de manera fácil por el olfato. Estos compuestos son básicamente fenoles y derivados fenólicos; y los podemos encontrar en varias partes de la planta como: las raíces, los tallos, las flores, los frutos, las hojas, o en todas ellas. Las plantas aromáticas son conocidas como hierbas aromáticas, debido a su característica herbácea como la menta, el tomillo, el orégano, o arbustivas como el romero y la ruda; sin embargo, se encuentran también la canela, el eucalipto y la nuez moscada que son plantas arbóreas. Las plantas aromáticas tienen usos condimentario, medicinal, ornamental, cosmético, entre otros.

• **Plantas Culinarias o Condimentarias**

Son aquellas plantas que tienen su uso fundamentalmente en la cocina para condimentar guisos, sopas, ensaladas, postres y salsas, sin embargo, sus usos son múltiples. Las especies vegetales más utilizadas para este fin son: perejil, romero, orégano, albacá, tomillo, yerbabuena, entre otras.

• **Espicias.**

Sustancias vegetales de sabor intenso utilizadas para condimentos por sus propiedades aromáticas y de preservación. Dentro de ellas se encuentran: pimienta, pimentón, vainilla, canela, anís, coriandro, comino, laurel, etc ¹⁰.

Propiedades Terapéuticas

Los fitoquímicos son los compuestos químicos que hacen parte de los principios activos de las plantas, y son los responsables de los efectos curativos en los seres humanos; éstos se clasifican en:

1. Heterósidos

Están formados por dos partes: un azúcar y una aglicona, aglicón o genina. El enlace que une estas dos partes se debe hidrolizar para que la molécula se active, la hidrólisis es catalizada por sustancias propias de las plantas. Estos compuestos poseen actividades biológicas y se debe principalmente a la parte no glucídica. Algunos de los Heterósidos más representativos se muestran en la **Tabla 3.6** ¹¹.

Tabla 3.6. Heterósidos y uso tradicional.

Tipo de compuesto	Uso tradicional	Fuente
Sulfurados	Antibiótico	Ajo, Cebolla, Rábano
Saponósidos	Hemólisis Emoliente Dermatitis	Abedul, Maíz, Regaliz, Saponaria, Violeta
Ranunculósidos	Irritante para la piel	Ranunculáceas
Flavónicos	Fragilidad capilar Vitamina C	Girasol, Ruda
Cumarínicos	Antibacteriano Anticoagulante Protector solar	Avena
Cianogénicos	Anestésico Antiespasmódico Hipotensor	Cerezo, Guindo, Almendro
Cardiotónicos	Diurético Tónico cardíaco	Digital
Antraquinónicos	Purgante	Aloe, Ruibarbo, Sen, Frágula, Cáscara Sagrada, Espino Cerval

Fuente: elaboración propia.

2. Polifenoles.

Son compuestos que poseen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Forman parte de este grupo de compuestos los siguientes:

Ácidos Fenólicos: poseen diversas aplicaciones farmacológicas, como antioxidantes, analgésicos, coleréticos, entre otras. En odontología se usa como antiséptico y anestésico local el Eugenol. El estado éter oxidado de algunos fenoles se encuentra presentes en esencias, como la miristicina, el apiol, el anetol y el estragol.

Cumarinas. Su uso terapéutico no es muy grande, sin embargo, es de gran importancia para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema vascular y afecciones en la piel (propiedades fotosensibilizantes). Algunas de las cumarinas más empleadas se muestran en la **Tabla 3.7.**

Tabla 3.7. Cumarinas más empleadas de acuerdo a su uso tradicional.

Tipo de compuesto	Uso tradicional	Fuente
Cumarina	Insuficiencia venolinfática	Meliloto
Esculósido	Tónico Venoso Protector de la pared celular	Castaño de indias
Visnadina	Vasodilatador	Visnaga

Fuente: elaboración propia.

Flavonoides. Se presentan con mucha frecuencia en el reino vegetal; son un amplio grupo de compuestos, la gran mayoría se caracterizan por ser solubles en agua y de carácter polifenólico. Para las especies vegetales este tipo de compuestos juega un papel muy importante, ya que son los que dan coloración a muchas flores, frutos y hojas, interviniendo en los procesos de polinización; además de proteger a las plantas de las radiaciones UV, son muy buenos antioxidantes. Los flavonoides que poseen mayor uso farmacológico son: las flavonas, los flavonoles y las flavononas. Entre las plantas medicinales donde la actividad que poseen está relacionada directamente con el contenido de flavonoides se tiene: manzanilla romana, espino blanco, cardo mariano, aquilea, regaliz, y ginkgo.

Lignanos. Desarrollan un papel clave en el crecimiento de las plantas y son antioxidantes para el metabolismo de los seres humanos. Están asociados a la lignina, la cual da soporte y rigidez a diferentes plantas vasculares y algunas algas.

Taninos. Metabolitos secundarios de las plantas, son hidrosolubles, están presentes en la corteza de algunos árboles, así como también en las raíces y pocas veces en las hojas. Poseen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Tienen otros usos como: cicatrizantes, antidiarreicos, antídoto para intoxicaciones, curtir pieles, entre otros.

Quinonas. Son muy abundantes en la naturaleza, especialmente en las especies vegetales, también se pueden encontrar en hongos y bacterias. Se clasifican dependiendo de

su complejidad estructural en las siguientes: Benzoquinonas, Naftoquinonas, Antraciclinoonas, Antraquinonas y Fenantraquinonas (**Tabla 3.8**)¹².

Tabla 3.8. Clasificación de las Quinonas y su uso tradicional.

Tipo de compuesto	Uso tradicional	Fuente
Iridoides	Anti-inflamatoria	Raíz de valeriana,
	Antimicrobiana	Harpagofito, Hoja de
	Amebicida	olivo, Raíz genciana
Lactonas Sesquiterpénicas	Anti-inflamatoria	Cardo Santo, Ajenjo,
	Antimicrobiana	Diente de león
	Citotóxica	
	Antiviral	
	Antifúngica	
	Anticancerígena	
	Alergénica	
Antibacteriana		
Saponinas	Espumante	Semilla de castaño de
	Emulsionante	indias, Regaliz, Centella
	Diurética	asiática, Ginseng, Rusco,
	Anticancerígena	Agave, Dioscorea,
	Antioxidante	Albahaca
	Depuración en sangre	
	Limpieza de la piel	
	Curación dolencias reumáticas	

Fuente: elaboración propia.

3. Terpenoides.

Están formados por la unión de unidades de isopreno, presentan modificaciones y se unen de diversas maneras, pero siempre basadas en la estructura del isopentano. Se pueden encontrar en especies como el alcanfor, mentol, citral, jengibre, clavo, esencia de eucalipto, entre otras; han sido usados por sus propiedades aromáticas y como remedios herbolarios, se conocen también por ser antibacterianos.

Los terpenoides se clasifican en Monoterpenos (2 unidades de isopreno), Sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), Diterpenos, Triterpenos, Carotenos y Politerpenos¹³. Algunos ejemplos se muestran en la **Tabla 3.9**.

Tabla 3.9. Terpenoides y usos tradicionales.

Tipo de compuesto	Uso tradicional	Fuente
Iridoides	Anti-inflamatoria	Raíz de valeriana,
	Antimicrobiana	Harpagofito, Hoja de
	Amebicida	olivo, Raíz genciana
Lactonas Sesquiterpénicas	Anti-inflamatoria	Cardo Santo, Ajenjo,
	Antimicrobiana	Diente de león
	Citotóxica	
	Antiviral	
	Antifúngica	
	Anticancerígena	
	Alergénica	
	Antibacteriana	
Saponinas	Espumante	Semilla de castaño de
	Emulsionante	indias, Regaliz, Centella
	Diurética	asiática, Ginseng, Rusco,
	Anticancerígena	Agave, Dioscorea,
	Antioxidante	Albahaca
	Depuración en sangre	
	Limpieza de la piel	
	Curación dolencias reumáticas	

Fuente: elaboración propia.

