

MEMORIAS DEL SEMINARIO INTERNACIONAL
ACOFACIEN – ACCEFYN



TENDENCIAS Y FUTURO
DE LA INVESTIGACIÓN
EN *Parasitología*
Y EN *Productos naturales*

CARLOS CORREDOR PEREIRA
FELIPE GUHL NANNETTI
CARMENZA DUQUE BELTRÁN

Bogotá, D.C. - Colombia
2009

EDITOR

CARLOS CORREDOR PEREIRA, Ph.D.
Director Ejecutivo ACOFACIEN
Miembro de Número ACCEFYN
Miembro Correspondiente ANALMED

EDITORES ASOCIADOS

FELIPE GUHL NANNETTI, M.Sc. DPMT
Director Centro de Investigaciones en Microbiología
y Parasitología Tropical
CIMPAT - Universidad de Los Andes
Miembro Correspondiente ACCEFYN
Miembro Correspondiente ANALMED

CARMENZA DUQUE BELTRÁN, Ph.D.
Departamento de Química - Universidad Nacional de Colombia
Miembro Correspondiente ACCEFYN

ISBN: 978-958-9205-68-6

Armada digital e impresión
Editora Guadalupe S.A.
Tel. 2 69 07 88
E-mail ediguada@yahoo.es
Bogotá, D.C., Colombia, 2009

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Prólogo	9
Introducción	11
PARASITOLOGÍA	
Epidemiología molecular y genética evolutiva de los patógenos: enfoque específico en los agentes de la enfermedad de Chagas y de las leishmaniasis <i>Simone Frédérique Brenière, Etienne Waleckx</i>	23
Epidemiología molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> I <i>Felipe Guhl Nannetti, Claudia Herrera, Anabella Fajardo,</i> <i>Alejandra Falla, Diana Acero y Gustavo Vallejo</i>	31
Desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina causada por <i>Taenia solium</i> <i>Ana Flisser</i>	43
Vacuna contra la leishmaniasis. Descubrimiento y ensayos clínicos <i>Iván Darío Vélez Bernal, Sara María Robledo Restrepo</i>	63
Epidemiología molecular y rutas de dispersión de <i>Triatoma dimidiata</i> <i>M.D. Barges, M.A. Zuriaga y S. Mas-Coma</i>	77
Aspectos co-evolutivos de la interacción <i>Trypanosoma</i> -vector <i>Gustavo Adolfo Vallejo, Felipe Guhl Nannetti, Ximena Carolina Pulido,</i> <i>Claudia Herrera, Daniel Zabala, Daniel Alfonso Urrea</i>	95
<i>Rhodnius pallescens</i> Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae): una com- paración de las poblaciones colombianas y panameñas, basada en su ecología, epidemiología, morfometría y biología molecular <i>Nicolás Jaramillo O., Sair Arboleda Sánchez, Duverney Chaverra,</i> <i>Harling Caro Riaño, Andrés Gómez Palacio, Leysa Gómez,</i> <i>Azael Saldaña, José Calzada, Lorenzo Cáceres</i>	113

	Pág.
Filogenia de los Lymnaeidae vectores de <i>Fasciola hepatica</i> <i>S. Mas-Coma, P. Artigas y M.D. Bargues</i>	141
Las miosinas de <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Jacqueline Chaparro Olaya</i>	159
Organización y mantenimiento de los telómeros de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania</i> <i>María Mercedes Galindo, Noelia Lander, Evelyn Rodríguez,</i> <i>Katherine Figarella, María Gabriela Rojas, José Luis Ramírez,</i> <i>Néstor Añez, Miguel Angel Chiurillo, José Franco Da Silveira</i> <i>y Roberto Do Campo</i>	175
Impacto del secuenciamiento del genoma de tres especies de <i>Leishmania</i> en la investigación básica y aplicada en Colombia <i>Andrés Flórez, Allan Kuchinsky, Daeui Park, Jairo Espinosa,</i> <i>Willington Vega, Jorge Zuluaga, Carlos Muskus</i>	183
ARN nucleolares pequeños de tripanosomátidos: un ejemplo de la importancia de los ARN no traducidos <i>Concepción J. Puerta</i>	193
Retrotransposones: ¿parásitos de genomas o motores de evolución? <i>Manuel Carlos López, M. Carmen Thomas</i>	209

PRODUCTOS NATURALES

Introducción	239
--------------------	-----

SECCIÓN 1

Descubrimiento de sustancias de origen natural.

Nuevos protocolos de separación y análisis y tendencias
de aprovechamiento

Agro, farma y metabolitos secundarios: algo en común <i>José Hipólito Isaza Martínez</i>	245
Searching for antiparasitic agents: from the empiric screening of natural products to the investigation of traditional medicinal plants <i>Alaíde Braga de Oliveira</i>	263

Pág.

Contribución a la química del género <i>Montanoa</i> : lactonas sesquiterpénicas <i>Leovigildo Quijano, José S. Calderón y Tirso Ríos</i>	297
Ciencia vs. Sociedad. La búsqueda de sustancias bioactivas de la flora colombiana <i>Fernando Echeverri</i>	309

SECCIÓN 2

Nuevas fronteras en productos naturales marinos y terrestres.
Microorganismos como fuentes de compuestos aprovechables
por el hombre

Desarrollo de nuevos antibacterianos contra la vibriosis a partir de las estructuras de los sideróforos aislados de la bacteria patógena <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Carlos Jiménez</i>	339
Organismos marinos: fuente asombrosa de compuestos útiles para la humanidad <i>Carmenza Duque B.</i>	353

SECCIÓN 3

Métodos de producción en gran escala de compuestos naturales
para su desarrollo industrial. Síntesis química

Modernas estrategias en la síntesis de productos naturales bioactivos <i>Alejandro Fernández Barrero</i>	373
Perspectivas de la agroindustria de aceites esenciales en Colombia <i>Elena E. Stashenko</i>	385

SECCIÓN 4

Métodos de producción en gran escala
de compuestos naturales para su desarrollo industrial.
Métodos biotecnológicos

Pseudopterosine synthesis: the promise and the challenge <i>Russell G. Kerr</i>	399
--	-----

	Pág.
Producción de metabolitos primarios y secundarios mediante el cultivo de células vegetales <i>Lucía Atehortúa</i>	411
TALLERES	
PARASITOLOGÍA	439
PRODUCTOS NATURALES	449
CONCLUSIONES	
PRINCIPALES ACUERDOS	470
CONCLUSIONES GENERALES	474
AGENDA PARA LOS PRÓXIMOS CINCO AÑOS	477
CONFERENCIA DE CLAUSURA HITOS DE LA INVESTIGACIÓN EN PARASITOLOGÍA Gustavo Malagón Londoño	482

PRÓLOGO

Como resultado de charlas coloquiales con los académicos José Lozano, Secretario de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, ACCEFYN, y Carlos Corredor, Director Ejecutivo de la Asociación Colombiana de Facultades de Ciencias, ACOFACIEN, surgió la idea de realizar una serie secuencial de Seminarios Internacionales, mediante los cuales investigadores colombianos de grupos con liderazgo investigativo reconocido en temáticas de ciencias exactas, físicas y naturales tuviesen la oportunidad de interactuar con sus pares de otros países, con el fin de intercambiar conocimientos, experiencias, resultados y recursos, tratando de establecer alianzas estratégicas para cristalizar esa interacción.

Hace cuatro décadas hubiese sido difícil haber podido realizar este tipo de experiencia porque apenas comenzaban a constituirse incipientes grupos de investigación en las áreas de las ciencias naturales de la biología, la física, la química, las ciencias de la Tierra y las matemáticas, aunque estas últimas eran talvez las mejor establecidas en el país. Varias veces hemos comentado que mientras en la primera mitad del siglo XX, en el mundo Occidental, y en particular en Europa, los conocimientos y las aplicaciones tecnológicas de estas ciencias básicas progresaron de manera nunca vista en la historia de la humanidad, nuestro país pasó ese medio siglo prácticamente de espaldas a ese extraordinario avance científico y tecnológico. Afortunadamente, gracias al talento, al esfuerzo y a la iniciativa de varios colombianos, y a pesar de la miopía de los gobernantes y políticos, poco a poco se han venido formando investigadores de calidad y se han constituido grupos de investigación, varios de los cuales han llegado a conquistar la excelencia, según Colciencias. Este Seminario Internacional, además de cumplir con éxito el objetivo propuesto, es también un reconocimiento a esos esfuerzos y al talento de nuestros investigadores, algunos de ellos reunidos en este evento con sus pares extranjeros para concertar estrategias que les permitirán crear y/o fortalecer vínculos de cooperación mutua.

El país ha progresado, aunque no con el ritmo que se requiere, en la toma de conciencia de la necesidad de apoyar el desarrollo de la ciencia y la

tecnología como condición de desarrollo económico y de bienestar social del país. Más gobernantes, políticos y empresarios muestran mayor sensibilidad y comprensión por los temas de ciencia, tecnología e innovación en temáticas como las relacionadas con la reforma de la ley de Ciencia, Tecnología e Innovación cuya aprobación cursa en el Senado de la República, las relaciones y gestiones Universidad-Empresa-Estado, los recursos financieros necesarios para el desarrollo de la ciencia y la tecnología no sólo a nivel nacional sino también a nivel regional. Somos optimistas y seguiremos aportando nuestra contribución al país a través de estos seminarios internacionales impulsados por ACCEFYN y ACOFACIEN.

Jaime Rodríguez Lara
Presidente de la Academia Colombiana de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales

INTRODUCCIÓN

Dentro de los problemas que más afectan la salud en el mundo, particularmente en los países de menor desarrollo relativo, están las patologías causadas por parásitos intracelulares entre los que se encuentran los del subreino protozoa de las familias plasmodiidae, trypanozomatidae y por otros parásitos tales como los platihelminths de la familia taeniidae. En Colombia hay varios grupos de investigación que se han dedicado al estudio básico de estos parásitos y de sus vectores y que han hecho contribuciones muy importantes, publicadas en revistas de circulación internacional. Entre estos grupos se encuentran los de las universidades de los Andes, Nacional, Javeriana, Antioquia, Tolima y Valle y el Instituto de Inmunología cuyos investigadores tienen amplio reconocimiento tanto nacional como internacional. De la misma manera, existen grupos de investigación en otros países dedicados al mismo tipo de estudio y con resultados ampliamente reconocidos y difundidos. Por otro lado, Colombia es uno de los países de mayor diversidad biológica del mundo, en donde se encuentran especies vegetales que contienen metabolitos secundarios útiles o potencialmente útiles para el tratamiento y prevención de éstas y de otras patologías. Cabe mencionar la quina, obtenida de plantas del género chinchona, utilizada por los incas, cuyo metabolito, quinina, hoy continúa siendo la base para la producción de fármacos de síntesis para el tratamiento de malaria. Existen grupos de gran trayectoria y amplio reconocimiento en las universidades Nacional, Javeriana, Antioquia y Valle, amén de otros que se inician en universidades de provincia, que trabajan en el reconocimiento, aislamiento y caracterización de productos naturales con actividad biológica potencialmente útiles para el tratamiento de diferentes patologías. Así mismo, estos grupos tienen su contraparte en universidades de España, Brasil, Canadá y México.

El mejoramiento de la salud de la población colombiana en temas relacionados con parásitos intracelulares y la manera como se puede prevenir la infección y tratar a las personas infectadas requiere que haya un conocimiento claro de la historia natural de las enfermedades, sus vectores, sus rutas de difusión, sus características genéticas y su metabolismo. No basta

de ninguna manera basarse en la investigación que proviene de países relativamente más avanzados, sino que estas condiciones tienen que ser investigadas en nuestro medio y sus resultados confrontados con los de grupos extranjeros. Una hipótesis o un hallazgo científico no pueden considerarse como válidos, si no han sido reproducidos en un laboratorio diferente al de quien ha hecho la publicación original.

En Colombia hemos tenido una historia importante en el estudio de las así llamadas enfermedades tropicales, muchas de ellas transmitidas por vectores biológicos, cuyo hábitat y etología han sido descritos por figuras tan importantes, ya desaparecidas, como Ricardo Franco, Carlos Sanmartín y Santiago Rengifo, y otros que aún viven como Hernando Groot Liévano, secretario perpetuo de la Academia Nacional de Medicina. Los estudios de estos pioneros de la investigación médica se han continuado en el ámbito de la investigación básica en algunas de nuestras más importantes universidades y son el requisito *sine qua non* para entender al parásito y controlar su difusión.

A través de la investigación básica hemos entendido que los procesos de recombinación del genoma de los trypanosomatidae permite que sus proteínas de superficie puedan cambiar en forma tal que una vez que se monta una respuesta inmune algún parásito pueda escapar porque tiene nuevos determinantes antigénicos no reconocidos por el sistema inmune, haciendo que el parásito que evadió la respuesta, cuando pasa a otro hospedero y, aún en el mismo, continúe causando una respuesta patológica. Este conocimiento ha sido invaluable para el diseño de vacunas que, como la producida por métodos químicos en el Instituto de Inmunología, tienen una efectividad que, aunque relativamente baja, es promisoría para la prevención de la malaria. Estos desarrollos no serían posibles sin el conocimiento producido por la investigación básica en proteínas de membrana del parásito. En esta misma dirección hay avances importantes en el desarrollo de vacuna contra la leishmaniasis en la Universidad de Antioquia y contra el cisticercos en México.

Otro aspecto fundamental es la epidemiología molecular y la genética evolutiva y coevolutiva de estos patógenos. En las universidades Nacional, Javeriana, de los Andes y del Tolima, entre otras, se han hecho avances importantes que tienen su contraparte en estudios de investigadores españoles y franceses. Entre estos estudios se deben resaltar los moleculares del kinetoplasto que han permitido mostrar que el control de la expresión génica se puede encontrar en los intrones, cuyo papel era desconocido hasta hace poco, y en la posibilidad de retrotransposones, es decir, de segmentos completos de DNA que cambian de un sitio a otro del genoma, como puede ocurrir en algunas plantas.

A la par con estos estudios sobre epidemiología, desde los tiempos de la expedición botánica de Mutis, ha habido un interés nacional claro en la búsqueda y estudio de sustancias de origen vegetal que tengan efecto en el tratamiento de las patologías propias de nuestro país. Este estudio comienza con el mismo Mutis, médico e investigador básico, que publicó un sesudo estudio sobre las quinas, y continuó con la expedición Corográfica de Codazzi y ya en el siglo XX con estudios sistemáticos sobre los metabolitos secundarios de nuestras plantas terrestres y marinas que puedan tener efecto sobre los patógenos. Grupos importantes han surgido en las universidades Nacional, Javeriana y de Antioquia, entre otras, cuya contribución ha permitido aislar y caracterizar un número importante de metabolitos nuevos para el mundo y determinar su actividad biológica, bien como agonistas o como antagonistas, en diferentes patologías. Estos grupos tienen su contraparte en científicos brasileiros, mexicanos, españoles y canadienses.

La mayor parte de la investigación básica en parasitología molecular y productos naturales se hace en las Facultades de Ciencias, aunque hay grupos en las Facultades de Medicina de las universidades Nacional, Valle y Antioquia que también han abocado el problema, más desde el área de la farmacología o etnofarmacología, que desde la investigación fitoquímica y microbiológica.

La Asociación Colombiana de Facultades de Ciencias, ACOFACIEN, reúne a las 38 facultades de ciencias que existen como tales en las universidades de todo el país. Pertenece a la Asociación, además, la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales –ACCEFYN– entre cuyos miembros de número y correspondientes se encuentran destacados parasitólogos que han hecho contribuciones muy importantes al conocimiento de las enfermedades tropicales, así como químicos que han estudiado sistemáticamente nuestra flora con el objeto de identificar metabolitos secundarios que puedan ser de utilidad farmacológica e industrial.

En la Asamblea de ACOFACIEN de marzo del presente año, y como consecuencia de este último análisis, se discutió la necesidad de saber qué avances se habían logrado en Colombia y en otros países en investigación básica en enfermedades transmitidas por vectores y en la búsqueda de productos naturales de interés biológico y se decidió hacer un seminario internacional que revisara las tendencias actuales de la investigación en parasitología y en productos naturales con los siguientes objetivos:

- a. Contrastar los avances, experiencias y resultados en investigación científica logrados en nuestro país, con los de países más desarrollados en las dos áreas específicas mencionadas.

- b. Crear y/o fortalecer vínculos entre los grupos líderes de investigación que participen en este seminario, que les permitan desarrollar programas conjuntos de investigación apoyados por instituciones y agencias nacionales e internacionales.
- c. Poner en contacto directo a investigadores de primera línea extranjeros e investigadores de primera línea colombianos con estudiantes de posgrado, especialmente de doctorado. Este contacto se logrará a través de la conformación de grupos de trabajo en los que todos los presentes podrán participar, discutir su propia investigación con los invitados y establecer alianzas para trabajos cooperativos futuros.
- d. Buscar visitas futuras como profesores visitantes tanto de los extranjeros en nuestras universidades como de nuestros profesores en universidades extranjeras.
- e. Conseguir que estudiantes de doctorado colombianos hagan pasantías en centros de investigación extranjeros y estudiantes extranjeros hagan lo propio en centros de investigación colombianos.
- f. Difundir tanto en Colombia como en el extranjero la investigación colombiana en estas áreas a través de la publicación comentada de las presentaciones y conclusiones del evento.
- g. Construir un plan a cinco años que permita incrementar los logros de la investigación y su uso para el mejoramiento de la salud de los colombianos.

Para cumplir este mandato de la Asamblea, ACOFACIEN creó una comisión conjunta con ACCEFYN compuesta por el presidente, académico Jaime Rodríguez, el secretario, académico José Lozano y tesorera, académica Inés Bernal de ACCEFYN y el Director ejecutivo, académico Carlos Corredor y Directora Administrativa, Cristina de Corredor de ACOFACIEN. La comisión encomendó la Coordinación General del Seminario al académico Carlos Corredor, de la Universidad Javeriana; la coordinación del programa de Parasitología al Académico Felipe Guhl, de la Universidad de los Andes y la de Productos Naturales a la académica Carmenza Duque, de la Universidad Nacional.