4. Alcaloides.

Son compuestos que contienen nitrógeno dentro de un sistema heterocíclico, son sensibles al calor y a la luz, poseen estabilidad en ácidos inorgánicos, son de naturaleza alcalina como su nombre lo indica; en la naturaleza se encuentran en forma de sales, aunque a veces también en su forma libre; el 20% de los alcaloides están presentes en plantas vasculares, aunque no se conoce con certeza el papel que juega en ellas. Poseen una actividad farmacológica significativa, el suministro debe hacerse con precaución, ya que pequeñas dosis pueden ser muy activas y peligrosas ¹⁴. Los alcaloides más importantes se muestran en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10. Alcaloides de origen vegetal más importantes.

Tipo de compuesto	Uso tradicional	Fuente
Cocaína	Anestésico local potente Simpaticomimético Excitante sobre el sistema nervioso central A altas dosis agitación y convulsiones A dosis extremas, muerte por parada respiratoria	Coca
Cafeína	Estimulante adictivo	Granos de semilla de café
Nicotina	Insecticida Estimulante	Tabaco
Anfetamina	Estimulante	cat, tschat o miraa
Atropina	Antídoto Dilatador Anticolinérgico	Belladona
Capsaicina	Irritante	Ají (pimientos picantes)
Efedrina	Estimulante Descongestionador	Efedra
Heroína	Analgésico Estimulante Eufóricos	Amapola
Morfina	Narcótico-Anestésico	Opio
Teobromina	Estimulante Broncodilatador	Cacao
Teofilina	Estimulante Broncodilatador	Té verde, Té negro
Quinina	Analgésico Antipirético Antipalúdico	Quina

Fuente: elaboración propia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bernal HY, García H, Quevedo GF. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. 1a Ed. Ediprint Ltda. Bogotá D.C. 47-68. 2011.
2. Isaza CA, Machado JE, Machado ME, Gaviria A, Castro A, Fuentes J. Fundamentos de Farmacología en Terapéutica. 7a Ed. Medica Celsus. Colombia. 450-460. 2020.
3. Roig JT. Plantas medicinales y aromáticas. Rev Cuba farm.1968; 2:89-95.
4. Rincón N. Contexto y perspectiva de la red de suministro: Plantas aromáticas en Colombia. Económicas CUC. 2012; 33:135-156.
5. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia. Decreto Número 1156 de 2018.
6. Leal JA, Abadía C, Yunda L, Evemeleth L, Rodríguez EG. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 8a Ed. UNAD. Bogotá D.C. 2017. 150-180.
7. Ludy C, Rodríguez MF, Hernández P. Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas. 2017; 16:529-546.
8. Consejo Nacional de Política Económica y Social. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. Documento Conpes 3680 de 2010, Lineamientos para la Consolidación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas. 2010; 6:23-31.
9. Ministerio de la Protección Social. República de Colombia. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. 2008; 149-170.

10. Alarcón JJ. Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Produmedios. Bogotá D.C. 2011. 4-38.
11. Fonnegra R, Jimenez SL. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2a Ed. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. 15-40. 2007.
12. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Acribia. Zaragoza. 3-20. 2001.
13. Pengelly A. The Constituents of Medicinal Plants: An Introduction to the Chemistry and Therapeutics of Herbal Medicines. 2a Ed. CABI Publishing. 85-96. 2004.
14. Van A. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción”. SciELO. 2003; 50-55.

Actividad Biológica de Plantas de la Familia Bignoniaceae

Iván Alberto Lopera-Castrillón¹, Luz Ángela Veloza², Juan Carlos Sepúlveda-Arias¹ ¹Grupo Infección e Inmunidad. Facultad de Ciencias de la Salud. ²Grupo Polifenoles, Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Introducción.

En la historia del descubrimiento y desarrollo de los fármacos y compuestos tipo droga, los productos naturales tanto de origen animal como vegetal se han usado tradicionalmente para el tratamiento de diferentes enfermedades mediante la preparación de infusiones o macerados. Producto de la investigación de dichas mezclas se han descubierto compuestos con actividad farmacológica de gran importancia, entre ellos se destacan la aspirina, corticoides como la cortisona y algunos antibióticos como la penicilina y la eritromicina. Posteriormente, modificaciones estructurales de los productos naturales han permitido el desarrollo de nuevos fármacos con efectos más potentes y reduciendo sus posibles efectos secundarios.

La familia Bignoniaceae está comprendida por aproximadamente 120 géneros con 800 especies de plantas distribuidas en las regiones tropicales y no tropicales de diferentes continentes como América, Asia y África (**Figura 3.25**), y han sido empleadas principalmente como especies ornamentales. En algunos países como El Salvador y Venezuela, los árboles *Tabebuia rosea* y *Tabebuia chrysantha*, son considerados el árbol nacional, respectivamente. La flor de *Tecoma stans* es considerada la flor nacional de Las Bahamas. La familia Bignoniaceae se caracteriza por tener una gran diversidad taxonómica al presentarse en forma de árboles, arbustos y plantas trepadoras ¹.

Figura 3.25. Distribución geográfica de la familia Bignoniaceae.



Tomada de: http://www.thecompositaeht.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/bignoniaceae.html

Múltiples estudios etnomédicos han permitido establecer diferentes actividades biológicas atribuidas a especies de la familia Bignoniaceae. *Oroxylum indicum*, una especie conocida como “flor de trompeta de la india” es usada para preparar una bebida ayurvédica denominada “Dashamoola” la cuál es usada por su actividad anti-inflamatoria, anti-helmíntica, anti-bronquitis, anti-reumática y anti-tuberculosa ², un estudio adicional reporta su uso para el tratamiento y manejo de la obesidad ³. *Tecoma stans*, especie conocida como “tronadora o sauco amarillo” es también usada ampliamente en Argentina y otros países de Suramérica como antidiabético ^{4,5}. En América del Sur, el uso de *Amphilophium crucigerum* es descrito en la medicina tradicional en Brasil como un tratamiento efectivo frente al dolor neuropático e inflamatorio ⁶. *Mansoa hirsuta* es una liana distribuida en el bosque Atlántico de Brasil para el tratamiento de afecciones inflamatorias como el dolor de garganta y también como un tratamiento alternativo para la diabetes ⁷. La especie *Pyrostegia venusta*, popularmente conocida en Brasil como “cipó-de-são-joão” o llama de la vid, es tomada como infusión o decocción para el tratamiento de diarrea, vitiligo, tos y enfermedades del sistema respiratorio asociadas a infecciones como bronquitis, gripe y resfriados ⁸. En Brasil, *Zeyheria montana*, es una planta empleada para el tratamiento de afecciones en la piel, úlceras, inflamación y diarrea, también para el tratamiento de infecciones bacterianas de transmisión sexual como la sífilis y la blenorragia ⁹.

En África, *Markhamia tomentosa*, es usada en la medicina tradicional de Camerún como analgésico y anti-inflamatorio ¹⁰, así como para tratar enfermedades de origen bacteriano y parasitario ¹¹. Las hojas y corteza interna de esta misma especie son usadas en la medicina tradicional de Nigeria para tratar varias enfermedades como artritis reumatoide, gota y dolor muscular ¹².

Dolichandra unguis-cati, conocida en la medicina tradicional de Brasil como “uña de gato” e igualmente encontrada en otras partes de Suramérica, India y Egipto es usada terapéuticamente para el tratamiento de artrosis, reumatismo, bronquitis, resfriado y dolor de cabeza ¹³.

Las especies del género *Tabebuia* están ampliamente distribuidas en las zonas tropicales de América Central y América del Sur y son empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades o infecciones. Los estudios etnomédicos reportan su uso como diurético, analgésico, afrodisiaco, antipirético, antifúngico, antitumoral, entre otros. En América del sur la especie *Tabebuia avellanedae* ha sido tradicionalmente usada para tratar enfermedades inflamatorias ¹⁴, *Tabebuia roseoalba* es usada para el tratamiento de procesos inflamatorios y para tratar el reumatismo ¹⁵. En la medicina tradicional de china, el extracto de *Incarvillea sinensis* ha sido usado por más de 1400 años para el tratamiento de reumatismo, hematomas, heridas y es efectivo para atenuar el dolor y la inflamación ¹⁶.

Actividades biológicas reportadas en especies de la familia Bignoniaceae

Actividad anti-inflamatoria

La inflamación es una respuesta protectora del sistema inmune que busca controlar y eliminar agentes potencialmente patógenos mediante diversos mecanismos, los cuales de manera

secuencial incluyen cambios en la permeabilidad vascular en el sitio afectado, infiltración de células sanguíneas en el tejido y finalmente la reparación tisular. Entre los diferentes mediadores moleculares de inflamación se debe mencionar la histamina, bradiquinina, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas, entre otros ¹⁷. Una gran variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* han sido diseñados para determinar el potencial anti-inflamatorio que tienen mezclas de productos naturales, compuestos aislados de estos, sus derivados o compuestos sintéticos, los modelos de actividad anti-inflamatoria *in vitro* consisten en el cultivo de células del sistema inmune aisladas de diferentes especies como humano, ratón o rata y/o cultivo de líneas celulares comerciales, las cuales son sometidas a un estímulo proinflamatorio para que estas secreten mediadores de la inflamación y posteriormente evaluar el efecto de los compuestos sometidos al ensayo sobre la producción de estos mediadores. En los modelos de actividad anti-inflamatoria *in vivo*, ratas, ratones u otros animales, son inyectados o se les suministra por vía oral sustancias que causan edema, granulomas, lesiones gástricas u otros con el fin de evaluar el efecto protector de los compuestos sometidos a evaluación ¹⁸.

Actividad antioxidante

El oxígeno y el nitrógeno presentes en nuestro cuerpo, participan en la mayoría de los procesos biológicos cumpliendo diferentes funciones, como productos de las diferentes rutas metabólicas y procesos de señalización o como mecanismos de protección y eliminación de agentes extraños mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, ROS y RNS, respectivamente. Estas sustancias pueden generar daño a tejidos cuando sus niveles no son controlados correctamente. Las sustancias oxidantes o radicales libres usualmente causan daño a ADN, proteínas y lípidos, incrementando el proceso de envejecimiento celular, así como el desarrollo de las enfermedades asociadas a este proceso ¹⁹. Diferentes métodos

han sido estandarizados para evaluar la actividad antioxidante de compuestos naturales en modelos *in vitro* e *in vivo*, los cuales difieren en términos de los mecanismos de reacción, especies oxidantes, condiciones de reacción y la forma en la que se pueden expresar sus resultados ^{19,20}; los métodos para determinar la actividad antioxidante *in vitro* más comúnmente utilizados son el ensayo TEAC/ABTS.+ - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity/2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2'-diphenylpicryl hydrazyl free radical) y el ensayo ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity* ²¹. Algunos de los modelos *in vivo* empleados son la estimación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD), actividad de glutatión reducido (GSH), estimación de la peroxidación lipídica con uso de Malondialdehído (MDA) ²¹.

Actividad antimicrobiana

En la actualidad, la frecuente adaptación de microorganismos a ambientes hostiles y su rápida capacidad de desarrollar resistencia a agentes antimicrobianos ha encaminado a los múltiples centros de investigación a nivel mundial a fijar su atención en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que puedan ser una alternativa para el tratamiento de diferentes infecciones asociadas a microorganismos multidrogoresistentes que se han convertido en un tema de interés global para la salud pública. Para evaluar la actividad antimicrobiana a diferentes compuestos de origen natural o sintético se han diseñado, evaluado y validado múltiples métodos en modelos *in vitro*, entre los cuales, los más ampliamente usados son métodos simples como el método de difusión en agar, difusión en pozo o el ensayo bioluminiscente de ATP, entre otros. Adicionalmente, se han diseñado métodos que requieren un equipamiento de mayor complejidad como la citometría de flujo ²².

Reportes de extractos vegetales crudos con actividad biológica

Kigelia pinnata es un árbol tropical en peligro de extinción usado ampliamente en la medicina tradicional africana especialmente por sus propiedades anticancerígenas, del cual diferentes reportes evidencian actividades como antimalárica, anti-inflamatoria, antidiarreica y para tratar trastornos ginecológicos. El extracto metanólico de las flores de *K. pinnata* mostró actividad anti-inflamatoria y analgésica en un modelo *in vivo* en ratas Wistar a una dosis de 100, 200 y 500 mg/Kg de peso sin evidenciar toxicidad ²³. En otro estudio en el que se evaluó la actividad antioxidante y anticancerígena del extracto de las hojas se estableció que su actividad captadora de radicales evaluada por los métodos de DPPH, FRAP y ABTS es mayor en su extracto metanólico por su alto contenido en compuestos fenólicos. Su efecto antitumoral fue evaluado como actividad antiproliferativa frente a células tumorales de músculo estriado (Células RD) en el cual dicho extracto rico en ácidos grasos libres como el 3-hidro-4,8-fiteno y el tranfitol presentó una dosis citotóxica efectiva de 11.25 M, empleando el método del MTT. Otros compuestos con actividad antitumoral han sido aislados de esta misma especie como son el verminósido y el verbascósido ²⁴. Un estudio del extracto en acetato de etilo de las flores de *Campsis grandiflora* evidenció la actividad antidepresiva en un modelo *in vivo* en ratones Kunming machos, así como la actividad antioxidante *in vivo* por los métodos de SOD, MDA y GSH ²⁵.

La especie *Newbouldia laevis*, usada en la medicina tradicional en África en países como Senegal y Nigeria para el tratamiento de dolor en los dientes, dolor de estómago, diarrea, reumatismo, así como para tratar epilepsia y convulsiones en niños, mostró actividad antioxidante *in vitro* mediante los métodos de DPPH y FRAP. Se evidenció actividad antiradicalaria frente al radical hidroxilo, óxido nítrico, anión superóxido, peroxinitrito, oxígeno singlete, ácido hipocloroso y además la inhibición de TBARS (especies reactivas de ácido tiobarbitúrico) de una manera dosis dependiente ²⁶.

La evaluación de las actividades antiedematogénica, neuroprotectora y antimicrobiana de extractos crudos en *n*-hexano, cloroformo y etanol de las hojas y raíces de *Jacaranda oxyphylla*, permitió establecer que el extracto etanólico de las hojas mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, aunque fueron principalmente activos frente a *Escherichia coli*. Los extractos en cloroformo y etanol obtenidos a partir de las hojas fueron efectivos al inhibir los diferentes estados de inflamación evaluados en modelos *in vivo* ²⁷.

La actividad anti-inflamatoria del extracto etanólico de las hojas de *Zeyheria montana* fue evaluada en un modelo de inflamación *in vivo* en el que se indujo edema con inyección intraplantar de carragenina en ratas, los resultados son concluyentes al establecer que en todas las concentraciones evaluadas 75, 150 y 300 mg/Kg, se educe la inflamación significativamente ²⁸. El extracto etanólico de las flores de *Pyrostegia venusta*, mostró un efecto positivo al reducir la producción de algunos mediadores de inflamación, así como de células mononucleares y neutrófilos en plasma de ratones alimentados con una alta dieta de glucosa ²⁹.

Un estudio del extracto metanólico de las hojas de *Markhamia platycalyx*, permitió hacer la identificación de diez polifenoles, entre los cuales se destacan el verbascosido, isoverbascosido, luteolina y apigenina, por estar ampliamente distribuidos en la familia Bignoniaceae, se evaluó la actividad anti-inflamatoria *in vivo* en un modelo de edema inducido por carragenina, a partir del cual se estableció que a dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg se inhibía significativamente el edema sin ser tóxico para los animales del estudio. El extracto metanólico también mostró actividad antiradicalaria significativa, al comparar los resultados obtenidos por el método de DPPH frente al ácido ascórbico usado como control, se estableció que una concentración de 60 mg/mL tiene una actividad captadora de radicales mayor que el ácido ascórbico ³⁰.