Durante más de seis reuniones, la comisión decidió los subtemas a tratar en cada uno de los dos tópicos principales e identificó 14 investigadores nacionales y 11 investigadores extranjeros de primera línea a quienes se invitó para que presentaran sus últimos avances investigativos en el Seminario Internacional, así:

TEMA	CONFERENCISTAS
Desarrollo de vacunas	Manuel E. Patarroyo, FIDIC, Bogotá El desarrollo de la vacuna sintética de la malaria. Ana Flisser. UNAM, México El desarrollo de la vacuna contra cisticerco. Iván Darío Vélez. Universidad de Antioquia, Medellín. El desarrollo de vacuna contra leishmaniasis
Epidemiología Molecular y Genética Evolutiva de Patógenos:	Frédérique Brenière, Institut de Recherches pour le Développement, Montpellier y La Paz, Bolivia. Agentes de la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. María Dolores Bagues. Universidad de Valencia, España Epidemiología molecular y rutas de dispersión de <i>Triatoma dimidiata</i>. Felipe Guhl-CIMPAT-Universidad de los Andes, Bogotá Epidemiología Molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> Gustavo A. Vallejo – Universidad del Tolima Aspectos coevolutivos de la interacción huésped parásito Nicolás Jaramillo. Universidad de Antioquia <i>Rhodnius pallescens</i>: Una especie sorprendente. Santiago Mas Coma, Universidad de Valencia, España Filogenia de los limneidos vectores de <i>Fasciola hepatica</i> Jacqueline Chaparro Olaya, Universidad El Bosque, Bogotá Las miosinas de <i>Plasmodium falciparum</i>
<u>El genoma de los kinetoplastide</u>	José Luís Ramírez. Universidad de la Naciones Unidas; Programa Biotecnología para América Latina y el Caribe. IDEA, Venezuela Organización y mantenimiento de los telómeros de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania</i>. Carlos Muskus Universidad de Antioquia, Medellín Impacto del secuenciamiento del genoma de tres especies de <i>Leishmania</i> en la investigación básica y aplicada en Colombia. Concepción Puerta. Universidad Javeriana. Bogotá ARN nucleares pequeños de tripanosomátidos: Un ejemplo de la importancia de los ARN no traducidos. Manuel Carlos López. Universidad de Granada, España Retrotransposones: ¿parásitos de genomas o motores de la evolución?
Descubrimiento de sustancias de origen natural. Nuevos protocolos de separación y análisis y tendencias de aprovechamiento	Leovigildo Quijano, Universidad Nacional Autónoma de Méjico Contribución de la Química del Genero <i>Montanoa</i> y Género <i>Hippocratea</i> Alaíde Braga de Oliveira, Universidad Federal de Minas Gerais Importancia de la información etnofarmacológica en la búsqueda de agentes antiparasitarios. Fernando Echeverri, Universidad de Antioquia Ciencia vs. Sociedad. La Búsqueda de Sustancias Bioactivas de la Flora Colombiana.
Nuevas fronteras en productos naturales marinos y terrestres. Microorganismos como fuentes de compuestos aprovechables por el hombre.	Carlos Jiménez, Universidad de la Coruña Desarrollo de nuevos antibacterianos contra la vibriosis a partir de las estructuras de los sideróforos aislados de la bacteria patógena <i>Vibrio anguillarum</i>. Carmenza Duque, Universidad Nacional Organismos Marinos: fuente asombrosa de compuestos útiles para la humanidad.
Métodos de producción en gran escala de compuestos naturales para su desarrollo industrial. Síntesis	Alejandro Fernández Barrero, Universidad de Granada, España. Modernas Estrategias en la Síntesis de Productos Naturales Bioactivos. Elena Stashenko Universidad Industrial de Santander Perspectivas de la agroindustria de aceites esenciales en Colombia.
Métodos de producción en gran escala de compuestos naturales para su Desarrollo industrial. Biotecnología	Russell Kerr, Universidad Príncipe Eduardo, Canadá. Pseudopterósinas: La promesa y el Reto. Lucía Atehortua, Universidad de Antioquia, Medellín Aspectos Críticos en el Escalado de Células Vegetales para la Producción de Metabolitos Primarios y Secundarios.
Hitos de la Investigación en Parasitología en Colombia	Gustavo Malagón Londoño, Presidente Academia Nacional de Medicina

La comisión decidió que para obtener el máximo beneficio de la reunión, era necesario cambiar el formato tradicional de este tipo de seminarios. En efecto, no se quiso que fuera un simposio en el que un grupo de expertos comunica los avances que han ocurrido en un tema específico de un campo del conocimiento, ni un congreso al que todos pueden enviar presentaciones para mostrar los propios resultados en temas particulares de una disciplina y, tampoco, un taller o “workshop” en el que se discutiera sobre un tema en particular, sino más bien una combinación de los formatos tradicionales para que, en su sentido etimológico de semillero, es decir, una instancia en la que se siembran las simientes para que bien abonadas crezcan y produzcan fruto, el Seminario Internacional se convirtiera en una oportunidad para sembrar hacia el futuro.

Se decidió, entonces, que el tiempo no dedicado a conferencias se dedicaría a talleres en los que los conferencistas y los participantes pudieran debatir su trabajo, agrupando esta acción en tres tópicos alrededor de los cuales se orientaría la discusión y se sacarían conclusiones y una guía de trabajo para los próximos cinco años. Los participantes quedaron en libertad de asistir a cualquiera de los talleres, y los tres tópicos se abordaron desde la perspectiva de la parasitología y de los productos naturales, de manera que se conformaron seis grupos de discusión que se reunieron independientemente los dos primeros días y la mañana del tercero y en la tarde del mismo día presentaron sus conclusiones a una sesión plenaria en la que todos estuvieron presentes. Los tópicos a debatir fueron:

- a. Interacción entre grupos interdisciplinarios. Prioridades de investigación. Fuentes de financiamiento. Una agenda para los próximos cinco años.
- b. Estrategias para el fortalecimiento del intercambio científico y tecnológico entre los países participantes. Una agenda para los próximos cinco años.
- c. Fortalecimiento de programas doctorales. Recursos disponibles. Necesidades y nuevos retos. Agenda para los próximos cinco años.

Una vez elaborado el borrador del programa, la comisión contactó a la Academia Nacional de Medicina que entró a colaborar con entusiasmo en la organización del evento a través de su presidente y secretario.

La comisión reconoció que un encuentro como el previsto no puede tener como resultado tan sólo el conocimiento que se confronta y se socializa entre los investigadores, sino que es necesario que tenga efectos concretos en la Salud Pública y contribuya a disminuir la morbilidad causada por

enfermedades transmitidas por vectores. Pero, para que el Estado pueda diseñar políticas de salud pública efectivas a largo plazo, es necesario que tenga todos los elementos de juicio necesarios para su diseño. Por esta razón se contactó al Ministerio de la Protección Social, a través de la Dirección General de Salud Pública, y se le propuso un esfuerzo conjunto para cumplir con los objetivos de lograr un conocimiento profundo y actualizado de la investigación en parasitología y en productos naturales. El Ministerio respondió positivamente a esta invitación, consciente de que en el caso de la parasitología es necesario que dicho Ministerio tenga un conocimiento profundo y actualizado de los mecanismos moleculares que permiten que los parásitos completen sus ciclos, así como de su genoma, del control de expresión de sus genes, del control del ciclo celular, así como de sus rutas de dispersión. De la misma manera, el Ministerio debe tener un conocimiento básico de los productos naturales que frecuentemente son usados por nuestra población en forma tradicional, pero sin que sepamos los principios activos que se encuentran en las plantas de uso folklórico. Con el Ministerio se convino en la necesidad de socializar este conocimiento a la mayor parte de los investigadores nacionales en estas áreas y publicar un libro que no sólo incluyera los trabajos *in extenso* de los investigadores invitados, sino comentarios autorizados sobre estas presentaciones. De la misma manera, Colciencias y el ICETEX entendieron la importancia del Seminario como un evento científico y académico de la mayor importancia y prestaron toda su colaboración para que se llevara a cabo. La Universidad de los Andes quiso acoger al Seminario como parte de la celebración de sus sesenta años de existencia, permitiendo que las conferencias magistrales se llevaran a cabo en dos auditorios y los talleres en seis aulas especialmente adaptadas para el evento.

El Seminario se realizó los días 4, 5 y 6 de agosto. La ceremonia inaugural contó con la presencia de los rectores de las universidades de los Andes, Dr. Carlos Angulo, de la Nacional de Colombia, Dr. Moisés Wasserman y de la Javeriana, P. Joaquín Emilio Sánchez, S.J. El Rector de la Universidad de los Andes, Dr. Carlos Angulo, dio la bienvenida a los participantes y en su discurso señaló la importancia que tiene la investigación básica en la dilucidación de las bases moleculares de las enfermedades tropicales, señaló cifras de morbilidad a escala mundial y nacional y expresó su complacencia por tener al grupo de conferencistas invitados y los participantes de todo el país en la Universidad de los Andes. Inmediatamente después, el Director Ejecutivo de ACOFACIEN presentó los objetivos y la organización del Seminario. La conferencia inaugural fue pronunciada por el Presidente de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Asistieron a los tres días del seminario 181 profesores, investigadores y estudiantes de posgrado, de los cuales 88 trabajaron en parasitología y 93

en productos naturales. Durante el primer día asistieron, además, 20 miembros del FIDIC adicionales a los que estuvieron los tres días en las sesiones de parasitología. Los asistentes provenían de universidades de todo el país, así: de Bogotá (Nacional, Andes, Javeriana, UDCA, Tadeo, Sabana, El Bosque, Rosario), Antioquia, Cartagena, Caldas, Cauca, Córdoba, Magdalena, Sinú, Sucre, Tolima, UIS, y Valle, del Instituto Nacional de Salud, de Invemar, FIDIC, Ministerio de Protección Social y Colciencias.

A pesar de que los asistentes tuvieron libertad para oír las conferencias de cualquiera de las dos especialidades, la mayor parte estuvo todo el tiempo en la de su especialidad, así: 102 en parasitología y 117 en productos naturales, incluyendo a los conferencistas y relatores de cada área y los organizadores, dos de ACOFACIEN y tres de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

El programa científico del Seminario se inició con la conferencia de Manuel Elkin Patarroyo, del FIDIC, sobre la historia y evolución de la vacuna sintética contra la malaria. Después de mostrar las cifras de morbilidad inhabilitante y creciente mortalidad en el mundo producidas por la infección con el *Plasmodium falciparum*, hizo un recuento de la génesis de las ideas que lo llevaron a proponer y sintetizar su vacuna contra la malaria basada en síntesis química de péptidos. Mostró las dificultades tanto teóricas como prácticas para obtener péptidos con una estructura 3D que tuvieran la suficiente inmunogenicidad y la manera como en su laboratorio se fueron superando las dificultades técnicas hasta obtener la primera vacuna con cierto nivel de protección. Hizo un recuento de la manera como se llevaron a cabo vacunaciones masivas en varios países y cómo, finalmente, los resultados de un estudio epidemiológico en Asia habían hecho que hicieran una pausa hace tres años, que les ha permitido consolidar el trabajo de laboratorio tanto de modelación como de biología molecular y de química sintética que han sido publicados en múltiples artículos en revistas indexadas. El Dr. Patarroyo no envió un resumen de su conferencia, razón por la cual no se incluye en este libro.

Los organizadores quieren agradecer formalmente la colaboración de las siguientes entidades sin cuyo apoyo el Seminario hubiera sido imposible:

- Dirección General de Salud Pública – Ministerio de la Protección Social
- COLCIENCIAS
- ICETEX
- Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado – AUIP
- Asociación Colombiana de Parasitología

- Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe de la Universidad de las Naciones Unidas.
- Universidad de Los Andes
- Universidad de Antioquia
- Universidad del Tolima
- Universidad Industrial de Santander
- Universidad Tecnológica de Pereira
- Banco de Occidente
- Tecnoquímicas – División Farmacéutica MK
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia
- Gaseosas Lux

El editor



PARASITOLOGÍA



Epidemiología molecular y genética evolutiva de los patógenos: enfoque específico en los agentes de la enfermedad de Chagas y de las Leishmaniasis

Simone Frédérique Brenière¹, Etienne Waleckx¹

Resumen

La epidemiología de las enfermedades causadas por agentes patógenos se apoya en estudios moleculares porque los patógenos están compuestos de diferentes entidades que hay que distinguir e identificar para entender mejor cuáles son sus relaciones con los huéspedes. La evolución de los organismos, la cual se traduce en los genomas, tiene como consecuencias diversificar genéticamente las poblaciones y adaptar los microorganismos a los huéspedes y al medio ambiente. Las investigaciones genéticas de poblaciones de los agentes de la enfermedad de Chagas y de las leishmaniasis constituyen un buen modelo del proceso de investigaciones básicas al servicio de la epidemiología. Los autores presentan de manera sintetizada cómo las investigaciones se han desarrollado con una perspectiva evolucionista de los organismos. También exponen varias preguntas a las cuales la epidemiología molecular puede contestar.

Palabras clave: epidemiología molecular, genética evolutiva, patógenos, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, *T.cruzi*, *Leishmania*.

Abstract

The epidemiology of diseases caused by pathogens is supported by molecular studies. Indeed pathogens are composed of different entities we have to distinguish and identify to better understand the relationships they

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 016 "Caracterización y control de las poblaciones de vectores", Representación en Bolivia, 5290 AV Hernando Siles CP9214, Obrajes La Paz; Fax: 591 (2) 278 29 44 Tel: 591 (2) 278 2969. Correos electrónicos: breniere@ird.fr, etiennewalex@yahoo.fr

have with the hosts. The evolution of organisms, which can be read among genomes, induces a genetic diversification of the populations and allows adapting the organisms to the hosts and the environment. Population genetics research on Chagas disease and leishmaniasis agents is a good model representing the process from basic research to epidemiology. The authors summarize how investigations have been conducted with an evolutionary approach of the organisms. They also present several questions to which the molecular epidemiology can answer.

Key words: molecular epidemiology, evolutionary genetics, pathogens, Chagas disease, leishmaniasis, *T.cruzi*, *Leishmania*.

Los patógenos, es decir organismos que provocan enfermedades, presentan una enorme diversidad. Atacan tanto a animales como a plantas, colonizan todos los medios, y algunos soportan condiciones físicas extremas. Son mayormente muy chiquitos pero pueden dañar organismos mucho más complejos y más evolucionados como el hombre. Sus estrategias de sobrevivencia son complejas y múltiples. Así, los patógenos son transformistas, es decir que se modifican fácilmente gracias a mutaciones frecuentes. De hecho, toda la evolución de los patógenos parece dirigida hacia su propia sobrevivencia y para esto, perturban el medio en cual entran, lo que provoca enfermedades de sus huéspedes. Aprovechan posibilidades de expansión logrando infectar nuevas especies para difundirse mejor y garantizar su supervivencia en la naturaleza.

Las complejas estrategias que tienen los patógenos para mantenerse en un huésped hacen difícil su eliminación. De hecho, carecemos de vacunas para un gran número de agentes patógenos como, por ejemplo, para los protozoarios responsables de grandes endemias en el mundo (paludismo, tripanosomiasis, leishmaniasis). Otros ejemplos son los virus del SIDA y de la hepatitis: se lucha hace varios años contra ellos sin poder tener un éxito total.

Hoy en día, el hombre está amenazado por infecciones re-emergentes o emergentes debidas a agentes patógenos. De forma general, los cambios de actividades humanas asociados a los cambios climáticos exponen el hombre a agentes infecciosos que se mantenían hasta el momento en animales reservorios, aves o mamíferos. Estos “nuevos agentes” toman vías múltiples para ser transmitidos al hombre. Las más clásicas son a través de insectos vectores o vía el consumo de alimentos.

Debido a la inmensa variedad de organismos vivos, y patógenos en particular, el hombre, desde tiempo atrás, tuvo la necesidad de clasificar y

ulteriormente entender quién es descendiente de quién. En la década de 1930, las primeras clasificaciones que eran hasta entonces constituidas solo de los grupos “animalia” y “plantae” fueron revolucionadas gracias al invento del microscopio. Así, se agruparon los animales y plantas en un mismo grupo, el de los eucariotas, porque estaban constituidos de células, unidad común, con un material de ADN encerrado separadamente del citoplasma en un núcleo. Desde luego las otras formas de vida (células sin núcleo) se agruparon en un súper grupo, el de los procariotas.

En los años 60, los investigadores empezaron a proponer clasificaciones genealógicas basadas en el material genético como las secuencias de ADN, ARN y proteínas. La idea básica es que una especie ancestral se transforma por mutaciones de su material genético, dando nacimiento a una nueva especie. Años más tarde, en 1977, con el descubrimiento de las *arqueobacterias* gracias al estudio del ARN 16S, se propusieron dos ramas evolutivas: la de las *eubacterias* y la de las *arqueobacterias*, siendo los eucariotas una rama ulterior a las *arqueobacterias* (ver Figura 1).

Los agentes patógenos se ubican tanto en los eucariotas como en procariotas, pueden ser bacterias, protozoarios, hongos, nematodos... Cabe mencionar, sin embargo, que los virus, agentes patógenos sumamente peligrosos, no aparecen en la Figura 1. En realidad, los virus no están incluidos en lo que la ciencia define como organismo vivo, pues poseen constituyentes en común con las células vivas (ADN o ARN, proteínas, ...), pero son

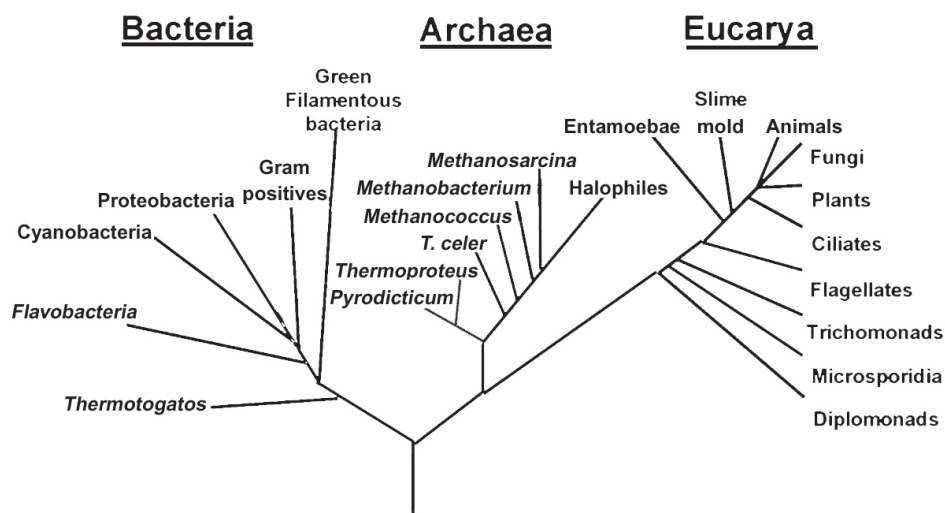


Figura 1. Árbol filogenético de vida de Carl Woese Nyoman (1990) basado en estudios del ARN ribosomal con enfoque especial al estudio del aminoacyl-tRNA sintetasa y a los fenómenos de transferencia horizontal de genes.

entidades no celulares que necesitan los constituyentes de una célula huésped para su replicación. Quedan todavía muchas hipótesis sobre sus orígenes: formas iniciales de vida que se organizaron paralelamente a las células; origen celular (hipótesis argumentada por la existencia de las *Rickettsia*, pequeñas bacterias que regresaron a un estado de dependencia de una célula huésped para su replicación como los virus); origen plasmídico o de transposones.

La epidemiología molecular es, hoy en día, un campo de la ciencia muy importante para entender los factores que influyen en la salud y las enfermedades. Se apoya en la lectura de los genomas de los organismos e individuos para lograrlo.

Trypanosoma cruzi, el agente del mal de Chagas y los parásitos del género *Leishmania*, responsables de las leishmaniasis, son protozoarios eucariotas unicelulares del orden de los Kinetoplastida y de la familia de los Trypanosomatidae. Se estiman entre 15 y 12 millones las personas afectadas por estas enfermedades respectivamente en el mundo, haciendo de estas las dos enfermedades parasitarias más presentes en el continente americano. Son enfermedades todavía desatendidas, con la mayoría de los pacientes sin acceso a atención médica. Los ciclos de desarrollo de estos parásitos son complejos, compartidos entre insectos vectores y numerosas especies de mamíferos. Presentan fases de multiplicación extracelular en el insecto e intracelular obligatoria en el huésped mamífero.

De forma general, las herramientas moleculares permiten identificar los factores que contribuyen al sustento de estas enfermedades infecciosas por medio del estudio de todos los organismos que participan en el ciclo de transmisión del parásito (huéspedes intermediarios y definitivos como el agente patógeno mismo). Las preguntas a las cuales la epidemiología molecular, basada en la lectura de los genomas de patógenos, puede contestar son múltiples; se presentan de manera secuencial y se apoyan mayormente en los fundamentos de la genética de poblaciones y principios evolutivos (ver Figura 2).

La posibilidad de reconocer e identificar las especies de patógenos son etapas primordiales pero el concepto de especie biológica hace referencia al modo de multiplicación de los organismos e implica un aislamiento reproductivo entre un grupo natural de individuos y otros grupos afines (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942). Este concepto de especie no se puede aplicar a la mayoría de los microorganismos que tienen proporciones variables de propagación clonal y recombinación genética. Varias alternativas al concepto de especie biológica han sido propuestas, como la “especie evolutiva”, la cual es un simple linaje de poblaciones u organismos que mantienen

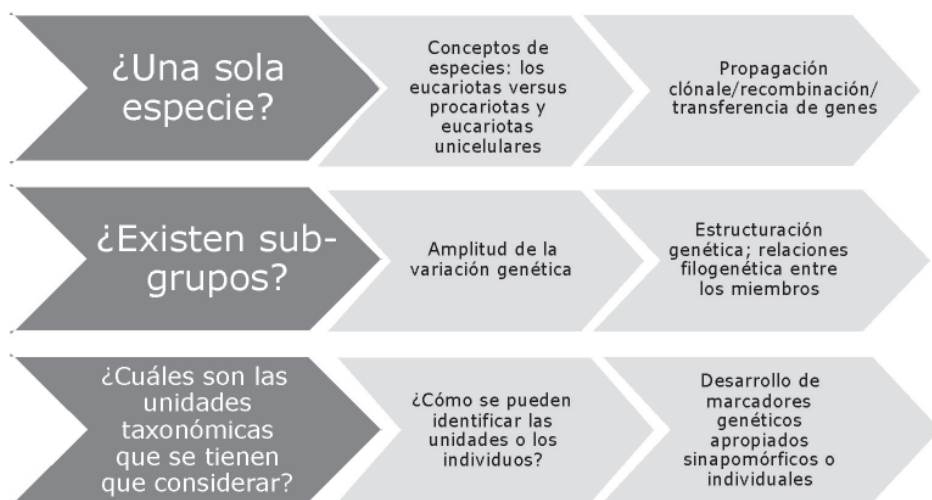


Figura 2. Epidemiología molecular y perspectiva evolutiva de los organismos patógenos.

su identidad de otros linajes y que poseen sus propias tendencias históricas y evolutivas (Wiley 1991) o la “especie filogenética”, propuesta por Cracraft (1989), la cual se reconoce como un grupo de organismos que comparten un carácter único derivado, no presente en sus ancestros o afines.

En el caso de *T. cruzi* y *Leishmania* la diversidad genética se explica en parte por eventos de recombinaciones, pero su propagación esencialmente clonal en la naturaleza durante numerosas generaciones, ha generado una gran diversidad genética por acumulaciones de mutaciones de manera estocástica (Tibayrenc *et al.*, 1991). El conocimiento de la variabilidad infra “específica” y la sub-estructuración de estos taxones es esencial y permite sujetar las unidades taxonómicas de importancia epidemiológica. Se puede, a partir de los estudios filogenéticos básicos, definir sub-unidades discretas y desarrollar marcadores para su detección en los diferentes huéspedes. En el caso del género *Leishmania*, la identificación de las principales ramas evolutivas a través de marcadores genéticos ha permitido confirmar en general el estatuto de las diferentes especies, responsables de formas clínicas diferentes, pero a veces, no se ha podido obtener una distinción clara entre dos especies como en el caso de *Leishmania* (V.) *panamensis* y *Leishmania* (V.) *guyanensis* (Bañuls *et al.*, 1999). Por lo que se refiere a *T. cruzi*, se estima que el taxón se divide en dos o tres líneas evolutivas (Westenberger *et al.*, 2005, Freitas *et al.*, 2006) que podrían ser consideradas como “especies” de la misma manera que las definidas dentro del taxón *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 1999), pero los criterios epidemiológicos y/o médicos que podrían apoyar estas propuestas no son por ahora consensuales.

Los trabajos de epidemiología molecular aplicados a los agentes patógenos se inscriben en contextos generales que permiten definir relaciones evolutivas entre los miembros estudiados pero también en contextos particulares para entender las vías de propagación de los patógenos y los factores ligados a las enfermedades en función de la variabilidad genética. La Figura 3 presenta varios enfoques que interesan la epidemiología molecular aplicada a los agentes patógenos:

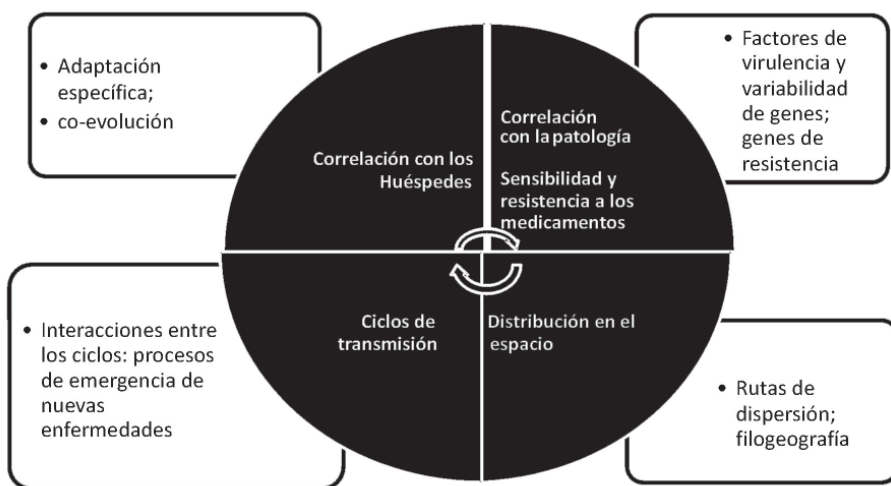


Figura 3. Varios aspectos de la epidemiología aprovechan del enfoque molecular basado en la detección de las unidades taxonómicas.

- Historia de la evolución de los patógenos frente a los numerosos huéspedes vectores y mamíferos implicados en su transmisión.
- Correlación entre las variantes genéticas y la patología de las enfermedades.
- Correlación entre las variantes y la resistencia a los medicamentos.
- Historia de la evolución de los patógenos y dispersión geográfica (filogeografía).
- Correlación entre las variantes genéticas y los ciclos de desarrollo; análisis de las interacciones entre los ciclos.

Especificar las preguntas a las cuales se pretende contestar con la epidemiología molecular permite definir el nivel de discriminación nece-

sario entre los individuos del patógeno estudiado. Puede ser necesario distinguir especies como en el caso de *T. cruzi* y *T. rangeli*, un parásito no patógeno del hombre que comparte la gran parte de sus huéspedes tanto mamíferos como vectores con *T. cruzi*. Conviene en muchos casos identificar las subdivisiones infra-especies sustentadas por los resultados filogenéticos pero, especialmente en caso de propagación clonal, la identificación de "individuos" o clones por marcadores de tipo finger-printing puede ser relevante para contestar a varias preguntas de epidemiología como la del estudio de los clones responsables de la enfermedad en el hombre, la identificación de los reservorios correspondientes o el estudio de las interacciones entre los ciclos de transmisión. Así, por ejemplo, varios trabajos han sido realizados para tratar de encontrar subgrupos o clones de la especie *Leishmania braziliensis*, responsable de formas clínicas diferentes de leishmaniasis, usando diferentes marcadores moleculares. Sin embargo, hoy en día, con los marcadores utilizados, solamente han sido encontradas leves asociaciones entre las formas clínicas de la enfermedad y el polimorfismo genético de poblaciones naturales de *L. braziliensis* (Cuervo *et al.*, 2004; Schrieffer *et al.*, 2004).

Una gran variedad de marcadores genéticos están disponibles para los estudios moleculares de *T. cruzi* y los parásitos del género *Leishmania* (RAPD, RFLP, microsatélites, "housekeeping genes", otros genes mitocondriales y genómicos). Cada marcador aporta informaciones diferentes según sus propiedades evolutivas (frecuencia de mutaciones, sometido a presión de selección o no) y no se pueden jerarquizar entre buenos y malos en cuanto a su beneficio en epidemiología. Las perspectivas del estudio son determinantes para la selección del marcador molecular más adecuado para contestar a una pregunta.

Referencias

- Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology* 29: 1137-1147.
- Cracraft J. 1989. Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En: D. Otte y J. A. Endler (eds.), *Speciation and its consequences*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., p. 28-59.
- Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. 2004. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology* 108: 59-66.

- Dobzhansky T. 1937. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogens 2: 226-236.
- Mayr E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Schriefer A, Schriefer ALF, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. Infection and Immunity 72: 508-514.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 5129-5133.
- Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics 171(2): 527-543.
- Wiley EO, Brooks DR, Siegel-Causey D, and Funk VA. 1991. The compleat cladist: A primer of phylogenetic procedures. Museum of Natural History, Lawrence, KA.

Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi* I

Felipe Guhl Nannetti^{1,3}, Claudia Herrera¹, Anabella Fajardo¹,
Alejandra Falla¹, Diana Acero¹, y Gustavo Vallejo²

Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, representa un grave problema de salud en las Américas (WHO, 2007). En busca de establecer correlaciones entre las características biológicas, epidemiológicas y del desarrollo clínico entre los diferentes aislamientos de *T. cruzi*, se han utilizado herramientas bioquímicas y moleculares que han permitido en los últimos años proponer diversas formas de agrupamiento (Miles *et al.*, 1980; Tibayrenc *et al.*, 1986; Souto *et al.*, 1996; Barnabe, C *et al.*, 2001; Montilla, M *et al.*, 2002; Anez, N *et al.*, 2004). Estudios de clasificación molecular de *T. cruzi* reportan dos grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, siendo este último subdividido en cinco subgrupos, *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId, IIe; basados en marcadores moleculares como la región intergénica del gen minixon y las subunidades ribosomales 18S y 24S α (Brisse *et al.*, 2000, 2003; Tibayrenc, 2003; Campbell, D.A *et al.*, 2004).

Aún se conoce muy poco sobre la variabilidad genética que se puede presentar en el grupo *T. cruzi* I (Herrera *et al.*, 2007), razón por la cual es importante dedicar esfuerzos para una mejor comprensión de los parásitos que están circulando con mayor frecuencia en los países del norte del continente americano.

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. Correspondencia: fguhl@uniandes.edu.co

² Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT). Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia.

³ Profesor Titular. Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes.

Este trabajo reúne estudios que confirman la existencia de subgrupos dentro del grupo *T. cruzi* I que circula en las áreas endémicas de transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia, así como su correlación con ciclos epidemiológicos particulares.

Materiales y métodos

Se caracterizaron 37 aislamientos de *T. cruzi* (Tabla 1) en los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, utilizando como marcadores moleculares la región intergénica del gen miniexon (Souto *et al.*, 1996), el dominio D7 de la subunidad 24S α y la subunidad 5.8S y los ITS I y II (Cupolillo *et al.*, 1995; Beltrame-Botelho *et al.*, 2005).

La secuenciación de las regiones amplificadas por la reacción de PCR fue realizada utilizando el reactivo ABI Prism™, dRhodamine Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), en un secuenciador automático ABI Prism 377 DNA (Perkin-Elmer).

Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias obtenidas, utilizando los programas Clustall W versión 1.8 y T-coffee versión 1.0 con los parámetros por defecto.

La edición y ensamblaje de las secuencias se realizó con los programas Staden Package versión 1.5, MEGA versión 3.0 y CLC Workbench. Se realizó la identificación de las secuencias obtenidas por el programa de búsqueda BLAST (<http://www.NCBI.NMLNIH.Gov/BLAST>).

A partir de las secuencias obtenidas, se diseñaron iniciadores específicos sobre regiones polimórficas de la región espaciadora del gen miniexón que amplificaron diferencialmente aislamientos pertenecientes a tres de los subgrupos propuestos (Ia, Ib y Id). El diseño se realizó en el programa Oligo versión 6.0, la especificidad se comprobó realizando un Megablast (Blastn) contra la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se utilizó la aplicación iPCR (http://www.ch.embnet.org/software/iPCR_form.html).

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando una máxima parsimonia y una máxima verosimilitud. El mejor modelo fue ajustado en Mr. Model test versión 2.2 (Posada & Crandall, 1998), utilizando el criterio informativo de Akaike (AIC) con el fin de adoptarlo en una búsqueda heurística en el algoritmo del programa PAUP versión 4.0b10. La robustez de los nodos se evaluó con un bootstrap de 1000 réplicas.

Tabla 1. Origen biológico y geográfico de los aislamientos de *Trypanosoma cruzi*. Caracterización molecular en los grupos *T. cruzi* I y II y subgrupos Ia, Ib y Ic.

Código Internacional	Origen Geográfico	Hospedero	Ciclo	Grupo	Sub-grupo
MHOM/CO/92/FcH	Tibú (Norte de Santander)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ib
MHOM/CO/00/MG	Saravena (Arauca)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/92/JL	Arauca	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ib
MHOM/CO/03/CG	Cartagena del Chairá (Caquetá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/00/JEM	Mocoa (Putumayo)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/00/SP	Yopal (Casanare)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ib
MHOM/CO/00/DA	Sutatenza (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/00/NV	Ortega (Tolima)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/07/EB	Moniquirá (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/07/EM	Moniquirá (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/Ano/JV	Chimichagua (Cesar)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ib
MHOM/CO/07/EB2da	Moniquirá (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/07/SEV	Miraflores (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/07/DYR	Miraflores (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	I	Ia
MHOM/CO/07/VS	Moniquirá (Boyacá)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	II	N
MDID/CO/00/Dm38	Tolima	<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	I	Id
MDID/CO/00/Dm28	Tolima	<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	I	Id
MDID/CO/00/Dm11	Tolima	<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	I	Id
MDID/CO/00/D12	Coyaima (Tolima)	<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	I	Id
MCAN/CO/00/H10	Soatá (Boyacá)	<i>Canis familiaris</i>	Peridoméstico	I	Ib
MCAN/CO/00/H105	Soatá (Boyacá)	<i>Canis familiaris</i>	Peridoméstico	I	Ib
XXXX/CO/91/Gal61	Galeras (Sucre)	<i>Roedor</i>	Silvestre	I	Id
IRHO/CO/00/380	Boyacá	<i>Rhodnius prolixus</i>	Doméstico	I	Id
IRHO/CO/00/SN8	SNSM (Magdalena)	<i>Rhodnius prolixus</i>	Doméstico	I	Ia
IRHO/CO/00/PAL	Villa Nueva (Casanare)	<i>Rhodnius prolixus</i> Silvestre	Silvestre	I	Id
IRHO/CO/00/Rp523	Casanare	<i>Rhodnius prolixus</i> Silvestre	Silvestre	I	Id
IRHO/CO/00/N5P14	Casanare	<i>Rhodnius prolixus</i> Silvestre	Silvestre	I	Id
IRHO/CO/00/Rp513	Casanare	<i>Rhodnius prolixus</i> Silvestre	Silvestre	I	Id
TPAC/CO/00/Necoclí	Necoclí (Antioquia)	<i>Rhodnius pallescens</i>	Silvestre	I	Ib
IRCOL/CO/00/Coy11	Coyaima (Tolima)	<i>Rhodnius colombiensis</i>	Silvestre	I	Id
TDIM/CO/00/Td11	Tolima	<i>Triatoma dimidiata</i>	Peridoméstico	I	Ib
TDIM/CO/00/Td	Valledupar (Cesar)	<i>Triatoma dimidiata</i>	Peridoméstico	I	Ib
TDIM/CO/00/Mg9	Antioquia	<i>Triatoma dimidiata</i>	Peridoméstico	I	Ib
TGEN/CO/98/AF1-CI7	Amalfi (Antioquia)	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Silvestre	II	N
TINF/CH/56/Tulahuen	Chile	<i>Triatoma infestans</i>	Doméstico	II	N
MDID/CO/00/Dm7	Coyaima (Tolima)	<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	I	Id
MHOM/Br/0000/Tc167	Minas Gerais (Brasil)	<i>Homo sapiens</i>	Doméstico	II	N

Resultados

La caracterización basada en los marcadores moleculares, región intergénica del gen minixon (Figura 1a), dominio 7 de la subunidad 24S α (Figura 1b) y la subunidad ribosomal 5.8S, ITS1 e ITS2 (Figura 1c), permitió una discriminación de los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II.

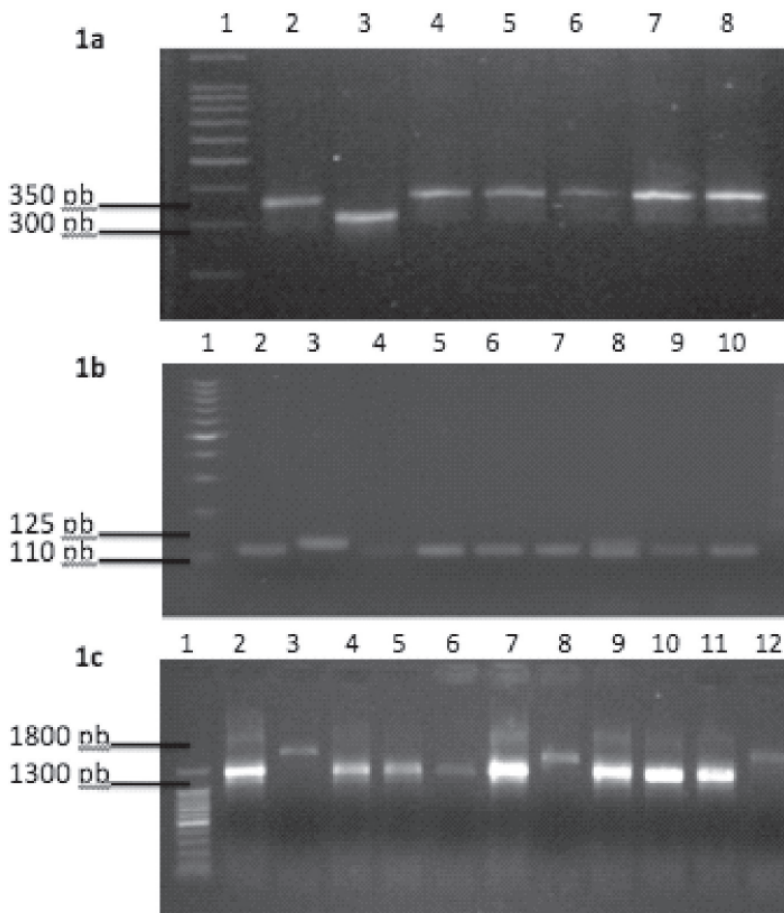


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **1a.** Productos de amplificación de la región intergénica del gen minixon. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (100pb), 2. Dm7, 3. AF1C17, 4. Td11, 5. FEC, 6. MSF1, 7. EE- Bebé, 8. EE- Mamá. **1b.** Productos de amplificación del Dominio D7 de la Subunidad ribosomal 24S α . Carriles: 1. Marcador de peso molecular (50pb), 2. Dm7, 3. AF1C17, 4. FCh, 5. MG, 6. JL, 7. CG, 8. JEM, 9. SP, 10. DA. **1c.** Productos de amplificación obtenidos con los iniciadores IR1 – IR2 (Subunidad ribosomal 5.8S, ITS1 e ITS2). Carriles: 1. Marcador de peso 100pb, 2. Dm7, 3. AF1C17, 4. SP, 5. DA, 6. Nv, 7. FEC, 8. YLY, 9. EE- Bebé 2da. Muestra, 10. MSF1, 11. EE-Bebé, 12. VS, 13. EE- Mamá, 14. Control negativo.

Los aislamientos colombianos fueron identificados claramente como *T. cruzi* I, los cuales mostraron una gran variabilidad genética intra-grupo, basados en la región intergénica del gen minixon, lo que permitió proponer la existencia de subgrupos dentro de *T. cruzi* I: Ia, Ib, Ic y Id, reportado por primera vez por Herrera y colaboradores en el 2007.

En este trabajo se han evaluado los subgrupos Ia, Ib y Id (Tabla 1 y Figura 1) y el subgrupo Ic continua en proceso de verificación.

El alineamiento conjunto de los aislamientos presentó una longitud de 327 pb, se observó una divergencia nucleotídica de 17,5% donde se encontraron 23 transiciones (7,2%), 14 transversiones (4,4%) y 19 inserción-delecciones (5,9%). En el alineamiento se encontraron 268 sitios constantes y 59 posiciones parsimoniamente informativas.

Análisis bioinformáticos permitieron diseñar iniciadores específicos sobre los polimorfismos que identifican a cada uno de los subgrupos. Para el diseño se utilizó el programa Oligo (v. 6.0), su especificidad fue evaluada a través de un Megablast (Blastn) basados en secuencias reportadas en Genbank y con la herramienta iPCR para evaluar la especificidad intragrupo. Se evaluaron las condiciones de amplificación en FastPCR (1998-2007 Windows) y se realizó la predicción de estructuras secundarias en MFOLD.

Los iniciadores diseñados brindan una herramienta molecular específica para identificación de los tres subgrupos de *T. cruzi* I, basados en la región intergénica del gen minixon.