El extracto de las raíces de *Stereospermum colais* es ampliamente usada en una mezcla con otras nueve plantas medicinales. Esta mezcla sinérgica es empleada como anti-inflamatoria, afrodisiaca, cardiotónica, diurética, astringente, antibacterial y antidiabética, entre otras. *S. colai*, es una especie empleada como un anti-inflamatorio en la medicina tradicional de la India. Un estudio estableció que el extracto en acetona de sus raíces mostró actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa (XO), así como actividad antioxidantes en diferentes modelos *in vitro*, hecho que presenta a *S. colais* como una alternativa para el tratamiento de la gota y otras enfermedades asociadas a alteraciones en la XO ³¹, *Stereospermum kunthianum* es una especie de este mismo género ampliamente distribuida en Nigeria y Burkina Faso, y usada tradicionalmente en África para el tratamiento de fiebre, diabetes, úlceras, enfermedades venéreas, artritis reumatoide y disentería. El extracto en acetona de las hojas y la corteza mostró actividad anti-inflamatoria al inhibir la actividad catalítica de la enzima XO, así como actividad antioxidante empleando tres diferentes metodologías *in vitro*, DPPH, FRAP y ABTS ³². Otra especie del mismo género con actividad anti-inflamatoria es *Stereospermum suaveolens*, la cual es usada en la medicina tradicional de la India para el tratamiento de la inflamación, dolor, fiebre, asma y vómito. Se evaluó la actividad anti-inflamatoria del extracto etanólico de la corteza y se demostró que dicha infusión reducía los niveles de edema en tres diferentes modelos de inflamación *in vivo* sin presentar toxicidad para los animales del estudio ³³.

Diferentes extractos de la especie *Arrabidaea* chica, empleada en la medicina tradicional de Brasil para el tratamiento de inflamación, enfermedades de la piel y leucemia, han sido estudiados y se han reportado numerosas actividades biológicas a nivel *in vitro* e *in vivo*, tales como antioxidante, fotoprotectora, antibacterial, antileishmanicida y antifúngica. El extracto acuoso y etanólico de las hojas evidenció actividad anti-inflamatoria y antiangiogénica en un modelo *in vivo*, así como actividad

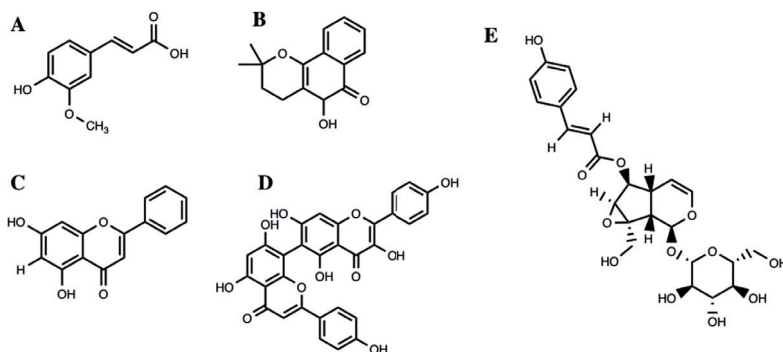
antitumoral en un modelo *in vitro* usando células de leucemia linfocítica aguda y células de cáncer de mama ³⁴. En un estudio adicional del extracto de las hojas y de una de sus fracciones, se evaluó el posible efecto mutagénico y genotóxico son el fin de establecer si extractos de esta especie eran seguros para el uso en humanos. Aunque los resultados fueron concluyentes evidenciando que su uso era seguro, los autores recomiendan evaluar otro tipo de daños y la aneuploidía ³⁵. La especie *Arrabidaea brachypoda* ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional de Brasil para el tratamiento del dolor. Un estudio realizado con el fin de demostrar estas actividades atribuidas a la especie, estableció que el extracto etanólico de sus raíces tiene la capacidad de reducir el edema inducido por carragenina en ratas, así como de inhibir la formación de tejido granulomatoso en un modelo *in vivo* ³⁶.

El extracto etanólico de las hojas de *Handroanthus impetiginosus*, también llamada *Tabebuia impetiginosa* o *Tabebuia avellanedae*, mostró una alta actividad antiparasitaria al reducir la viabilidad, potencial de infección y tasa de multiplicación del parásito *Leishmania amazonensis*, agente causante de la Leishmaniasis y del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas ³⁷. Un estudio realizado sobre el extracto acuoso de la corteza interna brindó el soporte científico a los reportes etnofarmacológicos en los que la infusión de la corteza interna de esta especie se empleaba como analgésico y anti-inflamatorio, al reducir los niveles de inflamación en modelos *in vivo* de edema inducido por carragenina, así como su efecto antinociceptivo inducido por ácido acético ³⁸.

Los extractos de la especie *Tabebuia aurea* han sido usados en la medicina tradicional como anti-inflamatorio y en el tratamiento de las mordeduras de serpiente. Un estudio realizado sobre el extracto hidroetanólico de la corteza interna de esta especie demostró que su efecto antiinflamatorio se debe posiblemente a que reduce los niveles de edema inducidos por carragenina, así como en la disminución de la migración de polimorfonucleares a

cavidades peritoneales en modelos *in vivo*³⁹. En un estudio de ocho plantas conocidas como “Brazilian cerrado” realizado en Brasil, se identificó que los extractos en *n*-hexano, diclorometano y etanol de la corteza interna de *Tabebuia caraiba*, tienen una alta actividad antifúngica frente a hongos resistentes a los medicamentos comercialmente disponibles. Los microorganismos evaluados en este estudio fueron *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, el método empleado fue el método de difusión en agar y el control empleado fue el itraconazol⁴⁰.

Figura 3.26. Estructuras de compuestos con actividad biológica aislados de especies de la familia Bignoniaceae. A. Ácido Ferúlico. B. Beta-lapachona. C. Chrysin. D. Kaempferol (6→8'') apigenin. E. Especiósido.



Fuente: elaboración propia.

Compuestos aislados con actividad biológica

Un estudio cromatográfico del extracto etanólico de *Kigelia africana* permitió la identificación de varios compuestos, entre ellos, glucósido de ácido cafeico, p-cumaroil glucosa, ácido cafeico, ácido cumárico, **ácido ferúlico (Figura 3.26)**, verbascosido, **especiósido (Figura 3.26)**, minecósido y verminosido⁴¹, este último, aislado a partir de un extracto en cloroformo de los frutos de *K. africana* presentó actividad anti-inflamatoria en un modelo *in vitro* al reducir la producción de óxido nítrico así como la expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible

(INOs) ⁴². Otro estudio llevado a cabo en Camerún permitió el aislamiento de cuatro compuestos a partir de la corteza interna, de los cuales tres de ellos presentaron actividad antimalárica frente a la cepa multidrogoresistente W2mef de *plasmodium falciparum*. Los compuestos más activos fueron el especiósido y la atranorina ⁴³.

A partir de la especie *Incarvillea compacta* se aislaron cuatro compuestos, tres de ellos conocidos y previamente reportados como campneósido I, Ilicifoliósido A y campneósido II, y un nuevo feniletanoilglucósido llamado 3'''-O-Metilcampneósido I ⁴⁴. El compuesto plantarenalósido, aislado de una planta del mismo género de nombre *incarvillea arguta*, mostró actividad neurotrópica en un modelo *in vitro* en células tumorales de médula suprarrenal de rata ⁴⁵. En *Incarvillea sinensis* se ha reportado la presencia de un alcaloide monoterpénico de nombre incarvillateina, el cual en un modelo *in vivo* atenuó el dolor neuropático inducido por paclitaxel en ratones ¹⁶.