Adicionalmente, se realizaron análisis filogenéticos de máxima parsimonia, máxima versimilitud, con 1000 réplicas para la obtención del bootstrap. Se obtuvo un árbol consenso con el cual fue posible observar la agrupación de los aislamientos en los tres subgrupos. Los valores significativos de bootstrap permitieron confirmar la asociación de los aislamientos (Figura 2). Así, el subgrupo Ia se ha relacionado con el domicilio y con la población de *Rhodnius prolixus*; el subgrupo Ib, con el ciclo doméstico y peridoméstico y con el vector *Triatoma dimidiata*; el subgrupo Ic es un grupo que se encuentra por definir: sin embargo, se ha asociado al peridomicilio; y finalmente, el subgrupo Id agrupa los aislamientos de origen silvestre (Figura 3).

La identificación específica de los subgrupos de *T. cruzi* I ofrece una herramienta esencial en los estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas.

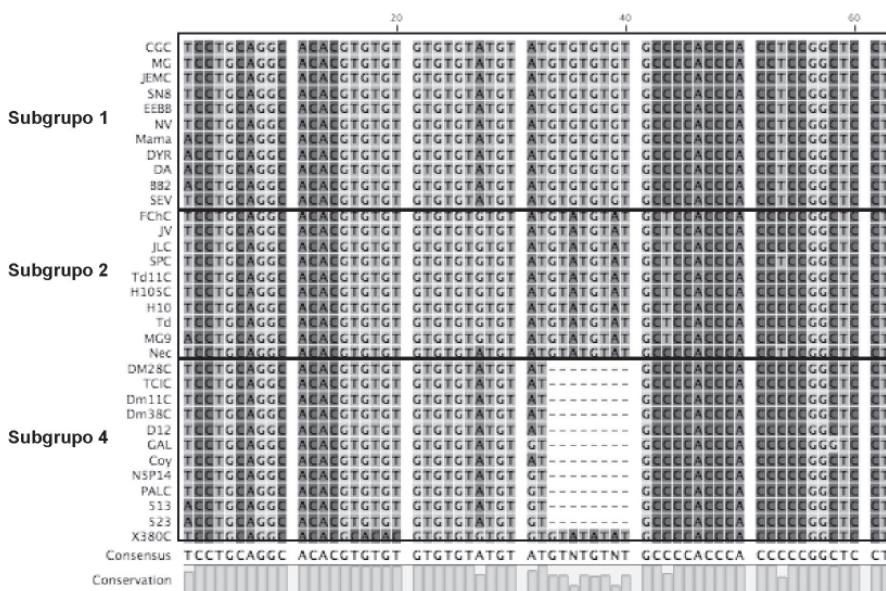


Figura 2. Alineamiento múltiple mostrando polimorfismos en una región microsatélite de 60 nucleótidos correspondiente a la región intergénica del gen minixon.

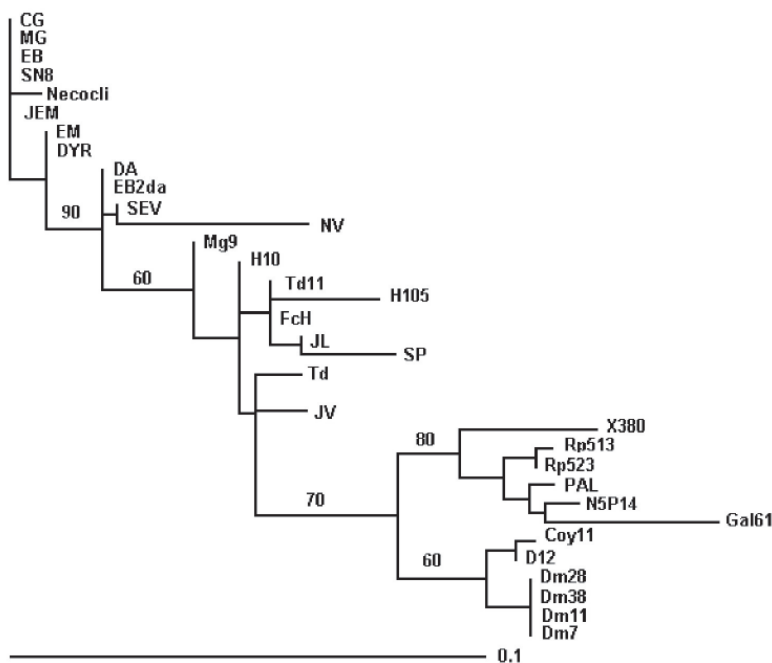


Figura 3. Filograma basado en máxima parsimonia y máxima verosimilitud de aislamientos colombianos de *T. cruzi* I (sometido a publicación en Acta Trópica).

Agradecimientos

Proyecto Colciencias Código: 1204-343-19188. Contrato 374-2006.

Proyecto CDIA No. ICA4-2003-10049 (DG XII, EC, Bruselas)

Proyecto Colciencias Código: 1109-04-18231 Grupo de Estudio de Chagas Congénita.

Referencias

- Anez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, Stolf AM, Ramirez JL, Teixeira MM. 2004. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health* 9: 1319-1326.
- Barnabe C, Neubauer K, Solari A, Tibayrenc M. 2001. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. *Acta Trop* 78: 127-137.
- Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Davila AMR, Grisard EC. 2005. Internal transcribed spacer (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect Genet Evol* 5: 17-28.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *111(1)*: 95-105.
- Brisse S, Henriksson J, Barnab C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2: 173-183.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4: 549-562.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. 2002. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *97(6)*: 877-880.
- Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley S. 1995. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 73: 145-155.

- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 58: 807-811.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 97-99.
- Gaunt M, Miles M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
- Guhl F, Restrepo M, Angulo VM, Antunes CMF, Campbell-Lendrum D, Davies CR. 2005. Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. *Trends Parasitol* 21(6): 259-262.
- Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. 2007. Distribución actualizada y ecoepidemiológica de la fauna de triatominos (Reduvidae: Triatominae) en Colombia y su importancia para los programas de control. *Biomédica*. In press.
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 7: 535-539.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1-12.
- Moncayo A. 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591.
- Montilla M, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabe C, Bosseno MF, Breniere SF. 2002. Isoenzyme clustering of *Trypanosomatidae* Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 66(4): 394-400.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabe C, Douzery EJ, Breniere SF. 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect Genet Evol* 7: 587-593.

- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Salazar A, Schijman AG, Triana-Chavez O. 2006. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Trop* 100: 110-118.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. 1999. The process of domestication in *Triatominae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 375-378.
- Sousa OE, Samudio F, de Junca C, Calzada JE. 2006. Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 455-457.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
- Swofford DL. 2002. PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 115-119.
- Tibayrenc M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 36: 47-115.
- Tibayrenc M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2: 12.
- Thomas S, Westenberger SJ, Campbell DA, Sturm NR. 2005. Intragenomic spliced leader RNA array analysis of kinetoplastids reveals unexpected transcribed region diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 352: 100-108.
- WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 2007. Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina.
- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. 1999. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 159-164.

COMENTARIO A LOS TRABAJOS DE LOS PROFESORES BRENIERE Y GUHL

La enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud en 17 países latinoamericanos, con un total estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 5 a 6 millones de individuos infectados y 25 millones en riesgo de contraer la enfermedad.

*En Colombia, se estima que alrededor del 5% de la población está infectada y cerca del 20% está bajo riesgo de adquirir la infección según la distribución geográfica de los insectos vectores. Así mismo, se ha establecido que el protozoo *Trypanosoma cruzi* se detecta con mayor frecuencia a lo largo del Valle del río Magdalena, la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el Piedemonte de los Llanos Orientales y la Serranía de la Macarena. Siendo los departamentos que presentan una mayor endemia: Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Arauca, Tolima y Bolívar (Guhl, 2004).*

Los resultados presentados permitirán conocer cuáles grupos y subgrupos del parásito están circulando con mayor frecuencia en Colombia, al igual que la relación entre sus características biológicas y el desarrollo dentro del curso de la enfermedad de Chagas.

Teniendo en cuenta el alto número de individuos infectados en Colombia, los resultados permitirán enfocar de forma más adecuada el tratamiento etiológico en la población de jóvenes (0-16 años) que habitan en las áreas endémicas del país.

*Hemos reportado la identificación de cuatro haplotipos de *T. cruzi* I circulando en algunas áreas geográficas del país. Este hecho reconoce la gran variabilidad genética de *T. cruzi*, mostrando la importancia de caracterizar las cepas circulantes en el país para instaurar protocolos de tratamiento adecuados.*

La OMS considera a la enfermedad de Chagas como la cuarta causa de discapacidad en América Latina, teniendo en cuenta el estimativo del número de años perdidos por discapacidad (AVADS). Al caracterizar y conocer mejor las cepas del parásito que se encuentran circulando en el país, se podrán establecer acciones de prevención del desarrollo de la cardiopatía chagásica, a través de protocolos de manejo más específicos para la población en riesgo. El impacto en la reducción del número de AVADS solamente se podrá medir a mediano y largo plazo, por lo cual se requiere de acciones de seguimiento permanentes a nivel de las autoridades de salud del país.

La enfermedad de Chagas se manifiesta con una gran variedad de formas clínicas, dentro de las que se encuentra una fase aguda donde se presenta una alta parasitemia y en la que se pueden presentar como manifestaciones iniciales el

signo de Romaña o el chagoma. Una fase crónica indeterminada sin síntomas que puede durar por el resto de la vida de la persona o que puede al cabo de 10 a 20 años pasar a ser la forma crónica en la que se presentan daños cardíacos o digestivos, afecciones que han sido asociadas a regiones geográficas (Botero & Restrepo, 2003; WHO, 2002).

El amplio rango de síntomas que pueden ocurrir en una infección con T. cruzi indica que la interacción entre el hospedero y el parásito es multifactorial, lo cual hace considerar como factor importante la variación genética tanto del hospedero como del parásito.

T. cruzi constituye una población multiclonal compleja que difieren en su genética, propiedades biológicas y en su comportamiento en el hospedero vertebrado.

En busca de establecer correlaciones entre las características biológicas, epidemiológicas y del desarrollo clínico entre los diferentes aislamientos de T. cruzi, se han utilizado herramientas bioquímicas y moleculares que han permitido a través de los años proponer diversas formas de agrupamiento que permiten descifrar y conocer los diferentes ciclos epidemiológicos del parásito, caracterizando aislamientos procedentes de diferentes hospederos, reservorios y vectores, aislados en diferentes áreas geográficas representativas de todo el país. Dentro de las áreas seleccionadas, están los departamentos de Boyacá, Casanare, Tolima, Arauca, Magdalena, Norte de Santander, Cesar, Putumayo, Vichada, Caquetá y Vaupés. Igualmente, se pretende ampliar el conocimiento acerca del comportamiento biológico de estas cepas y establecer si los diferentes actores del ciclo de vida del parásito pueden estar participando en la selección de algún tipo de T. cruzi.

Los resultados muestran una asociación clara entre la diversidad filogenética y la susceptibilidad a medicamentos, de tal forma que se ha encontrado que cepas pertenecientes al grupo T. cruzi I son resistentes a benznidazol (BNZ) y otros medicamentos, mientras que las cepas del grupo T. cruzi II son sensibles o parcialmente resistentes a BNZ.

Se espera que estos resultados y los que se obtengan en el futuro permitan un mejor conocimiento de las cepas que circulan en Colombia para ser correlacionados en estudios posteriores con la patogénesis de la enfermedad y así poder llegar a aplicarlos en programas de tratamiento etiológico en áreas endémicas del país, permitiendo que los recursos sean utilizados de una manera más eficiente y racional.

Desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina causada por *Taenia solium*

Ana Flisser¹

La *Taenia solium* y las enfermedades que ocasiona

Taenia solium pertenece al phylum Platyhelminthes, clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophillidea y familia Taeniidae. En la transmisión de este parásito participa el cerdo, que es el principal hospedero intermedio, porque alberga al cisticerco, y el ser humano, que es el único hospedero definitivo, porque aloja a la tenia intestinal. El parásito adulto es un gusano plano que mide de 2 a 4 m de largo. La tenia se desarrolla después de que una persona ingiere carne de cerdo que contiene cisticercos y que está cruda o poco cocida. La cabeza o escolex evagina y se adhiere a la mucosa del intestino delgado utilizando su doble corona de ganchos y las cuatro ventosas, que integran al rostelo. El cuello, que se continúa del escolex, forma de manera continua, segmentos o proglótidos que conforman el estróbilo. El escolex y el cuello tienen el tamaño de un alfiler, el estróbilo es como una cinta larga, plana y blanquecina. Los proglótidos pueden ser inmaduros, maduros o grávidos, y en ese orden se encuentran del cuello hacia el final del gusano. Los proglótidos maduros tienen órganos sexuales y son hermafroditas, los proglótidos grávidos contienen alrededor de 60.000 huevos cada uno. El portador de la solitaria intestinal libera de manera intermitente, uno o más proglótidos grávidos y huevos del parásito en la materia fecal. Los huevos son microscópicos; miden alrededor de 30 µm y cada uno contiene una oncosfera rodeada por una membrana oncosférica y un embrióforo que es resistente a las condiciones del medio ambiente. Cuando los seres humanos o los cerdos ingieren huevos, los jugos gástricos e intestinales disgregan los bloques embriofóricos, las larvas se liberan de la membrana oncosférica, se activan, atraviesan la mucosa del intestino delga-

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

do, circulan y se transforman en cisticercos visibles en alrededor de 3 a 4 meses (Figura 1). Los cisticercos se desarrollan principalmente en el sistema nervioso central, los ojos, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo. Existen dos tipos de cisticercos: los celulosos que miden 1-2 cm y son los

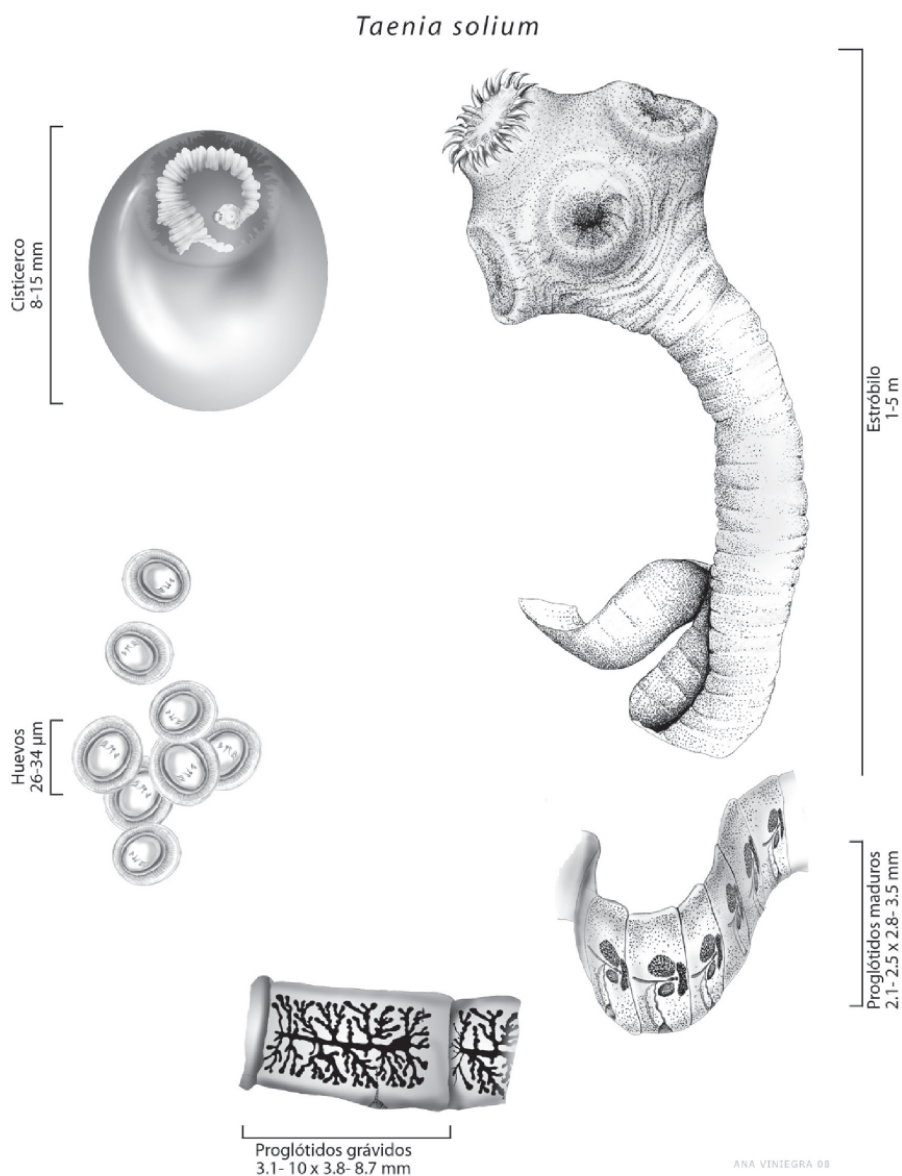


Figura 1. Morfología de *Taenia solium*.

más comunes, y los racemosos que miden hasta 10 cm o más y solamente se encuentran en la subaracnoides y los ventrículos del cerebro humano. Los cisticercos están formados por dos compartimentos, el interior que contiene al escolex y al canal espiral, y está rodeado por el compartimiento externo que contiene hasta 0, 5 ml de fluido vesicular; el tipo racemoso puede contener hasta 90 ml de líquido vesicular (Andreassen, 1999; Flisser, 1994; Flisser *et al.*, 1998, 2004; Rabiela *et al.*, 1982, 1989, 2000).

La neurocisticercosis (NCC) se asocia a sintomatología pleomórfica ya que se pueden presentar diversas manifestaciones clínicas inespecíficas; esto se debe al número, localización y grado de desarrollo o involución de los parásitos, así como al tipo e intensidad de la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, el signo más frecuente es la epilepsia o crisis convulsivas, que se presentan principalmente cuando los cisticercos se alojan en el parénquima cerebral y pueden ser controladas con drogas antiepilépticas. Los cisticercos extra-parenquimatosos pueden causar hidrocefalia por obstrucción mecánica de los ventrículos o de las cisternas basales por los mismos parásitos o por la reacción inflamatoria. Los cisticercos racemosos siguen un curso progresivo debido a su crecimiento, el cual produce manifestaciones de efecto de masa, compresión tisular, hidrocefalia, meningitis y aracnoiditis. En estos casos se requiere colocar una válvula que drene el líquido cefalorraquídeo de los ventrículos al peritoneo, aunque tanto los parásitos como las células inflamatorias y las proteínas pueden bloquear la válvula; los parásitos deben ser extirpados por cirugía. Además existen otras complicaciones debidas a la inflamación, al efecto de masa o a la cicatrización residual. Existen dos drogas cestocidas altamente eficientes: el prazicuantel y el albendazol, que ocasionan la muerte y destrucción de los parásitos debida a las células del sistema inmunitario. Por otro lado, la neurocirugía ha resurgido con el uso de técnicas de endoscopia para extraer cisticercos, principalmente aquellos localizados en el sistema ventricular. Los aspectos patológicos de la NCC, tanto en seres humanos como en cerdos, muestran varias etapas en el desarrollo de los parásitos. La etapa encefalítica se asocia a una reacción inflamatoria focal con edema cerebral local que puede producir dolores de cabeza y en algunos casos, crisis convulsivas focales. La etapa quística se debe a cisticercos viables, que han evadido la respuesta inmune del hospedero y que tienen la pared vesicular delgada y transparente, contienen fluido claro y prácticamente no hay evidencia de que haya inflamación rodeándolos. La etapa de degeneración parcial se puede deber a la historia natural de los parásitos, a que pierden la habilidad para controlar la respuesta inmune del hospedero o al efecto del tratamiento cestocida. En esta etapa el parásito ya no es viable, su tegumento se engrosa y se observa como membranas hialinizadas, el fluido vesicular se vuelve viscoso, además se incrementa el proceso inflamatorio hasta que se genera una calcificación o un granuloma terminal (Aluja &

Vargas, 1988; Aluja *et al.*, 1989, 1998; Álvarez *et al.*, 2002a, 2002b; Escobar & Weidenheim, 2002; Escobedo *et al.*, 2000; Flisser, 1994; 2005; Flisser *et al.*, 1998, 2002; García & Del Brutto, 2002; Gonzalez *et al.*, 1987; Medina-Escutia *et al.*, 2001; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 1996; Rabiela *et al.*, 1982, 1989; Restrepo *et al.*, 2001a, 2001b; Sotelo & Del Brutto, 2000).