La evaluación mediante HPLC preparativa del extracto acuoso de *Tabebuia avellanedae* permitió el aislamiento de seis nuevos ciclopentenil ester denominamos Avellaneina A-F ⁴⁶ y dos previamente aislados (Avellaneina G y H) ⁴⁷. Otros estudios cromatográficos sobre la misma especie han llevado al aislamiento e identificación de ocho nuevos ester-iridoides llamados Avelladoides A-H, de los cuales tres de ellos (Avelladoide A, B y C) presentan actividad anti-inflamatoria por su efecto inhibitorio en la producción de PGE₂ y NO ⁴⁸. Dos di-aldehídos aislados de esta misma especie de nombre 2-formil-5-(4'-metoxibenzoiloxi)-3-metil-2-ciclopenteno-1-acetaldehído y 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoiloxi)-3-metil-2-ciclopenteno-1-acetaldehído presentaron actividad anti-inflamatoria en un modelo *in vitro*, empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) estimuladas con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ⁴⁷. Dos naftoquinonas aisladas de la corteza interna presentaron actividad antibacteriana selectiva frente a enterobacterias como *Clostridium paraputrificum* y *Clostridium perfringens* sin afectar

el crecimiento de la microbiota normal del intestino como las bacterias *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en un modelo *in vitro* de difusión en disco ⁴⁹. (-)-5-hidroxi-2-(10-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona y (-)-8-hidroxi-2-(10-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, previamente identificadas en la corteza interna de esta especie, fueron sintetizadas estereoselectivamente y se determinó en modelos *in vitro* su actividad antibacterial y antiviral y se complementó el estudio estableciendo que estos dos compuestos tienen un potente efecto antiproliferativo tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* ⁵⁰. Las cuatro naftoquinonas derivadas de lapachol y lapachona mostraron actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina, entre las cuales se emplearon dos cepas comerciales de *Staphylococcus aureus* y dos aislados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* resistentes a meticilina y vancomicina ⁵¹. Otro compuesto igualmente aislado y reportado en múltiples estudios en esta especie es la **beta-lapachona** (Figura 3.26), la cual presentó actividad antitumoral en un ensayo *in vitro* en células de carcinoma pulmonar A549 empleando citometría de flujo ⁵². Un estudio realizado a lapachol, alfa-lapachol y beta-lapachol demostró que estos compuestos, ampliamente distribuidos en especies del género *Tabebuia*, presentan actividad antibacterial evaluada en un modelo *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ⁵³.

Además del gran número de estudios realizados a extractos y compuestos aislados de la especie *Tabebuia avellanedae* se han estudiado otras especies de este género, como es el caso de *Tabebuia roseoalba*, a partir de la cual se aislaron los compuestos - α - amyirin, - β - amyirin, sitosterol y estigmasterol, a partir del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas, los cuales poseen actividad antioxidante, anti-inflamatoria y efecto anti-hiperuricemico en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* ¹⁵.

Un estudio en el que se evaluó el efecto gastroprotector en modelos *in vitro* usando células del epitelio gástrico, se usaron compuestos derivados del lapachol y del ácido ciperenoico aislados de especies del género *Tabebuia* y de la especie *Jatropha isabelii*, respectivamente, se estableció que los híbridos entre ambos compuestos y además sus derivados presentan una mejor actividad gastroprotectora que el lapachol y el ácido ciperenoico de manera independiente ⁵⁴.

Un estudio de los constituyentes químicos de *Oroxylum indicum* permitió el aislamiento e identificación de 20 compuestos, entre los cuales se destacan 5,7-dihydroxiflavona **chrisina (Figura 3.26)**, apigenina, quercetina y sitosterol por ser ampliamente distribuidos en la familia Bignoniaceae ⁵⁵. En otro estudio realizado en China sobre la misma especie, se determinó la actividad antioxidante por los métodos *in vitro* de DPPH y ORAC de 21 flavonoides, de los cuáles se destacó la actividad de chrisina, chrisina-7-O-gentiobiosido, baicaleina, baicalein-7-O-diglicosido, baicalein-7-O-glucosido y baicalina, todos ellos reportados previamente para esta especie ⁵⁶. La actividad antioxidante de baicaleina y de baicalein-7-O-glucosido fue de igual forma demostrada por el método HPLC-DPPH ⁵⁷.

Otra especie con actividad antibacterial sobre bacterias aisladas de procedimientos clínicos es *Oroxylum indicum*, quien presentó actividad bactericida frente a *Streptococcus suis* y *Staphylococcus intermedius* ⁵⁸. *Pyrostegia venusta* es una especie usada tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel como la erisipela, causada principalmente por la bacteria *Streptococcus pyogenes*, y de diferentes infecciones pulmonares y vaginales. Dos compuestos fenólicos aislados de esta especie, de nombre verbascosido e isoverbascosido, presentaron actividad antifúngica frente a diferentes especies de *Candida*, como *C. albicans* y *C. krusei*, adicionalmente, el extracto etanólico crudo de las flores presentó actividad antioxidante *in vitro* por el método del DPPH ⁵⁹.

La caracterización fitoquímica de *Dolichandra unguis-cati* empleando UHPLC/MS permitió la identificación de ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutin, ácido rosmarínico, quercitrin, ácido trans-cinámico, quercetina, luteolina, apigenina¹³.

La especie *Tecoma stans*, que también es conocida desde México a Venezuela con los nombres de *Tecoma velutina* y *Tecoma mollis*, es usada principalmente con fines ornamentales y aunque existen pocos reportes sobre sus diferentes usos en la medicina tradicional uno de ellos menciona el uso de sus hojas como hipoglicemiante por su alto contenido en alcaloides. Un estudio sobre esta planta permitió la identificación de diferentes compuestos de núcleo flavonoide como la apigenina, luteolina, luteolina-7-O-glucósido y chrysoeriol. En un estudio adicional llevado a cabo en Egipto se identificaron diferentes fenilpropanoides entre los cuales se destaca el Luteosido B, el cual presentó actividad antibacterial, antifúngica y antileishmanicida al inhibir el crecimiento de *Mycobacterium intracellulare*, *Aspergillus fumigatus* y *Leishmania donovani* respectivamente.^{4,5}

El fruto de la especie *Crescentia alata* conocida comúnmente como “Ayala”, evidenció actividad anti-bacterial frente a la bacteria *Escherichia coli* MDR aislada de niños menores de 5 años en México⁶⁰. El extracto metanólico y los flavonoides aislados de esta especie también han mostrado actividad anti-inflamatoria en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, al reducir los niveles de producción de óxido nítrico en macrófagos estimulados con lipopolisacárido y al reducir los niveles de edema inducido por carragenina en ratas⁶¹.

Un estudio permitió determinar la actividad acaricida de la especie *Crescentia cujete* frente a una garrapata del ganado australiano denominada *Rhipicephalus microplus*, con una letalidad del 100 %. Dicha actividad se atribuye al ácido cinámico y al ácido benzoico presentes en el extracto etanólico⁶². La

actividad anti-inflamatoria y antioxidante de sus hojas y corteza interna se ha evaluado en modelos *in vitro*, al igual que su efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ⁶³.

Dos compuestos de núcleo molecular cicloartano (triterpenoides), llamados ácido boniánico A y B, fueron aislados de *Radermachera boniana*, presentando una fuerte actividad antibacterial frente al agente causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* ⁶⁴.

La especie *Newbouldia laevis*, es un árbol nativo del área tropical de África, es usado en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades como disentería, malaria, enfermedades de transmisión sexual. A partir de esta especie se identificó un pigmento denominado newbouldiaquinona A, caracterizado por tener acoplados, en el mismo compuesto, un núcleo de naftoquinona y antraquinona. A este compuesto se le evaluó la actividad antimicrobiana frente a 21 patógenos, entre bacterias Gram (-), Gram (+) y levaduras, de las cuales los autores destacan que el compuesto newbouldiaquinona A, presenta actividad antimicrobiana 13 a 24 veces mayor en comparación con los controles usados como nistatina y gentamicina, de igual forma se determinó que el compuesto tiene una actividad antimalárica moderada frente a *Plasmodium falciparum* ⁶⁵.

Un estudio de la especie *Zeyheria montana*, desarrollado en Brasil, permitió el aislamiento de dos flavonoides 3'-hydroxy-5,7,4'-trimethoxyflavona y 6-hydroxy-5,7-dimethoxyflavona, los cuales presentaron actividad anti-inflamatoria y antioxidante en modelos *in vivo* ⁹.

Un **biflavonoide** (Figura 3.26) presente en la especie *Jacaranda acutifolia* de nombre Kaempferol (6→8") apigenin, fue aislado de la fracción soluble en metanol del extracto acuoso de hojas, luego del aislamiento se pudo establecer que esta especie presenta actividad antitumoral frente a la línea celular MCF-7, que

corresponde a una línea celular de cáncer de mama, además, en un estudio de biología computacional se estableció que el efecto de este biflavonoide se relaciona con la inhibición de la actividad de la ciclina dependiente de kinasa 2 (CDK2) ⁶⁶.

Dos flavonoides diméricos de nombre brachydina B y brachyidin C, aislados del extracto etanólico de las raíces de *Arrabidaea brachypoda*, evidenciaron actividad antitripanocida en un modelo *in vitro* usando promastigotes del parásito y macrófagos peritoneales. El flavonoide brachyidin B mostró los mejores resultados y fue evaluado posteriormente en un modelo *in vivo* en el que redujo de manera significativa el recuento de parásitos en sangre de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, demostrando el potencial de esta especie como una posible fuente de compuestos para el desarrollo de futuros medicamentos antiparasitarios ⁶⁷. Dos polifenoles, Verbascosido y cafeoilcalerianina, aislados del extracto etanólico de las hojas de *Arrabidaea pulchra* mostraron actividad antiviral frente al virus del dengue en un modelo *in vitro* demostrando de esta forma el uso tradicional en Suramérica de las especies del género *Arrabidaea* ⁶⁸.

Un estudio del extracto en acetato de etilo de la especie *Markhamia tomentosa* evidenció la actividad antimalárica reportada por estudios etnofarmacológicos para esta especie. A partir de este extracto se aislaron ocho compuestos, de los cuales el 2-acetilnaptó [2,3-b] furan-4,9-diona y el 2-acetil-6-metoxinafto[2,3-b]furan-4,9-diona mostraron una alta actividad antimalárica frente a dos cepas de *Plasmodium falciparum*; adicionalmente se evaluó la actividad Leishmanicida frente al parásito *Leishmania donovani* y antitripanocida frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Desafortunadamente, estos compuestos con alta actividad antiparasitaria fueron citotóxicos a nivel *in vitro* frente a la línea celular de mioblastos de músculo esquelético L6 ¹¹. En otro estudio se evaluó la actividad anti-inflamatoria del extracto etanólico de las hojas, usando un modelo *in vivo*, en el que se inducen edemas con diferentes sustancias

como carragenina, xileno, histamina y, de este estudio se concluyó que la actividad anti-edematosa y anti-reumática reportada en estudios de medicina tradicional en Nigeria se debe posiblemente a su efecto en la reducción de edemas mediados por histamina ⁶⁹. La **Tabla 3.11** presenta los extractos y/o compuestos aislados de plantas de la familia Bignoniaceae con actividad biológica.

Tabla 3.11. Extractos y/o compuestos de la familia Bignoniaceae con actividad biológica.

Especie	Extracto o compuesto	Actividad	Referencia
<i>Tabebuia avellanedae</i>	Corteza interna	Anti-inflamatoria,	(38, 46, 48, 50, 51)
	Avelladoide A, B y C	antiviral,	
	Avellaneine B-D, E, G-H,	antibacterial,	
	(-)-5-hydroxy-2-(10-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione, (-)-8-hydroxy-2-(10-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione	Anticancerígena.	
<i>Tabebuia roseoalba</i>	Hojas, α -amyrin, β -amyrin, estigmasterol, sitosterol	Antioxidante, anti-inflamatoria, anti-hiperuricémico	(15)
<i>Tabebuia aurea</i>	Corteza	Anti-inflamatoria	(39)
<i>Crescentia alata</i>	Fruto	Antibacterial, anti-inflamatoria	(60, 61)
<i>Kigelia africana</i>	Especiosido, atranorina, verminosido	Antiplasmodium, anti-inflamatoria	(42, 43)
<i>Kigelia pinnata</i>	Flores	Anti-inflamatoria, analgésica, antioxidante, antitumoral	(23, 24)
<i>Crescentia cujete</i>	Fruto/hojas/corteza interna/ácido cinámico/ácido benzoico	acaricida, anti-inflamatoria, antioxidante	(62, 63)
<i>Oroxylum indicum</i>	Corteza/Chrysin/trimetoxiflavona glucopiranosido, baicaleina, baicalina	Anti-adipogénica, antibacterial, antioxidante	(3, 56, 70)
<i>Markhamia tomentosa</i>	Hojas/Corteza interna	Anti-amnésica, antioxidante, antimalárica, anti-inflamatoria	(10, 12, 69)
<i>Markhamia platyclayx</i>	Hojas	Anti-inflamatoria, antioxidante	(30)
<i>Campsis grandiflora</i>	Flores	Antidepresiva y antioxidante	(25)

<i>Amphilophium crucigerum</i>	Semillas	Analgésica	(6)
<i>Arrabidaea brachypoda</i>	Raíz, Brachyidin B, Brachyidin C	Gastroprotectora, leishmanicida, anti-inflamatoria	(36, 67, 71)
<i>Arrabidaea chica</i>	Hojas	Antiinflamatoria, antitumoral, anti-angiogénica	(34)
<i>Arrabidaea pulchra</i>	Hojas, verbascoside, caffeoylcallerianin	Antiviral	(68)
<i>Jacaranda oxyphylla</i>	Hojas/ raíces	Anti-inflamatoria, Neuroprotectora, antimicrobiana	(27)
<i>Jacaranda acutifolia</i>	Kaempferol (6→8") apigenin	Antitumoral	(66)
<i>Dolichandra unguis-cati</i>	Hojas	Hipocolesterolémica	(13)
<i>Incarvillea compacta</i>	3''-O-Metilcampneosido I	Hepatoprotectora, antioxidante	(44)
<i>Incarvillea arguta</i>	Plantarenalósido	Neurotrófica	(45)
<i>Stereospermum colais</i>	Raíces	Anti-inflamatoria, antioxidante	(31)
<i>Stereospermum Kunthianum</i>	Hojas, Corteza	Anti-inflamatoria, antioxidante	(32)
<i>Oroxylum indicum</i>	Frutos, semillas	Antibacterial	(58)
<i>Zeyheria montana</i>	Frutos	Anti-inflamatoria	(28)
<i>Tecoma etans</i>	Hojas/Chrysoeriol	Inhibidora de lipasa	(4)
<i>Mansoa hirsuta</i>	Mansoin A y B	Anti-inflamatoria	(7)
<i>Newbouldia laevis</i>	Hojas/Newbouldiaquinone A	Antimicrobiana, antimalárica, antioxidante, antiradicalaria	(26, 65)
<i>Pyrostegia venusta</i>	Flores, verbascosido, isoverbascosido	Antifúngica, antioxidante	(59)

Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

En conclusión, la especies de la familia Bignoniaceae ha sido ampliamente estudiadas en búsqueda de nuevos compuestos de origen natural que puedan presentar actividad biológica

promisoria, haciendo uso de una gran diversidad de técnicas espectrofotométricas y de biología molecular que han permitido establecer la identidad de sus componentes mayoritarios así como la evaluación de actividades biológicas como anti-inflamatoria, antibacteriana, anti-cancerígena, entre otras ⁷² y además establecer sus mecanismos de acción a nivel celular mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, llevando a proponer a la familia Bignoniaceae como una fuente potencial de metabolitos secundarios como posibles compuestos tipo droga para el tratamiento de gran diversidad de enfermedades crónicas o multifactoriales. En la Universidad Tecnológica de Pereira, se han evaluado extractos obtenidos a partir de las hojas y corteza interna de dos especies endémicas de la región cafetera, como son *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia rosea*. Los estudios han permitido determinar el perfil fitoquímico de los extractos obtenidos y evaluar la actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anti-proliferativa de los mismos. El extracto en acetato de etilo obtenido a partir de *T. rosea* mostró el mejor efecto antioxidante mediante las técnicas DPPH y ORAC, lo cual se relaciona con un alto contenido de fenoles en el extracto ⁷³, ⁷⁴. Adicionalmente, el extracto posee la habilidad de activar y traslocar el factor de transcripción Nrf2, induciendo la expresión de genes de respuesta antioxidante como *NQO1* ⁷⁴. Se ha evidenciado que el extracto de la corteza interna obtenida tanto de *T. chrysantha* como *T. rosea* poseen actividad anti-inflamatoria promisoria, mientras que el extracto obtenido a partir de *T. rosea* posee una buena actividad anti-proliferativa ⁷³, principalmente contra células HepG2 (hepatocarcinoma).