En contraste con la NCC, la teniosis ha sido muy poco estudiada, la información que existe se refiere principalmente a aspectos clínicos, diagnósticos y de tratamiento y, en gran medida, se refiere a datos de *Taenia saginata*. Sobresale el hecho de que la teniosis causada por *T. solium* es benigna y frecuentemente asintomática, por lo que es difícil identificar a los portadores. Sin embargo, la percepción de que la tenia es un hospedero silencioso que no causa daño al ser humano debe considerarse errónea, ya que los portadores de tenia deben visualizarse como fuentes potenciales de contagio a ellos mismos y a aquellos que viven en el ambiente cercano (Andreassen, 1999; Flisser, 1995, 2006; Flisser *et al.*, 2004; Gilman *et al.*, 2000; Jeri *et al.*, 2004; Thornton, 1979).

El control de la *Taenia solium*

La cisticercosis humana es un problema de salud pública en México y en varios países en vías de desarrollo y en la actualidad se informan casos en naciones del primer mundo, como EUA, debido a la facilidad para la migración y el turismo (Flisser, 2002a, 2004; Hira *et al.*, 2004; Phiri *et al.*, 2003; Rajshekhar *et al.*, 2003; Schantz *et al.*, 1989; Zoli *et al.*, 2003). Varios países de América Latina fueron pioneros en la descripción de NCC, por el estudio detallado de autopsias. Se informó que alrededor del 2% de los cerebros sometidos a estudio patológico en México y Brasil tenía cisticercos, y alrededor del 0, 5% en Chile y Colombia. A partir de la década de 1970, con el desarrollo de técnicas modernas de diagnóstico inmunológico, como el ELISA y el western blot (WB), y las técnicas de imagen, tomografía computada y resonancia magnética, se ha facilitado la identificación de los cisticercos y la confirmación de la NCC. Durante esa década también se evaluó por primera vez a escala mundial en México, Colombia y Corea, la eficiencia del prazicuantel como droga cestocida, y posteriormente del albendazol, con los cuales el manejo terapéutico de la NCC ha mejorado mucho (Flisser 1994, 2002a; Flisser *et al.*, 1998; Flisser & Gyorkos, 2007; García & Del Brutto, 2000; López-Gómez *et al.*, 2001; Sotelo & Del Brutto, 2000; Schenone *et al.*, 1982).

A partir del desarrollo del ELISA y del WB se realizaron estudios de campo para conocer la prevalencia de cisticercosis en población abierta e identificar factores de riesgo para adquirir cisticercosis. La frecuencia de

personas con anticuerpos anticisticerco varía del 5 al 15% y la de personas con huevos o antígenos de tenia en heces, del 0, 5 al 2%; la cisticercosis porcina, detectada por la presencia de cisticercos en lengua o anticuerpos séricos por WB es alrededor del 5% en México, pero llega a 50% en Perú. Los factores de riesgo que se identificaron asociados a la seropositividad son: historia de desalojar proglótidos, consumo frecuente de carne de cerdo, higiene personal y habitacional mala e historia de convulsiones. Las personas seropositivas se agrupan significativamente en casas, especialmente en aquellas en las que un miembro informó haber desalojado proglótidos en el pasado o que tuviera un estudio coproparasitológico positivo para huevos de *Taenia*. La cisticercosis porcina se asocia con dejar a los cerdos deambulando libremente y usar deliberadamente el chiquero como baño. Los resultados de estos estudios han mostrado reiteradamente que el principal factor de riesgo de adquirir cisticercosis es la presencia de un portador de tenia en el entorno cercano. Este hallazgo cambia el concepto de control, ahora enfocado a los portadores del parásito intestinal. En estudios de campo se demostró que la educación para la salud es altamente eficaz para el control de la cisticercosis, especialmente cuando se enfoca a la promoción del autodiagnóstico de la teniosis y, en menor grado, el tratamiento masivo contra la teniosis (Flisser 2002a, 2002b; Flisser *et al.*, 1998; 2006; Flisser & Gyorkos, 2007). Además el control de la cisticercosis porcina, promovido por la educación para la salud, se puede fortalecer con la vacunación de cerdos.

Las vacunas recombinantes contra la cisticercosis porcina

En vista de que existen varias especies de *Taenia* que infectan a otros mamíferos, se han realizado múltiples estudios en roedores, caprinos y bovinos para demostrar que es posible adquirir protección contra cisticercosis por medio de vacunación. En la mayoría de los estudios se utilizaron antígenos crudos obtenidos de oncosferas, cisticercos o parásitos adultos. Estos estudios han sido relativamente fáciles de llevar a cabo, ya que las diferentes etapas del parásito (cisticercos y adultos) se desarrollan en animales, y por tanto es factible mantener a los hospederos experimentales infectados para ser usados según las necesidades de la investigación. Se han informado diversos grados de protección y se demostró que las oncosferas vivas o los antígenos oncosferales son los más eficaces (Flisser *et al.*, 1979; Lightowlers, 2006; Lightowlers *et al.*, 2000; Rickard & Williams, 1982).

De especial interés fue el desarrollo de vacunas muy efectivas en contra de las cisticercosis causadas por *Taenia ovis* y por *T. saginata* en ganado ovino y bovino respectivamente, basadas en antígenos recombinantes de la

oncosfera (Harrison *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1989; Lightowlers *et al.*, 1996). Se realizó un ensayo de vacunación en cerdos con la vacuna recombinante de *T. ovis* 45w, 16k, 18k; como testigo positivo se inmunizaron cerdos con un extracto crudo preparado con oncosferas de *T. solium*. Para esto se obtuvieron cerdos York Landrace de una granja libre de cisticercosis y se organizaron grupos de cinco animales cada uno; un grupo se vacunó con 200 ug de la vacuna recombinante de *T. ovis* mezclada con saponina como adyuvante (Quil A), otro grupo recibió 200 ug del antígeno oncosférico de *T. solium* en adyuvante incompleto de Freund (AIF), un grupo testigo fue vacunado con Quil A y el otro con AIF. Se realizaron dos inmunizaciones intramusculares con 15 días de separación, y 15 días después todos los cerdos se infectaron por vía oral con 25.000 huevos de *T. solium* cada uno, obtenidos, 24 horas antes, de un portador de una *T. solium* intestinal. Entre tres y cuatro meses después del reto, se sacrificaron los cerdos bajo condiciones éticas. Se revisó toda la musculatura de cada animal en cortes finos para asegurar que cualquier cisticercos presente fuera encontrado y cuantificado. Se registró el número de parásitos viables, considerados como aquellos cisticercos que eran transparentes y tuvieran su vesícula llena de fluido; o como calcificados, cuando la apariencia era de un grano de arroz. El cuadro 1 muestra el número de cisticercos viables y calcificados obtenidos en cada cerdo. El grado de protección se calculó de la proporción de cisticercos encontrados en el grupo experimental en comparación con su respectivo grupo testigo. Como se podrá ver, se obtuvieron altos niveles de protección tanto con el antígeno oncosférico como con el antígeno recombinante (*T. ovis* 45w, 16k, 18k), ya que en el primer caso hubo 16 cisticercos viables en el grupo experimental en comparación con 126 en su grupo testigo, lo que da 83% de protección en contra de parásitos viables y 89% en contra de cisticercos totales, mientras que en el grupo vacunado con el antígeno recombinante hubo en promedio solo siete parásitos viables en comparación con 68 en el grupo testigo, lo

Cuadro 1. Resultados del ensayo de protección en contra de *Taenia solium* en cerdos usando el antígeno recombinante heterólogo.

Antígeno	Adyuvante	Edo	Cisticercos por cerdo						X	CV	C totales
Sin	Incompleto de Freund	CV	3	48	176	182	219	126			
		CC	47	73	0	2	111	47			
Sin	Quil A	CV	0	0	1	230	107	68			
		CC	5	20	24	7	270	65			
Oncosferas de	Incompleto	CV	0	1	16	25	38	16	83%	89%	
<i>Taenia solium</i>	de Freund	CC	0	0	0	0	0	0			
<i>Taenia ovis</i> 45w, 18 y 16	Quil A	CV	2	0	0	32	0	7	93%	78%	
		CC	12	17	37	25	72	33			

Edo: estado de los cisticercos. CV: cisticercos viables. CC: cisticercos calcificados. X: promedio.

que da 93% de protección en contra de cisticercos viables (Plancarte *et al.*, 1999). Este valor es muy alto considerando que se utilizó para vacunar un antígeno heterólogo y que el fin de una vacuna es no permitir el desarrollo de ningún cisticerco o que, por lo menos, ningún cisticerco se mantenga viable. Llama la atención que ambos tipos de vacunas probablemente indujeron respuestas inmunitarias diferentes, ya que con la vacuna elaborada con proteínas homólogas (antígenos oncosferales) no se encontraron parásitos calcificados, lo que sugiere que algunos cisticercos sobrepasan la respuesta inmunitaria y se desarrollan y continúan viables. En contraste, con la vacuna recombinante heteróloga, algunos parásitos, aunque sobrepasaron la respuesta inmunitaria y se transformaron en cisticercos, fueron finalmente destruidos por esta respuesta, quedando como calcificaciones.

Estos resultados fueron muy alentadores, por lo que a partir de los genes de estas especies se identificó a los genes homólogos en *T. solium* para realizar ensayos de vacunación en cerdos. Se encontró un alto nivel de homología en la predicción de la secuencia de aminoácidos de *T. ovis* y *T. saginata* con su antígeno en *T. solium* (Figura 2, Gauci *et al.*, 1998; Gauci & Lightowlers, 2001), indicando que los antígenos recombinantes de *T. solium* son buenos candidatos para vacunar cerdos. Por lo tanto se preparó una genoteca de mRNA de oncosferas de *T. solium* eclosionadas y activadas, y se identificó el DNA homólogo recombinante utilizando las sondas 18k y 45k de *T. ovis*; los fragmentos de DNA se purificaron, clonaron y expresaron en *E. coli* (TSOL18 y TSOL45) y se utilizaron en dos ensayos independientes de vacunación en cerdos (Flisser *et al.*, 2004). La primera evaluación se llevó a cabo en el año 2000 y la segunda en el 2002. Cada cerdo fue inmunizado por vía

TSOL-18	MVCRFALIFL	VAVV-LASGD	RTFGDDIFVP	YLRCFALSAT	EIGVFWDAGE	NVCHGVEEIK	60
TO-18	---.G..L.	-....G	.NP.KRSI..	.I.....RNE	R.A.V..TKD	.A.YD.KK.E	
TSA-18	---.G..L.	V...DG	QNS.KRSI..	.I.....I.TD	R.A.V..PKD	.A.YD.KNV.	
TSOL-18	VKVEKAHPY	KIWNATVSAN	NGKVIIRDLLK	AKTIYRVDVD	GYRNEYNVFG	SCRFATTLPK	120
TO-18	.T....D.H	.T..T...VD	NSG..	.N....G.N	DF....	.E..V...S.	
TSA-18	.N....E.R	.T.TS...VD	N....	.N.T.....	DF....	.E..VK.PS.	
TSOL-18	KQIKHKKVRR	S*					
TO-18	.KT.SR.A.G	L*					
TSA-18	.KT.SR....	L*					

Figura 2. Predicción de aminoácidos de la proteína recombinante 18 de *Taenia solium* (TSOL-18), *Taenia ovis* (TO-18) y *Taenia saginata* (TSA-18).

intramuscular con 200ug de TSOL18 o de TSOL45-1A cuyo acarreador fue la glutatión S transferasa (GST) y como adyuvante, se utilizó 1mg de Quil A. Las inmunizaciones se hicieron cada 15 días, en el primer experimento se repitieron en dos ocasiones y en el segundo se usaron tres inmunizaciones. Para el reto se obtuvieron proglótidos grávidos, eliminados de portadores que fueron tratados con prazicuantel o con niclosamida, los segmentos se cortaron finamente y los huevos se obtuvieron por tamizaje a través de una malla metálica fina, se lavaron por centrifugación, se cuantificaron en una cámara de Neubauer y se colocaron en cápsulas de gelatina. A cada cerdo se le introdujeron por vía oral 40.000 huevos en el primer experimento y 9.000 en el segundo. Se realizaron las necropsias siguiendo normas éticas para el manejo de animales de experimentación. Se obtuvo toda la masa muscular de cada cerdo y con un bisturí se cortaron secciones muy delgadas de carne para poder determinar el número y estado de viabilidad aparente de cada cisticerco. El cuadro 2 muestra los resultados de ambos ensayos de vacunación. La protección se calculó como el porcentaje de reducción de la media del número de cisticercos en el grupo experimental en comparación con la media del número de cisticercos en el grupo testigo (GST). Como se puede ver en el cuadro 2, en ambos experimentos TSOL18 generó protección prácticamente completa (100% y 99, 5%), mientras que TSOL45-1A solo produjo un alto nivel de protección en el segundo experimento (97, 6%), probablemente porque en el primer experimento la vacuna o el procedimiento de vacunación falló (Flisser *et al.*, 2004). Al comparar el número de cisticercos desarrollados en animales no inmunizados en relación con el número de huevos utilizados para la infección, la proporción fue en promedio 0, 55%, que es similar a la obtenida en otros parásitos del mismo grupo filogenético (ver adelante). Estas vacunas, además de ser altamente eficientes, son muy reproducibles, ya que se realizaron experimentos en México, Camerún y Perú con resultados similares (Flisser *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo deben aun ser

Cuadro 2. Resultados de los ensayos de protección en contra de *Taenia solium* en cerdos usando antígenos recombinantes homólogos.

Antígeno	Cisticercos por cerdo						X	Protección
Experimento 1, infección con 40,000 huevos por cerdo								
GST	167	206	234	262	415	ND	257	
TSOL 18	0	0	0	0	0	ND	0	100%
TSOL45-1A	28	51	151	193	258	ND	136	53%
Experimento 2, infección con 9,000 huevos por cerdo								
SSA	11	13	26	59	64	127	42	
GST	6	10	17	28	40	100		
TSOL 18	0	0	0	0	1	ND	0.2	99.5%
TSOL45-1A	0	0	0	0	6	ND	1.2	97.1%

GST: glutatión S transferasa. SSA: solución salina amortiguada.

confirmados en estudios de campo que se están realizando en la actualidad en estos tres países.

Aunado a la vacunación de la TSOL18 y TSOL45-1A se evaluó la respuesta inmunitaria humoral de los cerdos en contra del antígeno que se usa para el diagnóstico de cisticercosis y que corresponde a una fracción enriquecida en glicoproteínas (Tsang *et al.*, 1989); todos los cerdos del grupo testigo reconocieron a este antígeno pero ninguno de los cerdos que habían sido inmunizados desarrolló anticuerpos; esto sugiere que las vacunas TSOL18 y TSOL45-1A son específicas de oncosferas, ratificando el hallazgo de que los antígenos oncosferales constituyen las mejores vacunas. Esta discriminación serológica puede ser muy importante en evaluaciones epidemiológicas futuras para distinguir cerdos infectados de aquellos que fueron vacunados con TSOL18 y/o TSOL45-1A. En cambio la respuesta inmunitaria en contra de los antígenos vacunales solo se detectó en el grupo de animales inmunizados y mostró títulos altos en ELISA, los cuales disminuyeron a lo largo del tiempo (Flisser *et al.*, 2004). Los sueros de los cerdos vacunados permitieron demostrar que hay un epítipo linear en TSOL18 y dos en TSOL45-1A. Estos epítipos, como los de otros taenidos, contienen un motivo secuencial de la proteína cuya estructura terciaria es similar a un dominio de la fibronectina tipo III (FnIII). La localización de estos epítipos lineares en TSOL18 y en TSOL45-1A, dentro de la estructura FnIII propuesta, muestra que su posición se conserva en los antígenos vacunales de diferentes especies de taenidos (Kyngdon *et al.*, 2006). Por lo tanto, el dominio FnIII identifica a un grupo de proteínas ubicuas entre organismos eucariotes que también incluye proteínas asociadas con la matriz extracelular y con funciones de adhesión. Las proteínas que contienen el dominio FnIII incluyen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, moléculas de adhesión celular, receptores de superficie celular y proteínas de unión a carbohidratos (Lightowlers *et al.*, 2000).

Otras vacunas contra la cisticercosis porcina

Realizar estudios de vacunación contra *Taenia solium* implica tener accesible un número suficiente de huevos para el reto de los animales inmunizados, huevos que sólo se pueden obtener de seres humanos con teniosis. Probablemente esta ha sido la mayor dificultad para efectuar dichos estudios y la razón por la que hay tan pocas publicaciones al respecto (Herbert & Oberg, 1974; Molinari *et al.*, 1983; Kumar *et al.*, 1987; Nascimento *et al.*, 1995; Manoutcharian *et al.*, 1996; Phatak & Gaur, 1990; Plancarte *et al.*, 1999; Flisser & Lightowlers, 2000; Huerta *et al.*, 2002; Flisser *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos por diferentes

autores en diversos experimentos realizados con el propósito de definir si es posible proteger a cerdos contra un reto oral con huevos de *T. solium* se resumen en el cuadro 3. En el cuadro se incluye el primer autor y año de la publicación, el tipo de vacuna evaluada, el número de cerdos usados como testigo y en el grupo vacunado, el número de huevos de *T. solium* utilizados para retar a los animales, el promedio del número de cisticercos obtenidos por grupo, el porcentaje de infección, que se obtuvo de la proporción de cisticercos obtenidos con respecto al número de huevos admi-

Cuadro 3. Resultados de la vacunación de cerdos contra *Taenia solium*.

Autor/Año	Vacuna	No. Cerdos	No. Huevos	No. promedio de cisticercos	% Infección	% Protección
Herbert/1974	Testigo	3	4,300	146	3.40	
	Segunda dosis de huevos	4	3,900	5	0.13	96.6
Molinari/1983	Testigo	5	8,400	79	0.94	
	Extracto crudo	6	8,400	12	0.14	84.8
Kumar/1987	Testigo	4	15,000	250	1.67	
	2º pico de sefarosa	4	15,000	56	0.37	77.6
	1º pico de sefarosa	4	15,000	6	0.04	97.6
Pathak/1990	Testigo	8	15,000	369	2.46	
	E/S de oncosferas	8	15,000	19	0.13	94.9
Nascimento/1995	Testigo	4	10,000	926	9.26	
	Extracto de escolex	7	10,000	324	3.24	65.0
Manoutcharian/1996	Testigo	6	10,000	5	0.05	
	Fluido vesicular	7	10,000	3	0.03	40.0
	Bandas de gel	6	10,000	0.2	0.002	96.0
Plancarte/1999	Testigo	5	25,000	172	0.69	
	<i>T.ovis</i> recombinante	5	25,000	39	0.16	77.3
	Extracto de oncosferas	5	25,000	16	0.06	90.7
Huerta/2002	Testigo	120	en campo	66,565	No definible	
	Péptidos sintéticos	120	en campo	1,365	No definible	97.9
Flisser/2004	Testigo	12	9,000	42	0.47	
	TSOL18 recombinante	5	9,000	0.2	0.002	99.5
	TSOL45 recombinante	5	9,000	1	0.011	97.6
	Testigo	5	40,000	257	0.64	
	TSOL18 recombinante	5	40,000	0	0.000	100.0
	TSOL45 recombinante	5	40,000	136	0.34	47.1
	TSOL18+45 recombinante*	5	40,000	14	0.04	94.6
Gonzalez/2005	Testigo	10	1 proglótido por cerdo	1634	ND	
	TSOL18 Recombinante	8	1 proglótido por cerdo	0.5	ND	99.9
	TSOL45 Recombinante	8	1 proglótido por cerdo	22.3	ND	98.6

* Experimento realizado en Camerún.

nistrados y el porcentaje de protección, que se obtuvo del número de cisticercos obtenidos en los animales inmunizados frente a los obtenidos en los animales testigo. Como se puede observar, se han usado diversos antígenos para vacunar; en un primer experimento se utilizaron dos dosis de huevos de *T. solium*, en tanto que en los otros trabajos se emplearon extractos crudos de cisticercos o de oncosferas de *T. solium*, picos de la purificación del extracto en cromatografía con sefarosa, líquido vesicular de *T. crassiceps* o las bandas correspondientes a las proteínas de 56, 66 y 74 kDa de este fluido. Un parteaguas en la búsqueda de una vacuna fue la aplicación de tecnología de vanguardia usando antígenos sintéticos (GK-1, KETc1/p y KETc12/p) o proteínas recombinantes oncosferales (TSOL18 y TSOL45-1A). El cuadro 3 muestra que la eficiencia de la vacunación contra la cisticercosis porcina en la mayoría de los experimentos es mayor del 90%; sin embargo, la obtención de extractos totales, productos de secreción/excreción y proteínas purificadas por cromatografía es poco reproducible, no así las proteínas sintéticas y las recombinantes. Si se analizan las dos últimas columnas del cuadro, se puede observar que los porcentajes de infección en cerdos no vacunados en la mayor parte de los casos son cercanos al 1%, dato similar al obtenido en el análisis de múltiples estudios realizados con diferentes especies de *Taenia* en diversos modelos experimentales de cisticercosis animal para hospederos no vacunados (Flisser *et al.*, 1979). Los valores correspondientes a los grupos vacunados, siempre son más bajos y están en el rango de 0, 3%, valor calculado, en el estudio publicado en 1979, para hospederos vacunados, lo que sugiere que, en general, la inmunización de cerdos ha sido exitosa. Estos datos son de gran importancia porque además indican que la reproducibilidad de las condiciones naturales de la infección, salvo algunas excepciones, es adecuada, y por tanto los datos experimentales son válidos.