El extracto en n-butanol obtenido a partir de la corteza interna de *T. rosea* y el especióside aislado a partir de dicho extracto, inducen un efecto protector frente al estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno ⁷⁵.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gentry AH. A Synopsis of Bignoniaceae Ethnobotany and Economic Botany. *Ann Mo Bot Gard.* 1992; 79:53-64.
2. Deori K, Yadav AK. Anthelmintic effects of *Oroxylum indicum* stem bark extract on juvenile and adult stages of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), an *in vitro* and *in vivo* study. *Parasitol Res.* 2016; 115(3):1275-85.
3. Mangal P, Khare P, Jagtap S, Bishnoi M, Kondepudi KK, Bhutani KK. Screening of six Ayurvedic medicinal plants for anti-obesity potential: An investigation on bioactive constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz bark. *J Ethnopharmacol.* 2017; 197:138-46.
4. Ramirez G, Zamilpa A, Zavala M, Perez J, Morales D, Tortoriello J. Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 2016; 185:1-8.
5. Abdel-Mageed WM, Backheet EY, Khalifa AA, Ibraheim ZZ, Ross SA. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia.* 2012; 83(3):500-7.
6. De Pra SD, Ferro PR, Milioli AM, Rigo FK, Chipindo OJ, Camponogara C, et al. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. *J Ethnopharmacol.* 2017; 195:283-97.
7. Campana PR, Coleman CM, Teixeira MM, Ferreira D, Braga FC. TNF-alpha inhibition elicited by mansoins A and B, heterotrimeric flavonoids isolated from *Mansoa hirsuta*. *J Nat Prod.* 2014; 77(4):824-30.

8. Veloso CC, Bitencourt AD, Cabral LD, Franqui LS, Dias DF, dos Santos MH, et al. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. *J Ethnopharmacol.* 2010; 132(1):355-8.
9. Seito LN, Sforcin JM, Bastos JK, Di Stasi LC. *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) as source of antioxidant and immunomodulatory compounds with beneficial effects on intestinal inflammation. *J Pharm Pharmacol.* 2015; 67(4):597-604.
10. Ionita R, Postu PA, Beppe GJ, Mihasan M, Petre BA, Hancianu M, et al. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of the aqueous extract from *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum. stem bark in a rat model of scopolamine. *Behav Brain Funct.* 2017; 13(1):5.
11. Tantangmo F, Lenta BN, Boyom FF, Ngouela S, Kaiser M, Tsamo E, et al. Antiprotozoal activities of some constituents of *Markhamia tomentosa* (Bignoniaceae). *Ann Trop Med Parasitol.* 2010; 104(5):391-8.
12. Bankole AE, Adekunle AA, Sowemimo AA, Umebese CE, Abiodun O, Gbotosho GO. Phytochemical screening and *in vivo* antimalarial activity of extracts from three medicinal plants used in malaria treatment in Nigeria. *Parasitol Res.* 2016; 115(1):299-305.
13. Calil Brondani J, Reginato FZ, da Silva Brum E, de Souza Vencato M, Lima Lhamas C, Viana C, et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017; 202:147-53.
14. Suo MR, Yan SY. Iridoid Glycosides from *Tabebuia avellanedae*. *Chem Biodivers.* 2016; 13(12):1611-6.

15. Ferraz-Filha ZS, Michel Araujo MC, Ferrari FC, Dutra IP, Saude-Guimaraes DA. *Tabebuia roseoalba*: *In Vivo* Hypouricemic and Anti-inflammatory Effects of Its Ethanolic Extract and Constituents. *Planta Medica*. 2016; 82(16):1395-402.
16. Wang ML, Yu G, Yi SP, Zhang FY, Wang ZT, Huang B, et al. Antinociceptive effects of incarvillateine, a monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*, and possible involvement of the adenosine system. *Sci Rep*. 2015; 5:16107.
17. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203):428-35.
18. Nile SH, Park SW. Optimized methods for *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis. *Mini Rev Med Chem*. 2013; 13(1):95-100.
19. Kumar S, Sharma S, Vasudeva N. Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chin J Integr Med*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>.
20. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal Methods*. 2009; 2(1):41-60.
21. Schaich KM, Tian X, Xie J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *J Funct Foods*. 2015; 18:782-96.
22. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; 6(2):71-9.
23. William Carey M, Rao NV, Kumar BR, Mohan GK. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. *J Ethnopharmacol*. 2010; 130(1):179-82.

24. Atolani O, Olatunji GA, Fabiyi OA, Adeniji AJ, Ogbole OO. Phytochemicals from *Kigelia pinnata* leaves show antioxidant and anticancer potential on human cancer cell line. *J Med Food*. 2013; 16(10):878-85.
25. Yu HC, Wu J, Zhang HX, Zhang HS, Qiao TT, Zhang JX, et al. Antidepressant-like and anti-oxidative efficacy of *Campsis grandiflora* flower. *J Pharm Pharmacol*. 2015; 67(12):1705-15.
26. Habu JB, Ibeh BO. In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of active metabolite constituents of *Newbouldia laevis* ethanolic leaf extract. *Biol Res*. 2015; 48:16.
27. Pereira VV, Silva RR, Dos Santos MH, Dias DF, Moreira ME, Takahashi JA. Antioedematogenic activity, acetylcholinesterase inhibition and antimicrobial properties of *Jacaranda oxyphylla*. *Nat Prod Res*. 2016; 30(17):1974-9.
28. Guenka LC, Gomes RC, Melo VL, Kitanishi CR, Pereira PS, Franca SC, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) ethanol extract. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(8):768-72.
29. Veloso Cde C, de Oliveira MC, Oliveira Cda C, Rodrigues VG, Giusti-Paiva A, Teixeira MM, et al. Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. *J Ethnopharmacol*. 2014; 151(1):722-8.
30. El Dib RA, Gaara AH, El-Shenawy SM, Micky JA, Mohammed AA, Marzouk MS. Leaf extract of *Markhamia platycalyx*: polyphenolic profile, acute toxicity, anti-inflammatory, hepatoprotective and *in vitro* antioxidant activities. *Drug Res*. 2014; 64(12):680-9.

31. Rani MP, Padmakumari KP. *In vitro* studies to assess the antidiabetic, antiperoxidative, and radical scavenging potential of *Stereospermum colais*. Pharm Biol. 2012; 50(10):1254-60.
32. Compaore M, Lamien-Meda A, Mogosan C, Lamien CE, Kiendrebeogo M, Vostinaru O, et al. Antioxidant, diuretic activities and polyphenol content of *Stereospermum kunthianum* Cham. (Bignoniaceae). Nat Prod Res. 2011; 25(19):1777-88.
33. Balasubramanian T, Chatterjee TK, Sarkar M, Meena SL. Anti-inflammatory effect of *Stereospermum suaveolens* ethanol extract in rats. Pharm Biol. 2010; 48(3):318-23.
34. Michel AF, Melo MM, Campos PP, Oliveira MS, Oliveira FA, Cassali GD, et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. J Ethnopharmacol. 2015; 165:29-38.
35. Gemelli TF, Prado Lda S, Santos FS, de Souza AP, Guecheva TN, Henriques JA, et al. Evaluation of Safety of *Arrabidaea chica Verlot* (Bignoniaceae), a Plant with Healing Properties. J Toxicol Environ Health A. 2015; 78(18):1170-80.
36. da Rocha CQ, Vilela FC, Cavalcante GP, Santa-Cecilia FV, Santos-e-Silva L, dos Santos MH, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. J Ethnopharmacol. 2011; 133(2):396-401.
37. Teixeira TL, Teixeira SC, da Silva CV, de Souza MA. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. Path Glob Health. 2014; 108(1):30-6.
38. de Miranda FG, Vilar JC, Alves IA, Cavalcanti SC, Antonioli AR. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. BMC Pharmacol. 2001; 1:6.

39. Reis FP, Senna Bonfa IM, Cavalcante RB, Okoba D, de Souza Vasconcelos SB, Candeloro L, et al. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. J Ethnopharmacol. 2014; 158 Pt A:352-7.
40. Melo e Silva F, de Paula JE, Espindola LS. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. Mycoses. 2009; 52(6):511-7.
41. Costa R, Albergamo A, Pellizzeri V, Dugo G. Phytochemical screening by LC-MS and LC-PDA of ethanolic extracts from the fruits of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. Nat Prod Res. 2017; 31(12):1397-402.
42. Picerno P, Autore G, Marzocco S, Meloni M, Sanogo R, Aquino RP. Anti-inflammatory activity of verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. J Nat Prod. 2005; 68(11):1610-4.
43. Zofou D, Tene M, Tane P, Titanji VP. Antimalarial drug interactions of compounds isolated from *Kigelia africana* (Bignoniaceae) and their synergism with artemether, against the multidrug-resistant W2mef *Plasmodium falciparum* strain. Parasitol Res. 2012; 110(2):539-44.
44. Wu HF, Zhu YD, Zhang LJ, Zou QY, Chen L, Shen T, et al. A new phenylethanoid glycoside from *Incarvillea compacta*. Journal of Asian Nat Prod Res. 2016; 18(6):596-602.
45. Yu ZW, Zhu HY, Yang XS, Sun QY, Hao XJ. Study on chemical constituents from *Incarvillea arguta* and their accelerating PC-12 cell differentiation. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005; 30(17):1335-8.

46. Zhang L, Hasegawa I, Ohta T. Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. *Fitoterapia*. 2016; 109:217-23.
47. Koyama J, Morita I, Tagahara K, Hirai K. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*. 2000; 53(8):869-72.
48. Zhang L, Hasegawa I, Ohta T. Iridoid Esters from *Tabebuia avellanedae* and Their *In Vitro* Anti-inflammatory Activities. *Planta Medica*. 2017; 83(1-02):164-71.
49. Park BS, Kim JR, Lee SE, Kim KS, Takeoka GR, Ahn YJ, et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(4):1152-7.
50. Yamashita M, Kaneko M, Tokuda H, Nishimura K, Kumeda Y, Iida A. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. *Bioorg Medc Chem*. 2009; 17(17):6286-91.
51. Pereira EM, Machado Tde B, Leal IC, Jesus DM, Damaso CR, Pinto AV, et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006; 5:5.
52. Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. *Int J Oncol*. 2005; 26(4):1017-23.
53. Macedo L, Fernandes T, Silveira L, Mesquita A, Franchitti AA, Ximenes EA. beta-Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine*. 2013; 21(1):25-9.

54. Theoduloz C, Carrion IB, Pertino MW, Valenzuela D, Schmeda-Hirschmann G. Potential gastroprotective effect of novel cyperenoic acid/quinone derivatives in human cell cultures. *Planta Medica*. 2012; 78(17):1807-12.
55. Wei XN, Lin BB, Xie GY, Li JW, Qin MJ. Chemical constituents of seeds of *Oroxylum indicum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013; 38(2):204-7.
56. Yan RY, Cao YY, Chen CY, Dai HQ, Yu SX, Wei JL, et al. Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. *Fitoterapia*. 2011; 82(6):841-8.
57. Yan R, Cao Y, Yang B. HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds extracted from *Semen Oroxyli*. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2014; 19(4):4409-17.
58. Sithisarn P, Nantateerapong P, Rojsanga P, Sithisarn P. Screening for Antibacterial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Oroxylum indicum* Fruit Extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2016; 21(4):446.
59. Pereira AM, Hernandez C, Pereira SI, Bertoni BW, Franca SC, Pereira PS, et al. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Chem Biol Interact*. 2014; 224:136-41.
60. Uribe-Beltran MJ, Ahumada-Santos YP, Diaz-Camacho SP, Eslava-Campos CA, Reyes-Valenzuela JE, Baez-Flores ME, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhoea and their susceptibility to the antibacterial activity of extracts/fractions of fruits native to Mexico. *J Med Microbiol*. 2017; 66(7):972-80.
61. Autore G, Rastrelli L, Lauro MR, Marzocco S, Sorrentino R, Sorrentino U, et al. Inhibition of nitric oxide synthase expression

by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sci.* 2001; 70(5):523-34.

62. Pereira SG, de Araujo SA, Guilhon G, Santos LS, Junior LMC. *In vitro* acaricidal activity of *Crescentia cujete* L. fruit pulp against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol Res.* 2017; 116(5):1487-93.

63. Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Res Notes.* 2015; 8:412.

64. Truong NB, Pham CV, Doan HT, Nguyen HV, Nguyen CM, Nguyen HT, et al. Antituberculosis cycloartane triterpenoids from *Radermachera boniana*. *J Nat Prod.* 2011; 74(5):1318-22.

65. Eyoung KO, Folefoc GN, Kuete V, Beng VP, Krohn K, Hussain H, et al. Newbouldiaquinone A: A naphthoquinone-anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry.* 2006; 67(6):605-9.

66. Mostafa NM, Ashour ML, Eldahshan OA, Singab AN. Cytotoxic activity and molecular docking of a novel biflavonoid isolated from *Jacaranda acutifolia* (Bignoniaceae). *Nat Prod Res.* 2016; 30(18):2093-100.

67. da Rocha CQ, Queiroz EF, Meira CS, Moreira DR, Soares MB, Marcourt L, et al. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Nat Prod.* 2014; 77(6):1345-50.

68. Brandao GC, Kroon EG, Souza DE, Souza Filho JD, Oliveira AB. Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules (Basel, Switzerland).* 2013; 18(8):9919-32.

69. Sowemimo A, Samuel F, Fageyinbo MS. Anti-inflammatory activity of *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum. Ex Engl. ethanolic leaf extract. J Ethnopharmacol. 2013; 149(1):191-4.
70. Fan QF, Hu ZY, Na Z, Tang HS, Zuo GY, Song QS. One new flavonoid from *Oroxylum indicum*. Nat Prod Res. 2015; 29(19):1828-32.
71. da Rocha CQ, de-Faria FM, Marcourt L, Ebrahimi SN, Kitano BT, Ghilardi AF, et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. Phytochemistry. 2017; 135:93-105.
72. Jiménez-González FJ, Veloza LA, Sepúlveda-Arias JC. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia*. Univ Sci. 2013; 18:257-67.
73. Jiménez-González FJ, Vélez-Gómez JM, Melchor-Moncada JJ, Veloza LA, Sepúlveda-Arias JC. Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activity of extracts obtained from *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. Phcog Mag. 2018; 14:S25-31.
74. Garzón-Castaño SC, Lopera-Castrillón IA, Jiménez-González FJ et al. Nrf2-Mediated Antioxidant Activity of the inner bark extracts obtained from *Tabebuia rosea* (Bertol) DC and *Tabebuia chrysantha* (JACQ) G. Nicholson. F1000 Research 2019; 7:1937. Disponible en: <https://doi.org/10.12688/f1000research.17165.2>
75. Garzón-Castaño SC, Jiménez-González FJ, Veloza LA et al. Activation of the Keap1-Nrf2 pathway by specioside and the n-butanol extract from the inner bark of *Tabebuia rosea* (Bertol) DC [version 2; peer review: 2 approved]. F1000Research 2020, 9:1262 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.26901.2>).

Este libro es el resultado de la ejecución del proyecto “Desarrollo de Capacidades Científicas y Tecnológicas Aplicadas a los Sectores de la Salud y la Agroindustria en el Departamento de Risaralda (2014-2019)” financiado por el Sistema General de Regalías. Contiene tres capítulos que abarcan desde la información básica asociada a los ácidos nucleicos, el estudio de las células madre, las proteínas y enzimas, para continuar con el uso de la biotecnología en procesos como la inmovilización de enzimas y la producción de proteínas recombinantes. Finalmente, el lector encontrará información relacionada a los múltiples usos de la biotecnología roja, con especial énfasis en aplicaciones clínicas de las células madre, los biomateriales, la metagenómica, la metabolómica, la producción de vacunas y finalmente, la importancia de las plantas medicinales como fuente de moléculas con actividad biológica (bioprospección). Los autores han tratado de presentar la información compleja de una manera sencilla y comprensible para el público en general y, por lo tanto, se considera que el libro podrá ser de utilidad para lectores de diversas disciplinas científicas, así como para estudiantes de pre y posgrado. Adicionalmente, el lenguaje empleado, permite convertir al libro en una guía para los docentes de la básica y la media, como texto para orientar los conceptos básicos y aplicaciones de la Biotecnología en sus estudiantes. Es importante mencionar que los autores realizaron un gran trabajo al elaborar sus propias figuras, excepto en los casos donde se indica la fuente a partir de la cual se realizó la modificación correspondiente.