Conclusión

Los estudios descritos en este texto indican que las perspectivas a corto plazo con respecto a la producción de una vacuna óptima, tanto en eficacia como en composición, contra la cisticercosis porcina, son muy alentadoras. Además los ensayos de vacunación realizados a lo largo de 20 años que fueron revisados en este trabajo, muestran un flujo en dirección de la biotecnología moderna para el control de la *Taenia solium* y obligan a la producción, en gran escala y a corto plazo, de una vacuna óptima para uso en cerdos. Probablemente la combinación de tratamiento de portadores del parásito adulto intestinal aunada a la vacunación de cerdos, principalmente en poblaciones rurales, permitirá controlar la *Taenia solium* y con esto eliminar la neurocisticercosis humana.

Referencias

- Aluja AD, Martínez JJ, Villalobos ANM. 1998. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics Vet Parasitol 76: 71-79.
- Aluja AS, González D, Rodríguez-Carbajal J, Flisser A. 1989. Histological description of tomographic images of *Taenia solium* cysticerci in pig brains. Clin Imaging 13: 292-298.
- Aluja AS, Vargas G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. Vet Parasitol 28: 65-77.
- Álvarez JI, Colegial CH, Castaño CA, Trujillo J, Teale JM, Restrep BI. 2002a. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. J Neuroimmunol 127: 139-144.
- Álvarez JI, Londoño DP, Álvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. 2002b. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis J Comp Path 127: 186-193.
- Andreassen J. 1998. Intestinal tapeworms, in Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. (eds). Arnold, London. Vol. 5, Cap. 27. 521-537.
- Escobar A, Weidenheim K. 2002. The pathology of neurocysticercosis. En: *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. G Singh, S Prabhakar (eds) CABI Publ UK, p. 289-305.
- Escobedo F, Gómez-Aviña A, Ruiz-González S. 2000. Neurosurgical aspects of neurocysticercosis. En: Operative neurosurgical techniques, Schmidek HH. (ed). Vol 2, 4ta ed, WB Saunders Co, EUA, p. 1756-1768.
- Flisser A, Correa D, Evans CAW. 2002. *Taenia solium* cysticercosis: new and revisited immunological aspects. In Singh G, Prabhakar S (eds), *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. CABI Publ UK. 15-24.
- Flisser A, Gauci CG, Martinez-Ocaña J, Zoli A, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowlers MW, 2004. Protection against porcine cysticercosis induced by vaccination with recombinant oncosphere antigens. Infect Immun 72: 5292-5297.
- Flisser A, Gyorkos T. 2007. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. Parasite Immunol 29: 637-649.

- Flisser A, Lightowlers MW. 2000. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 353-356.
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1998. Cisticercosis humana. El Manual Moderno, México, DF, 176 pp.
- Flisser A, Pérez-Montfort R, Larralde C, 1979. The immunology of human and animal cysticercosis. A review. Bull WHO 57: 839-856.
- Flisser A, Rivera L, Trueba J, Espinoza B, Yakoleff-Greenhouse V, Sierra A, Larralde C. 1982. Immunology of human neurocysticercosis. In Flisser A, Willms K, Laclette JP, et al. (eds.) Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, New York, USA pp. 549-563.
- Flisser A, Viniegra AE, Aguilar-Vega L, Garza-Rodriguez A, Maravilla P, Avila G. 2004. Portrait of human tapeworms. J Parasitol 90: 914-916.
- Flisser A, Vázquez-Mendoza A, Martínez-Ocaña J, Gómez-Colín E, Sánchez Leyva R, Medina-Santillán R. 2005. Evaluation of a self-detection tool for tapeworm carriers for use in public health. Am J Trop Med Hyg 72: 510-512.
- Flisser A. 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Progress in Clinical Parasitology. T Sun (ed). CRC Press, Boca Raton Florida, 4: 77-116.
- Flisser A. 1995. *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. In: Enteric infections 2: Intestinal Helminths. Farthing MJG, Keusch GT, Walekin D. (eds). Chapman and Hall Medical, London. 173-189.
- Flisser A. 2002a. Epidemiological studies of taeniosis and cysticercosis in Latin America. In: Cestode Zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem. Craig P and Pawlowski Z, eds. IOS Press, NATO Science Series. Vol 341. Amsterdam. p. 3-11.
- Flisser A. 2002b. Risk factors and control measures for taeniosis/ cysticercosis. In: Cestode Zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem. Craig P and Pawlowski Z, eds. IOS Press, NATO Science Series. Vol 341. Amsterdam. p. 335-342.
- Flisser A. 2005. La reacción inflamatoria generada por el céstodo *Taenia solium*, en: Roberto Kretschmer, In Memoriam. Ruy Pérez Tamayo (ed). Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, pp. 97-106.
- Flisser A. 2006. Where are the tapeworms? Parasitol Intl 55: S117-S120.
- García HH, Del Brutto O. 2000. *Taenia solium* cysticercosis. Infect Dis Clin N Am 14: 97-119.
- Gauci CG, Flisser A, Lightowlers MW. 1998. *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18kDa antigens. Intl. J Parasitol 28: 757-760.

- Gauci CG, Lightowlers MW. 2001. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. *Mol Bioch Parasitol* 112: 173-181.
- Gilman RH, Del Brutto OH, Garcia HH, Martínez M, and the cysticercosis working group in Peru. 2000. Prevalence of taeniosis among patients with neurocysticercosis is related to severity of infection. *Neurology* 55: 1062.
- Gonzalez AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, Verastegui M, Lightowlers MW. 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 72: 837-839.
- González D, Rodríguez-Carbajal J, Aluja A, Flisser A. 1987. Cerebral cysticercosis in pigs studied by computed tomography and necropsy. *Vet Parasitol* 26: 55-69.
- Harrison GBL, Shakes TR, Robinson CM, Lawrence SB, Heath DD, Dempster RP, Lightowlers MW, Rickard MD. 1999. Duration of immunity, efficacy and safety of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulation with saponin or selected adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 70: 161-172.
- Herbert IV, Oberg C. 1974. Cysticercosis in pigs due to infection with *Taenia solium* Linnaeus, 1758. In Soulsby EJJ (ed), *Parasitic Zoonosis*, Academic Press, New York, p. 199-211.
- Hira PR, Francis I, Abdella NA, Gupta R, Ai-Ali FM, Grover S, Khalid N, Abdeen S, Iqbal J, Wilson M, Tsang VCW. 2004. Cysticercosis: imported and autochthonous infections in Kuwait. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 233-239.
- Huerta M, Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, Gevorkian G, Acero G, Díaz A, Álvarez I, Ávila R, Beltrán C, García G, Martínez JJ, Larralde C, Sciutto E. 2002. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 30: 262-266.
- Jeri C, Gilman RH, Lescano AG, Mayta H, Ramirez ME, Gonzalez AE, Nazerali R, Garcia HH. 2004. Species diagnosis after treatment for human taeniasis. *Lancet* 363: 949-950.
- Johnson KS, Harrison GBL, Lightowlers MW, O'Hoy KL, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD, Rickard MD. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 338: 585-587.
- Kumar D, Gaur SNS, Pathak ML. 1987. Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of *Cysticercus cellulosae* scolex antigen. *Indian J Anim Sci* 57: 932-935.

- Kyngdon CT, Gauci CG, Gonzalez AE, Flisser A, Zoli A, Read A, Martinez-Ocaña J, Strugnell RA, Lightowlers MW. 2006. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. *Parasite Immunol* 28: 191-199.
- Lawrence SB, Heath DD, Harrison GBL, Robinson CM, Dempster RP, Lightowlers MW, Rickard MD. 1996. Pilot field trial of a recombinant *Taenia ovis* vaccine in lambs exposed to natural infection. *New Zealand Vet J* 44: 155-157.
- Lightowlers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, Rolfe R. 2000. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today* 16: 191-196.
- Lightowlers MW, Rolfe R, Gaucchi CG. 1996. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp Parasitol* 84: 330-338.
- Lightowlers MW. 1999. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Intl J Parasitol* 29: 811-817.
- Lightowlers MW. 2006. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int* 55: S30-S43.
- López-Gómez M, Castro N, Jung H, Sotelo J, Corona T. 2001. Optimization of the single-day-praziquantel therapy for neurocysticercosis. *Neurology* 57: 1029-1030.
- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 82: 250-254.
- Medina-Escutia E, Morales-López Z, Proaño JV, Correa D. 2001. Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: Lack of immune suppression. *Parasitology* 87: 587-590.
- Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A. 1983. *Taenia solium*: immunity in the hogs to the cysticercus. *Exp Parasitol* 55: 340-357.
- Nascimento E, Costa JO, Guimaraca MP, Tavares CAP. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunoparasitol* 45: 127-137.
- Ostrosky-Zeichner L, García-Mendoza E, Ríos C, Sotelo J. 1996. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch Med Res* 27: 513-517.
- Pathak KML, Gaur SNS. 1990. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol* 34: 353-356.

- Phiri IK, Ngowi H, Afonso S, Matenga E, Boa M, Mukaratirwa S, Githigia S, Saimo M, Sikasunge C, Maingi N, Lubega GW, Kassuku A, Michael L, Siziya S, Krecek RC, Noormahomed E, Vilhena M, Dorny P, Willingham A L 3rd. 2003. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Trop* 87: 13-23.
- Plancarte A, Lightowers MW, Gauci CG, Flisser A. 1999. Vaccination against cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Intl J Parasitol* 29: 643-647.
- Rabiela MT, Ornelas Y, García-Allan C, Rodríguez del Rosal E, Flisser A. 2000 Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Arch Med Res* 31: 605-607.
- Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Today* 5: 357-359.
- Rabiela MT, Rivas Hernández A, Rodríguez Ibarra J, Castillo Medina S, Cancino F. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives*. A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura and F Beltrán (eds). Academic Press, New York, p. 179-200.
- Rajshekhar V, Joshi DD, Doanh NQ, van De N, Zhou XN. 2003. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop* 87: 53-60.
- Restrepo B, Aguilar ML, Melby PC, Teale JM. 2001a. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg* 65: 366-370.
- Restrepo B, Alvarez J, Castaño J, Arias L, Restrepo M, Trujillo J, Coleial CH, Teale JM. 2001b. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69: 4554-4560.
- Rickard MD, Williams JF. 1982. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol* 21: 229-296.
- Schantz PM, Wilkins PP, Tsang VCW. 1998. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem in: *Emerging Infections* 2. Scheld WM, Craig WA, Hughes JM (eds). AMS Press, Washington, DC, p. 213-242.
- Schenone H, Villaroel F, Rojas A, Ramírez R. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds). Academic Press, New York, pp. 25-38.

- Sotelo J, del Brutto OH. 2000. Brain cysticercosis. Arch Med Res 31: 3-14.
- Thornton H. 1979. Give yourself a tapeworm. Vet Rec 104: 287.
- Tsang VCW, Brand AJ, Boyer AE. 1998. An Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 159: 50-59.
- Waterkeyn JG, Gauci CG, Cowman A, Lightowlers MW. 1997. Sequence analysis of a gene family encoding *Taenia ovis* vaccine antigens expressed during embryogenesis of eggs. Mol Bioch Parasitol 86: 75-84.
- Zoli A, Shey-Njila O, Assana E, Nguekam JP, Dorny P, Brandt J, Geerts S. 2003. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. Acta Trop 87: 35-42.

COMENTARIO AL TRABAJO DE LA PROFESORA FLISSER

La cisticercosis es una parasitosis predominante en países pobres, como todas las infecciones producidas por contaminación fecal, y la principal causa de epilepsia tardía en esos países, en los cuales la prevalencia de esta enfermedad es dos veces mayor que en los países desarrollados. La defecación en la tierra donde existan cerdos que consumen materias fecales humanas y el mal saneamiento ambiental unido a deficiente higiene personal, son los factores que facilitan la presencia de cisticercosis.

La prevalencia de neurocisticercosis en pacientes neurológicos y en autopsias fue de 0, 7% en Colombia, de acuerdo a estudios realizados hace 45 años. En la actualidad se ha encontrado que de 503 casos de epilepsia presentada después de los 10 años de edad, el 24, 7% tuvieron imágenes compatibles con NCC y el 19, 6% fueron positivos para anticuerpos por inmunoblot. Al igual que en otras enfermedades infecciosas los subregistros en Colombia son elevados. En algunos países de América Latina estas cifras son mayores. En Perú esta enfermedad se presenta en el 10% a 12% de las consultas neurológicas y la prevalencia es muy alta en zonas rurales andinas, donde la frecuencia de cisticercosis porcina es de 30 a 60%. En este país se han realizado estudios seroepidemiológicos en zonas rurales, mediante el inmunoblot, con positividad del 8% en población general de una zona selvática, donde la mayoría de los casos positivos eran asintomáticos. En México se encontró esta parasitosis en 2% a 3, 5% de las autopsias y se comprobó que el 25% de los pacientes operados por presunto tumor cerebral, tenían cisticercosis. En el Instituto de Neurología de ese país el 10% de las escanografías son por cisticercosis. La prevalencia total de anticuerpos basada en estudios seroepidemiológicos en esa nación fue de 4%. En población indígena de Venezuela se encontraron anticuerpos en el 79% y antígenos en el 64%, las cifras más elevadas que se han publicado en América Latina.

La neurocisticercosis se ha comprobado en 16 países de América Latina y afecta aproximadamente a 300.000 personas. En un estudio de 1.336 casos de autopsias, con neurocisticercosis, en América Latina, se encontró que el 53% presentaron síntomas neurológicos, mientras que el 47% fueron asintomáticos. La edad de los pacientes varió de 14 meses a 80 años. A menores de 10 años correspondió el 8%, mientras que el 76% estuvo entre las edades de 10 a 50 años. La procedencia fue rural en la gran mayoría de los casos y hubo un ligero predominio en hombres. En el 18% de los casos existió el antecedente por tenia.

Hace 10 años se estimaba que había 50 millones de personas en el nuevo mundo infectadas con el complejo teniasis/cisticercosis y 50.000 morían cada año por esta causa.

El número de casos de cisticercosis diagnosticados en el mundo ha venido incrementándose progresivamente por el avance en los métodos de diagnóstico y

por el aumento de viajeros. En Estados Unidos se diagnostican más de 1000 casos por año; la mayoría se presentan en inmigrantes, y los casos en nativos muchas veces se originan en personas procedentes de países endémicos que son portadoras de T. solium. Esta fue la causa de NCC en población judía ortodoxa, que no consume carne de cerdo y por consiguiente estaba libre de teniasis, en la cual la fuente de infección fue una empleada de la cocina portadora de ese parásito y procedente de América Latina.

Aunque la cisticercosis no se considera una infección oportunista en el SIDA, los factores inmunológicos deprimidos en estos pacientes, pueden contribuir a la presentación sintomática de NCC. Se han descrito en varios países endémicos asociaciones de las dos enfermedades, sin estar establecida la posible relación de la deficiencia inmunológica.

Los factores epidemiológicos del complejo teniasis/cisticercosis están íntimamente ligados a la cría de cerdos sueltos alrededor de las viviendas, donde pueden ingerir materias fecales humanas. De este modo se origina la cisticercosis porcina. Cuando el hombre ingiere carne de cerdo cruda o mal cocida, que contenga cisticercosis, sufre la teniasis intestinal. De estos hechos se derivan dos métodos prácticos para el control de la cisticercosis: cría correcta de los cerdos y buena cocción de su carne.

El hombre es la única fuente de infección para adquirir cisticercosis, pues es el único huésped definitivo de T. solium. Tanto los humanos como los cerdos se infectan al ingerir los huevos de la tenia que salen en las materias fecales humanas. Los cerdos son los huéspedes naturales, por sus hábitos coprófagos. De lo anterior se derivan otros métodos de control: la correcta eliminación de las excretas humanas y la higiene personal. A lo anterior debe sumarse la educación sanitaria y el saneamiento ambiental.

El tratamiento de los pacientes con teniasis intestinal es una medida que previene la diseminación de la cisticercosis. Este procedimiento fue utilizado en una región en Ecuador, donde la cisticercosis porcina era hasta del 11, 4% y la teniasis intestinal humana era de 1, 6% o mayor. Se utilizó praziquantel a la dosis única de 5 mg/kg en el 75, 8% de la población, sin incluir menores de seis años, con resultados satisfactorios.

Los datos presentados en este trabajo han demostrado que los dos factores epidemiológicos principales son la presencia de personas portadoras de T. solium y la existencia de cerdos sueltos. Se han ensayado con éxito las medidas de control por tratamiento de portadores y la de educación sanitaria para reducir la transmisión.

Sin duda la aplicación de la vacuna desarrollada por el grupo mexicano presenta un excelente método para inmunizar los cerdos y su aplicación masiva permitirá impedir la transmisión a los humanos.

Vacuna contra la leishmaniasis. Descubrimiento y ensayos clínicos

Iván Darío Vélez Bernal¹, Sara María Robledo Restrepo¹

Resumen

Aunque la posibilidad de disponer de una vacuna contra las diferentes formas de leishmaniasis es factible, considerando la gran cantidad de información sobre la genética y la biología del parásito, la inmunología de la leishmaniasis clínica y experimental y los resultados promisorios obtenidos en infecciones experimentales, aún no se dispone de ninguna vacuna contra cualquiera de las formas de leishmaniasis. Sin embargo, el programa para la búsqueda y desarrollo de una vacuna contra la leishmaniasis cutánea y leishmaniasis iniciado en 1995 continúa. Hay un importante número de candidatos posibles entre los que se cuentan las vacunas vivas atenuadas por modificación genética, antígenos recombinantes, vacunas que contienen el ADN que codifica por estos antígenos y que se están evaluando actualmente no solo en modelos experimentales sino también en humanos. Así mismo los estudios incluyen la evaluación de nuevos adyuvantes y otros factores que pudieran favorecer la respuesta inmune protectora a la leishmaniasis. En este artículo, se discuten algunos aspectos importantes en relación con los ensayos clínicos para la evaluación de vacunas contra leishmaniasis cutánea realizados hasta el presente.

Palabras clave: leishmaniasis, vacunas humanas, ensayos clínicos, adyuvantes.

Abstract

Although the availability of a vaccine against different forms of leishmaniasis should be feasible considering the vast amount of

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia. idvelez@pecet-colombia.org; srobledo@pecet-colombia.org. Teléfono: (574) 219 6502, FAX: (574) 219 6511

information on genetics and biology of the parasite, clinical and experimental immunology of leishmaniasis, and the promising results obtained in experimental infections, against challenge with different *Leishmania* species, there is no vaccine against any form of leishmaniasis for general human use. However, the vaccine development program aimed at cutaneous and visceral leishmaniasis continues. Studies in animal models and humans are evaluating the potential of different vaccine candidates such as genetically modified live attenuated vaccines, as well as a variety of recombinant antigens or the DNA encoding them but also new adjuvants. Here we discuss some relevant information about the vaccine clinical trials conducted so far for cutaneous leishmaniasis.

Key words: leishmaniasis, human vaccines, clinical trials, adjuvants.

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades que se presenta en tres formas clínicas diferentes y con características epidemiológicas distintas. Las tres formas clínicas principales son: a) la leishmaniasis cutánea (LC) que afecta piel, b) la leishmaniasis mucosa (LM) que afecta membranas mucosas de nariz, boca y garganta, principalmente, y c) la leishmaniasis visceral (LV) que afecta órganos y tejidos como hígado, bazo y médula ósea (Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04). La enfermedad es endémica en al menos 88 países en África, Asia, Europa y América, donde 75 países están en vía de desarrollo y los 13 restantes forman parte de la lista de países con el menor grado de desarrollo. Según las estadísticas del programa especial para enfermedades tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima una incidencia anual de 1,5 millones de casos de LC y 0,5 millones de casos de LV que produce alrededor de 51.000 muertes por año. La prevalencia en el mundo es de aproximadamente 12 millones de casos y el número de personas en riesgo de infectarse es de 350 millones. Sin embargo, el estimado mundial de la carga de la enfermedad no es muy preciso debido a que en muchos países endémicos la prevalencia de la enfermedad se calcula con base en la detección pasiva de casos. Aparentemente, por cada caso sintomático se estima que hay 10 casos de infecciones asintomáticas. El total de la carga de la enfermedad en años de vida ajustados por discapacidad (Disability Adjusted Life Years, DALY) es de 2.090 millones, de los cuales 840.000 son para mujeres y 1.249 millones son para los hombres (Beyrer *et al.*, 2007; www.dssa.gov.co/download/P0841.pdf; www.dssa.gov.co/html/event_3.html; www.who.int/tdr/diseases/default.htm). Debido al gran impacto de la enfermedad, el TDR ha clasificado la leishmaniasis en la categoría I que corresponde a las enfermedades emergentes o no controladas

(Beyrer *et al.*, 2007, Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04).

La leishmaniasis es producida por al menos 20 especies del parásito *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae). *L. donovani* y *L. infantum* son los agentes causales de LV, mientras que *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* producen CL (www.dssa.gov.co/download/P0841.pdf; www.dssa.gov.co/htm/event_3.html; www.who.int/tdr/diseases/default.htm).

El parásito es transmitido por insectos hembras hematófagos del género *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (en América). El parásito existe en dos formas morfológicas: el amastigote (aflagelado) que prolifera intracelularmente en los macrófagos del hospedero mamífero y el promastigote (extracelular y flagelado) que prolifera en el intestino del vector y en el medio de cultivo libre de células. La infección se produce cuando vectores infectados regurgitan promastigotes infectantes en la sangre, cuando pican a un hospedero mamífero para alimentarse. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos y se transforman en amastigotes. El ciclo de vida se continúa cuando un vector pica a un mamífero infectado (reservorio animal o humano) ingiriendo amastigotes intracelulares (Beyrer *et al.*, 2007; www.dssa.gov.co/download/P0841.pdf; www.dssa.gov.co/htm/event_3.html; www.who.int/tdr/diseases/default.htm; Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04).

La LC inicialmente se presenta como nódulos redondeados e indurados con posterior ulceración, con gran compromiso estético y funcional para quien la padece. Desafortunadamente, se dispone de pocas alternativas para el tratamiento de la enfermedad. Los antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) pentostam (estibogluconato de sodio) y el glucantime (antimoniato de meglumina) son los medicamentos de elección en primera instancia para cualquiera de las formas clínicas de la enfermedad y aunque efectivos (curación de 85% o más de los casos), presentan inconvenientes que inciden en la eficacia del tratamiento: 1) al ser un medicamento inyectado, el tratamiento es traumático para el paciente; 2) el tratamiento requiere de varios días (de 20 a 28) y en muchas ocasiones es incapacitante, lo que a menudo conduce a los pacientes a abandonar el tratamiento; 3) el abandono del tratamiento surge como la razón principal de la aparición de grupos de parásitos resistentes al glucantime; 4) es un tratamiento costoso, y 5) los antimoniales pentavalentes son muy tóxicos, principalmente a nivel de hígado y páncreas (Mishra *et al.*, 2007; Minodier & Parola 2007; Croft *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Croft *et al.*, 2006; Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04; Thakur *et al.*, 1998). Resulta-

dos de análisis post-mortem de pacientes militares que se encontraban en tratamiento de leishmaniasis y donde la causa de los decesos fueron pancreatitis o necrosis hepática atribuida al glucantime (DISAN, 2006). Los medicamentos de elección en segunda instancia son el isotianato de pentamidina y la anfotericina B pero son medicamentos más tóxicos que los Sb^v y de mayor costo. Lo anterior hace repensar el uso de los antimoniales pentavalentes y argumenta a favor de la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento.

Entre los medicamentos que están actualmente en evaluación clínica se encuentra la miltefosina, un medicamento antitumoral de administración que está siendo utilizado en la India para el tratamiento de la LV y en otros países como Colombia, para el tratamiento de la LC (Mishra *et al.*, 2007, Ganguly 2002; Berman *et al.*, 2006). Aunque la miltefosina ha mostrado ser efectiva, está contraindicada para mujeres embarazadas (Berman *et al.*, 2006). Otras dos drogas que están siendo evaluadas en ensayos clínicos son la paromomicina que está en fase III de evaluación para el tratamiento de la LV y como terapia combinada con cloruro de metil benzeno para el tratamiento de la LC y la sitamaquina, un derivado 8-aminoquinolina que se está evaluando en fase II para el tratamiento de la LV (Mishra *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta el aumento de la información sobre la genética y la biología del parásito y el conocimiento existente sobre la inmunología clínica y experimental de la leishmaniasis, es razonable pensar que una vacuna es posible y que en un futuro cercano la vacuna comenzará a ser una herramienta importante en el control de la leishmaniasis. Desafortunadamente a la fecha no se dispone de una vacuna que esté siendo usada en forma masiva, pero existen varios candidatos a vacunas que están en grados de evaluación más avanzados o menos avanzados. La falta de una vacuna puede deberse a la cantidad de especies de *Leishmania* que afectan a los humanos (alrededor de 20 especies) y, por lo tanto, a la gran diversidad antigénica que presentan las diferentes especies, la diversidad existente en reservorios y vectores, a las diferentes formas clínicas o manifestaciones de la enfermedad y por último, al hecho que los parásitos del género *Leishmania* tienen un ciclo de vida digenético que compromete dos hospederos: el vector flebotomíneo y el reservorio mamífero.

Todos estos factores demuestran la complejidad que representa la búsqueda y desarrollo de una vacuna efectiva. A la fecha hace falta información importante que debe conseguirse antes de poder disponer de una vacuna. Esta información incluye: 1) Selección del antígeno candidato (debe ser capaz de inducir una respuesta inmune protectora y debe ser seguro: incapaz de exacerbar la enfermedad o causar reacciones patológicas en los individuos vacunados); 2) la vía de aplicación; 3) el tipo de adyuvante a

utilizar en la vacuna; 4) la caracterización de los efectos inmunoestimuladores del candidato a vacuna; 5) la caracterización de la respuesta inmune específica que permita protección natural o inducida para poder estimar que el candidato a vacuna es capaz de inducir inmunidad protectora y 6) las características específicas de la población que debe ser evaluada en estudios clínicos fase III. Esta información es importante para poder seleccionar el candidato a vacuna que va a ser evaluado en fases clínicas II, III y IV.

La vacunación contra la leishmaniasis cutánea humana se ha practicado por varias décadas. Las primeras vacunas fueron con organismos vivos. Este procedimiento conocido como “leishmanización” se basa en la inmunidad clínica que se adquiere cuando se induce una lesión en una zona del cuerpo al aplicar pequeñas dosis de una cepa de *Leishmania* causante de leishmaniasis cutánea. Los estudios pioneros fueron realizados por Pessoa *et al.*, en 1941 (Pessoa *et al.*, 1941a, 1941b). En estos estudios, al utilizar 18 aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea americana en tres dosis diferentes se encontró un 80% de eficacia profiláctica y ausencia de efectos adversos en 527 individuos vacunados y 600 individuos controles.

En los años 70 en la Unión Soviética (Kellina, 1981) e Israel (Naggan *et al.*, 1942), se usó como vacuna una preparación de promastigotes vivos, observándose una protección hasta del 90% de la población de múltiples lesiones cutáneas o de lesiones en el rostro. Desafortunadamente, la “leishmanización” llevada a cabo mediante el uso de cepas virulentas se ha asociado con problemas diversos, incluyendo el desarrollo de grandes lesiones de curación lenta, contaminación lesiva y exacerbación de otras condiciones dermatológicas, lo que obligó a que se descontinuara el uso de organismos vivos virulentos en casi todos los países en los que al principio se empleaba este método de vacunación. A partir de entonces los estudios se enfocaron al uso de organismos vivos atenuados o muertos como vacunas. Estas vacunas de primera generación se han utilizado como profilaxis usando parásitos enteros con o sin BCG como adyuvante. Desafortunadamente ninguna de las vacunas que utilizan parásitos muertos o atenuados han sido lo suficientemente eficaces y por lo tanto no se han podido utilizar en programas de control. Los estudios realizados para evaluar estas vacunas incluyen los siguientes:

1. En Irán se evaluó una vacuna de promastigotes de *L. major* muertos en combinación con BCG y con o sin aluminio. Este estudio no produjo resultados concluyentes (Nadim *et al.*, 1983).
2. En Sudán se evaluó una vacuna similar, también compuesta por promastigotes de *L. major* más BCG en combinación con o sin aluminio. Aunque en este estudio los efectos colaterales fueron mínimos, y

disminuyó considerablemente la incidencia de leishmaniasis visceral en aquellos individuos que convirtieron su respuesta a la prueba de Montenegro luego de la vacunación (individuos MST+) en comparación con los individuos no respondedores (MST-), la vacuna no fue lo suficientemente inmunogénica para ser utilizada en programas masivos de control.

3. En Sudán también se ha evaluado una vacuna de *L. major* y aluminio con BCG encontrándose que la vacuna fue segura y que los efectos colaterales estuvieron circunscritos al sitio de infección. Además se encontró que la vacuna a las diferentes dosis evaluada no solo fue segura sino que también fue inmunogénica ya que permitió que en los individuos vacunados ocurriera una conversión de MST- a MST+ con producción significativa de IFN- γ pero no de IL-5 o IL-10. Además de inducir una fuerte respuesta de tipo Th1, la vacuna no indujo una producción significativa de anticuerpos en casi el 100% de los individuos vacunados hacia el día 60. Una sola inyección produjo una fuerte respuesta de tipo hipersensibilidad retardada. Con base en estos resultados se seleccionó como vacuna 100 μ g de *L. major*-aluminio más BCG como la mejor dosis a ser evaluada en estudios de eficacia. Posteriormente se llevó a cabo un estudio extendido para evaluar la seguridad e inmunogenicidad bajo condiciones de campo. Los resultados obtenidos indicaron que la vacuna fue segura y bien tolerada bajo condiciones de campo. Las tasas de conversión MST- a MST+ fueron de 56%, 50%, 25% y 31% a los 6, 12, 18 y 24 meses posvacunación, respectivamente. No hubo producción de anticuerpos significativa.
4. En Brasil entre los años 60 y 80 se realizaron varios ensayos clínicos con vacuna multivalente compuesta por promastigotes de cinco especies de *Leishmania*, muertos con mertiolate, con o sin *Corinebacterium parvum* como adyuvante y que se conoció como la vacuna de Mayrink (Reviewed by Genaro *et al.*, 1996). El primer estudio se llevó a cabo en el Valle Barracao en los años 70 donde se evaluaron tres dosis de la vacuna en 614 individuos vacunados y 974 individuos control. Se encontró un 78% de conversión a MST+ y no se hallaron casos nuevos. Resultados similares se descubrieron en otro estudio realizado en Caratinga en los años 80. Antunes *et al.*, (1986); usando dos dosis intramusculares, con intervalos de siete días y solución salina como placebo, se observó una eficacia total de la vacuna, cercana al 49%.
5. En Venezuela se evaluó una vacuna de *Leishmania* con BCG como inmunoterapia (Convit *et al.*, 1996), encontrándose resultados contradictorios. En un primer ensayo clínico se trataron pacientes con

leishmaniasis cutánea con la vacuna por vía intramuscular. Aunque el tratamiento con la vacuna fue más prolongado que la quimioterapia convencional con glucantime, se observó cicatrización de las lesiones en el 76% de los casos. En otro estudio se evaluó la vacuna pero administrada por vía subcutánea a dosis diarias incrementales, de 60 individuos tratados con la vacuna; el 95% curó después de 7-6 series de tratamiento en promedio, en comparación con los pacientes tratados con tratamiento convencional quienes curaron después de cuatro series de tratamiento en promedio. En un tercer ensayo clínico se utilizó la vacuna Leishvaccin sola (600 pg proteína/dosis), BCG sola (100 µg/dosis) o ambos. Todas las inyecciones se administraron una vez al mes durante cinco meses (30 pacientes por grupo). Un grupo control se trató con glucantime. Se observó cura a los 150 días en el 28% de los pacientes tratados con BCG, 22% de los pacientes tratados con Leishvaccin y 40% de los pacientes tratados con Leishvaccin más BCG en comparación con el 98% de cura observado en los pacientes tratados con glucantime. En un cuarto y último estudio, se evaluó la combinación de la administración subcutánea de Leishvaccin y la administración intramuscular de Glucantime. Los pacientes curaron completamente luego de un máximo de siete series de tratamiento (140 días).

6. En Ecuador se evaluó una vacuna compuesta por promastigotes de tres especies de *Leishmania* muertos por calor en combinación con BCG (Armijos *et al.*, 1998). Se encontró una conversión a MST+ en el 85% y una incidencia de leishmaniasis cutánea del 2, 1% en los individuos vacunados en comparación con un 20% de conversión a MST+ y una incidencia del 7, 6% en el grupo vacuna con BCG. La eficacia protectora fue del 72, 9%.
7. En Colombia se evaluó la vacuna de promastigotes de *L. amazonensis* autoclavados (Vélez *et al.*, 2000, 2005) en tres ensayos clínicos diferentes, aleatorizados, placebo controlados, doble ciego. La seguridad e inmunogenicidad se evaluó inicialmente en 296 voluntarios y la eficacia se calculó en un segundo estudio con 2597 voluntarios sanos MST-, seleccionados de la población militar colombiana, quienes son responsables de ir a patrullar en las áreas endémicas para leishmaniasis. Esta vacuna mostró ser segura pero no ofreció protección contra leishmaniasis cutánea causada por *L. panamensis*, al menos en el esquema de vacunación propuesto.

Más recientemente se han evaluado como vacunas antígenos recombinantes y vacunas de ADN. También se están desarrollando como candidatos a vacunas preparados de virus y bacterias recombinantes que expresan Ags de

Leishmania o sub-fracciones purificadas de *Leishmania* (proteínas o lipofosfolípidos). Estas vacunas conocidas como vacunas de “segunda” y “tercera generación” deben incluir no solo antígenos importantes específicos tanto de la especie como del estadio biológico del parásito sino también antígenos que son expresados por los promastigotes y los amastigotes. Algunos de estos antígenos son conservados entre las diferentes especies de *Leishmania* mientras que otros antígenos no lo son. Entre los antígenos identificados y caracterizados con potencial para vacuna se encuentran los siguientes: GP63, LACK, PSA-2, P-8, gp46/M-2, proteasas de cisteína, proteína reguladora de glucosa (GRP78), HASPB1 (K26) y el ligando mucosa-manosa (FML). Cada uno de estos antígenos ha mostrado potencial en estudios en modelos animales de una o más formas clínicas de leishmaniasis. Sin embargo, aún se requiere de una estrategia sistemática para determinar cuál (cuáles) de estos antígenos es (son) más apropiado(s) para evaluaciones clínicas. Otros tipos de vacunas incluyen los antígenos salivares del vector (MAXADILAN) y las vacunas sintéticas (Palatnik-de-Sousa, 2008).

La primera vacuna candidata de “segunda generación” evaluada en humanos es la vacuna Leish-111f (IDRI). Esta vacuna Leish-111f es una combinación de tres antígenos diferentes: LeIF (*Leishmania* elongation initiation factor), LmSTI1 (*Leishmania major* stress-inducible protein 1) y TSA (Thiol-specific antioxidant de promastigotes de *L. major*) y que utiliza MPL-SE (Monophosphoryl lipid A de *Salmonella minnesota*) como adyuvante. Un estudio en fase I en individuos MST+ mostró que 10 µg de Leish-111f en 25 µg MPL-SE induce la producción de anticuerpos IgG, IFN-γ e IL-5 a los 28 y 56 días después de la vacunación. Solamente dos individuos desarrollaron enfermedad del suero y un individuo tuvo tuberculosis. Un segundo estudio en fase II realizado en individuos MST- usando 10 µg del antígeno Leish-111f con 25 µg de MPL-SE o 10 µg Leish-111f sola o placebo mostró producción de anticuerpos IgG a los días 84 y 168 después de la vacunación en el grupo de individuos vacunados con Leish-111f con o sin adyuvante pero no en el grupo placebo. La producción de IFN-γ fue mayor en los individuos vacunados con Leish-111f y adyuvante mientras que la producción de IL-5 se detectó en ambos grupos de individuos vacunados (Leish-111f con o sin adyuvante) pero no en el grupo placebo (Coler *et al.*, 2007; Vélez ID, datos no publicados).

En conclusión, varios estudios clínicos bien diseñados, doble ciegos, aleatorizados, se han llevado a cabo utilizando vacunas tanto de primera como de segunda generación con o sin BCG como adyuvante. Debe resaltarse que aunque todavía permanecen serias dificultades, como, por ejemplo, el hecho que las vacunas de primera generación utilizan antígenos crudos y por lo tanto la estandarización de su uso es complicada en el sentido de que no hay claridad en relación con el procedimiento a usar para atenuar, matar o

inactivar los parásitos vivos (p.e. uso de mertiolate, fenol, autoclave o irradiación) así como al tipo y dosis de adyuvante a utilizar (p.e. BCG, aluminio, MPL, etc.), se han obtenido muchos éxitos de los ensayos clínicos realizados hasta el momento. Entre los éxitos logrados está la capacitación en Buenas Prácticas Clínicas (GCP del inglés Good Clinical Practices), Prácticas Correctas de Fabricación (GMP, Good Manufacture Practices), construcción de infraestructura, creación de comités de ética institucionales nacionales, discriminación entre Inmunoterapia e immunoquimioterapia, adquisición de conocimiento en relación con 1) cómo no hacer un ensayo clínico para vacunas, 2) cuál es la mejor población en la cual se puede evaluar la vacuna (población endémica frente a no endémica) y 3) la historia natural de la leishmaniasis cutánea zoonótica frente a la antroponótica.

Referencias

- Antunes CM, et al. 1986. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 15(4): 572-580.
- Armijos RX, Weigel MM, Aviles H, Maldonado R, Racines J. 1998. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J. Infect Dis* 177(5): 1352-1357.
- Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S, Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Modabber F. 1996. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania* major vaccines with or without BCG in human volunteers. *Clin Dermatol* 14(5): 489-495.
- Berman J, Bryceson AD, Croft SL, Engel J, Gutteridge W, Karbwang J, Sindermann H, Soto J, Sundar S, Urbina JA. 2006. Miltefosine: issues to be addressed in the future. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(S1): S41-S44.
- Beyrer C, Villar JC, Suwanvanichkij V, Singh S, Baral SD, Mills EJ. 2007. Neglected Diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet* 370(9587): 619-627.
- Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG. 2007. Leish-111f, a recombinant polypeptide vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75(9): 4648-4654.
- Convit J. 1996. Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela. *Clin Dermatol* 14(5): 479-487.
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(11): 508-512.

- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111-126.
- Dirección de Sanidad del Ejército DISAN. 2006. Reportes de autopsias, DISAN Ejército Colombia. Muertes de soldados atribuidas al uso de Glucantime. 2004-2005.
- Ganguly NK. 2002. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis, *TDR News* 68: 2.
- Genaro O, de Toledo VP, da Costa CA, Hermeto MV, Afonso LC, Mayrink W. 1996. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin Dermatol* 14(5): 503-512.
- <http://www.dssa.gov.co/download/P0841.pdf> (acceso en septiembre 5 de 2008).
- http://www.dssa.gov.co/htm/event_3.html (acceso en septiembre 5 de 2008).
- <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm> (acceso en septiembre 5 de 2008).
- Kellina OI. 1981. Problems and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the USSR. *Bull Soc Pathol Exot* 74(3): 306-318.
- Khalil EAG, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, et al. 2000. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, doubled-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356(9241): 1565-1569.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123(3): 423-438.
- Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F. 2005. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine* 23(28): 3642-3648.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. 2007. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 14: 1153-1169.
- Minodier P, Parola P. 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 5(3): 150-158.
- Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasserli K, Godal T, Smith PG, Modabber F. 1999. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 17(5): 466-472.

- Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. 1983. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bulletin de la societe de pathologie exotique* 76(4): 377-383.
- Naggan L, Gunders AE, Michaeli D. 1972. Follow-up study of a vaccination programme against cutaneous leishmaniasis. II. Vaccination with a recently isolated strain of *L. tropica* from Jericho. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66(2): 239-243.
- Palatnik-de-Sousa C. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the forecoming 25 years. *Vaccine* 26(14): 1709-1724.
- Pessoa SB, BR Pestana. 1941. Ensaio sobre vacinacao preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germenos mortos. *Arq Hig Saude Publ* 6: 141-147.
- Pessoa SB 1941. Segunda nota sobre a vacinacao preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomones mortas. *Rev Paul Med* 19: 106.
- Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, 2004. TDR/SWG/04
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *J Infect Dis* 193(10): 1375-1383.
- Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. 1998. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 351(9115): 1540-1543.
- Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Kumar N, Kumar P, Hassan SM, Narain S, Roy RK. 1998. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1998 2(5): 561-569.
- Velez ID, Gilchrist K, Arbelaes MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, Zicker F, Modabber F. 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99(8): 593-598.
- Velez ID, del Pilar Agudelo S, Arbelaes MP, Gilchrist K, Robledo SM, Puerta JA, Zicker F, Berman J, Modabber F. 2000. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania* (L.) *amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(6): 698.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR VÉLEZ

Contribución de los estudios de búsqueda de una vacuna contra la leishmaniasis

La decisión tomada en Brasil en el año 1995 por iniciativa del TDR/WHO de aunar esfuerzos multinacionales en busca de una vacuna contra la leishmaniasis ha tenido consecuencias importantes que vale la pena señalar.

De una parte la iniciativa implicó adoptar los estándares internacionales de calidad para los grupos y centros de investigación que participaron de los mismos, especialmente los procedimientos de Buenas Prácticas Clínicas (GCP) y de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y esto marca una gran diferencia con respecto a los trabajos pioneros que se habían realizado en las décadas anteriores.

*Los estudios realizados en varios países permitieron un aprendizaje en la forma como se deben realizar los ensayos clínicos, especialmente en Fase III. El criterio de selección de personas que nunca hayan estado en contacto con el parásito (Montenegro negativas), residentes en las zonas endémicas de leishmaniasis, como la población a incluir en los ensayos clínicos Fase III, ha hecho que un número importante de ensayos no hubieran arrojado conclusiones sobre eficacia de las vacunas, al no presentarse suficiente número de casos ni en la población control ni en los que recibieron la vacuna. El hecho de residir en una zona endémica no quiere decir necesariamente que la persona esté en riesgo de infectarse pues al interior del foco los riesgos de infección son variables, dependiendo del comportamiento de picadura de los insectos vectores y de las actividades humanas, entre otros. De otra parte, para el caso de la Leishmaniasis Cutánea Americana producida por *L. panamensis* y *L. braziliensis* logró poner en evidencia que la infección previa con el parásito no era señal de protección para el desarrollo de enfermedad luego de nuevas infecciones.*

Disponer de una población centinela, esto es de población que previamente no ha estado en contacto con el parásito y luego, por razones de su oficio, estará expuesta a la infección, es lo ideal para determinar la eficacia del candidato de vacuna.

El desarrollo de estos ensayos permitió determinar las falencias en el conocimiento de la respuesta inmune en la leishmaniasis humana. Todavía no se conoce cuáles serían los marcadores de respuesta inmune que permitan predecir en una Fase II que el candidato de vacuna está induciendo una respuesta inmune protectora. El reconocimiento de esta falencia orienta el trabajo de investigación básica, especialmente de la inmunología para que se trabaje en esta dirección.

Aunque todavía no se dispone de una vacuna que pueda emplearse en los programas de prevención, ha habido un avance en el conocimiento y una motivación a grupos multidisciplinarios y a empresas que están trabajando en su búsqueda, lo que permite augurar mejores resultados en un futuro próximo.

Los países endémicos que participaron en los ensayos clínicos cuentan ahora con mejores condiciones para realizar los ensayos de evaluación de medicamentos y vacunas; en este sentido se logró un fortalecimiento institucional, aspecto clave para los ensayos que siguen en la búsqueda de una vacuna segura y eficaz.

Epidemiología molecular y rutas de dispersión de *Triatoma dimidiata*

M.D. Bargues¹, M.A. Zuriaga¹ y S. Mas-Coma¹

Resumen

La obtención de 137 secuencias del ITS-2 del ADNr nuclear reveló la existencia de 31 haplotipos diferentes en *Triatoma dimidiata*, con una variabilidad del 10, 18% y una clara distribución en cuatro grupos directamente relacionados con áreas geográficas y países vecinos. Una variabilidad genética intraespecífica tan amplia como la encontrada en los 31 haplotipos del ITS-2 de *T. dimidiata sensu lato* nunca había sido detectada en una especie de triatmino con anterioridad. Las poblaciones de *T. dimidiata* demuestran seguir divergencias evolutivas diferentes en las cuales el aislamiento geográfico parece haber tenido una influencia determinante. Una forma ancestral del sur de México y norte de Guatemala debió dar lugar a dos clados principales que incluyen a cuatro grupos/subgrupos. Una rama monofilética quedó confinada a la Península de Yucatán, Chiapas, Guatemala y Honduras, con sus descendientes actuales mereciendo un rango de especie, al cual se propuso provisionalmente denominar *T. sp. aff. dimidiata*. Dentro de la segunda rama monofilética (desde México hasta Ecuador y Colombia), las poblaciones de Centro América (Guatemala y Honduras y secundariamente México, Nicaragua, Ecuador e isla Providencia) se corresponden a la subespecie nominal *T. d. dimidiata*. Una expansión meridional hasta Panamá y Colombia dió lugar a las formas de *T. d. capitata* y otra expansión septentrional desde Guatemala hacia México a las formas de *T. d. maculipennis*. *Triatoma hegneri* se muestra como una forma insular subespecífica de *T. dimidiata*. La distinción entre los cinco taxones diferentes de *T. d. dimidiata*, *T. d.*

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. Correo electrónico: M.D.Bargues@uv.es

capitata, *T. d. maculipennis*, *T. d. hegneri* y *T. sp. aff. dimidiata* aporta coherencia sistemático-taxonomica a los conocimientos morfológicos y genéticos y facilita el entendimiento de las diferentes capacidades de transmisión de este vector y las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas a lo largo y ancho de la vasta distribución geográfica de *T. dimidiata sensu lato*.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, *Triatoma dimidiata*, ITS-2, ADN ribosomal, secuenciación, filogenia, variabilidad genética, trascendencia epidemiológica.

Abstract

The existence of 31 different haplotypes in *Triatoma dimidiata* was revealed among 137 sequences of the rDNA ITS-2, showing a 10.18% of polymorphic sites and with a clear distribution in 4 groups directly related with geographical areas and neighbouring countries. The very large intraspecific genetic variability found in the ITS-2 sequence of *T. dimidiata sensu lato* has never been detected in a triatomine species before. *Triatoma dimidiata* populations follow different evolutionary divergences in which geographical isolation appears to have had an important influence. A southern Mexican-northern Guatemalan ancestral form gave rise to two main clades including four distinguishable groups/subgroups. One monophyletic clade remained confined to the Yucatan peninsula, Chiapas, Guatemala and Honduras, with extant descendants deserving specific status, temporarily ascribed to *T. sp. aff. dimidiata*. Within the second monophyletic clade (from Mexico to Ecuador and Colombia), Central American populations (Guatemala and Honduras and secondarily Mexico, Nicaragua, Ecuador and Providencia island) correspond to the nominal subspecies *T. d. dimidiata*. A southern spread into Panama and Colombia gave the *T. d. capitata* forms and a northwestern spread rising from Guatemala into Mexico gave the *T. d. maculipennis* forms. *Triatoma hegneri* appears as a subspecific insular form of *T. dimidiata*. The distinction between the five different taxa *T. d. dimidiata*, *T. d. capitata*, *T. d. maculipennis*, *T. d. hegneri* and *T. sp. aff. dimidiata* lends consistency to morphological and genetic concepts, and may facilitate the understanding of different vector transmission capacities and epidemiological characteristics of Chagas disease throughout the very large distribution of *T. dimidiata sensu lato*.

Key words: Chagas disease, *Triatoma dimidiata*, ITS-2, ribosomal DNA, sequencing, phylogeny, genetic variability, epidemiological importance.

Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, sigue siendo una de las enfermedades parasitarias más serias de América Central y América del Sur. La contaminación humana en áreas pobres rurales y periurbanas se atribuye principalmente a insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae. *Triatoma* es el género más amplio, incluyendo especies de gran interés en salud pública debido a su importancia como vectores.

En estos últimos años se está viendo que los hábitos de los triatominos vectores están cambiando en algunas especies y ello está conllevando la aparición de transmisión en zonas urbanas (ej.: *Triatoma dimidiata* en los nuevos barrios construidos en Tegucigalpa, Honduras, después de la catástrofe del huracán Mitch). Además, la reciente inmigración masiva de latinoamericanos hacia países como Australia, Canadá, España y Estados Unidos, hace que la problemática se traslade también a países desarrollados al implicar posibles casos humanos por transfusiones de sangre o transplante de órganos, sin olvidar la transmisión vertical a partir de madres inmigrantes infectadas (Schmunis, 2007).

El control de la enfermedad de Chagas presenta un gran número de factores limitantes como son la imposibilidad de eliminar el ciclo silvestre, la existencia de una gran variedad de reservorios silvestres y domésticos, las malas condiciones de las viviendas humanas en muchas regiones, etc. Estas limitaciones, añadidas a la no existencia ni de una vacuna ni de siquiera un tratamiento efectivo, constituyen los principales motivos por los cuales la lucha contra la enfermedad de Chagas se basa hoy en día esencialmente en la lucha contra los Triatominos vectores, ya que eliminando a los vectores intradomiciliares se suprimiría la casi totalidad de la transmisión al hombre (Molyneux, 2007).

Triatoma dimidiata representa el tercer vector en importancia de la enfermedad de Chagas. Es el vector más importante en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, y el segundo vector más importante en Colombia y Honduras. Tiene una distribución geográfica muy amplia que ocupa, desde México, toda América Central y parte de la costa pacífica de América del Sur (Colombia, Ecuador, Perú). Se encuentra en una gran diversidad de ecotopos tanto silvestres como peridomésticos y domésticos, y además presenta una gran variabilidad morfológica y genética entre poblaciones. Las poblaciones de *T. dimidiata* de Perú y Ecuador parecen ser exclusivamente domésticas y peridomésticas, posiblemente introducidas por mar en la época precolombina (Marcilla *et al.*, 2001), mientras que en el sur de México, norte de Guatemala, Nicaragua, Belize y Costa Rica

las poblaciones silvestres son abundantes (Zeledon *et al.*, 2001; Dumonteil *et al.*, 2002; Monroy *et al.*, 2003).

La clasificación histórica de *T. dimidiata* en función de sus características morfológicas ha sufrido diversos cambios desde su descripción original. Cabe destacar que inicialmente se consideró que incluía tres subespecies diferentes: *T. dimidiata dimidiata*, *T. dimidiata capitata* (Colombia) y *T. dimidiata maculipennis* (México). Estos tres grupos recibieron diferentes consideraciones y rangos taxonómicos hasta que Lent y Wigodzinsky (1979) consideraron que se trataba de una clina dentro de una misma especie, pasando a sinonimizar a todos los taxones anteriores dentro de uno solo: *T. dimidiata dimidiata*.

El debate reciente

Un nuevo debate se inició recientemente por un estudio molecular basado en las secuencias del ITS-2 del ADN ribosomal nuclear en el que se demostró una inusual variabilidad intraespecífica entre las poblaciones de *T. dimidiata* estudiadas, siendo dichas diferencias consistentes con un *status* taxonómico específico en el caso de las poblaciones de *T. dimidiata* de la Península de Yucatán, México (Bargues *et al.*, 2000, 2002; Marcilla *et al.*, 2001). Así es como en los últimos años se procedió a lanzar nuevos estudios morfológicos, cromosómicos y numerosos estudios a nivel molecular con el fin de esclarecer las relaciones y la posición taxonómica de *T. dimidiata* a lo largo y ancho de su distribución geográfica y muy particularmente de sus poblaciones en Yucatán (Anderson *et al.*, 2002; Dorn *et al.*, 2003, 2007; Bustamante *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2004; Catalá *et al.*, 2005; Calderón Fernández *et al.*, 2005; Lehmann *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2005; Panzera *et al.*, 2006; Bargues *et al.*, 2008, etc.).

Todo indicaba que resultaba necesario conocer y entender qué es lo que se está incluyendo bajo la denominación de *T. dimidiata*, qué variedades existen, cuál es su distribución y qué papel juegan en la transmisión de *T. cruzi* al hombre. El conocimiento de las diferencias existentes entre las distintas poblaciones de *T. dimidiata* es esencial a la hora de enfocar las campañas de control, ya que el diferente grado de domiciliación de cada población influye de forma decisiva en la efectividad de las mismas. Por ejemplo, en algunas áreas de Nicaragua no se ha producido reinfestación tras el tratamiento con insecticidas (Acevedo *et al.*, 2000), mientras que en otras zonas, como Jutiapa en Guatemala, las reinfestaciones son continuas (Nakagawa *et al.*, 2003).

Así, se efectuó un amplio estudio combinando análisis de secuencias de ADN, métodos de reconstrucción filogenética y estudios de variación

genética para investigar la epidemiología molecular y las rutas de dispersión de *T. dimidiata* desde México hasta Colombia y Ecuador, para aportar información que ayude a comprender la expansión geográfica y los procesos de domiciliación de este importante vector de la enfermedad de Chagas y que por tanto será útil a la hora de diseñar y enfocar las campañas de control (Bargues *et al.*, 2008).

Triatominos, zonas geográficas, marcador y nomenclatura

Para efectuar ese estudio, los autores contaron con el análisis de triatominos pertenecientes a la especie *T. dimidiata* procedentes de 64 orígenes geográficos diferentes de siete países: México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Ecuador y Colombia (Bargues *et al.*, 2008). Simultáneamente, también secuenciaron y analizaron filogenéticamente otras 12 especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma* y a los subgrupos *Rubrofasciata* e *Infestans*, todo ello con fines comparativos y para previamente aprehender y caracterizar la variación de este marcador dentro de la evolución del género *Triatoma* y los rangos de variabilidad intraespecífica del ITS-2 dentro de especies de dicho género. El espaciador ITS-2 del ADN ribosomal nuclear fue seleccionado como marcador genético, justificándose por su conocida utilidad en *Triatominae* (Bargues *et al.*, 2008).

En lo que se refiere a la secuenciación del ITS-2 del ADNr en ese amplio estudio (Bargues *et al.*, 2008), los investigadores usaron, para la extracción del ADN, una o dos patas fijadas en etanol al 70% de cada espécimen y de cada población, que se procesaron individualmente según sus propios métodos que ya describieron con anterioridad (Bargues y Mas-Coma, 1997) y cuya utilidad en triatominos ya habían demostrado previamente (Marcilla *et al.*, 2001, 2002). El ADN genómico se aisló por extracción estándar con fenol/cloroformo y mediante técnicas de precipitación con etanol descritas en el bien conocido tratado de Sambrook *et al.* (1989). Los pasos concretos seguidos en la amplificación, purificación y cuantificación fueron descritos con detalle dentro del estudio en cuestión (Bargues *et al.*, 2008).

Dado el amplio número de especímenes y de secuencias diferentes, Bargues *et al.* (2008) procedieron a utilizar la terminología para los códigos de los haplotipos según la nomenclatura propuesta recientemente por Bargues *et al.* (2006), mediante el uso de haplotipos combinados (HC). De acuerdo con esta nomenclatura, los haplotipos (H) del ITS-2 son referenciados mediante números.

Secuencias, variabilidad genética y filogenias

Para un estudio pormenorizado de esas características, Bargues *et al.* (2008) procedieron al ensamblaje, alineamiento, comparación de secuencias y detección de polimorfismos nucleotídicos únicos (SNPs), utilizando una batería previamente seleccionada de diferentes métodos informáticos, entre los cuales se contaban el Staden Package (Staden *et al.*, 2001), Clustal-W 1.83 (Thompson *et al.*, 1994), Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST), MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) y finalmente también el GenBank-EMBL como base de datos de secuencias referenciadas. La amplia experiencia en estudios de Biología Molecular con diferentes tipos de organismos y concretamente, además, con este marcador del ADN ribosomal, les conminó a la oportunidad de introducir correcciones manuales en los alineamientos de las secuencias, siempre con el fin único de una mejor adecuación de las correspondencias de nucleótidos en las regiones de microsatélites, numerosos y habituales en el marcador seleccionado.

El trabajo de Bargues *et al.* (2008) abarca asimismo un detallado estudio de la variabilidad genética a través de análisis intra- e interpoblaciones de *T. dimidiata* mediante DnaSP versión 4 (Rozas *et al.*, 2003) y Arlequin 2000 (Excoffier *et al.*, 2005), además de un análisis de la varianza molecular (AMOVA) que fue implementado con Arlequin 2000 teniendo en cuenta las relaciones genéticas entre los haplotipos moleculares.

Los análisis filogenéticos aplicados al estudio de las secuencias del ITS-2 de los numerosos especímenes de *T. dimidiata* fueron efectuados por Bargues *et al.* (2008) siguiendo las pautas y mediante los software más adecuados a las propiedades del marcador y a las características de las secuencias. Así, las filogenias fueron inferidas con Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood - ML) utilizando como software para los análisis PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) y PHYMLv2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003). El método de Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony - MP) y el método del Vecino Más Próximo o De Distancias (Neighbor-Joining - NJ) no fueron utilizados al no resultar apropiados. Los parámetros de ML y el modelo evolutivo fueron determinados por Bargues *et al.* (2008) utilizando el hierarchical likelihood ratio test (hLRTs) y el criterio de información AIC (AkaiKe Information Criterion), implementados con ModelTest 3.7 de Posada y Crandall (1998) en conjunción con PAUP*4.0b10. Los soportes estadísticos del árbol ML fueron realizados mediante muestreo repetitivo con 1000 pseudo-réplicas (bootstrap) y 1000 réplicas de puzzle (quartet-puzzle analysis). Finalmente, Bargues *et al.* (2008) también aplicaron el procedimiento de inferencia Bayesiana para obtener las probabilidades posteriores (BPP) para los nodos del árbol ML, utilizando el mismo modelo ya seleccionado anteriormente e implementándolo en MrBayes 3.1 (Ronquist

y Huelsenbeck, 2003) con cuatro cadenas durante 1.000.000 de generaciones. Los últimos 9.000 árboles fueron usados para obtener el árbol consenso y las probabilidades posteriores. Como complemento a los análisis filogenéticos, Bargues *et al.* (2008) realizaron un median-joining network analysis (Bandelt *et al.*, 1999) mediante el software Network v. 4.1.1.2.

Haplotipos de *Triatoma dimidiata*

El análisis de las 137 secuencias obtenidas por Bargues *et al.* (2008) reveló la existencia de 31 diferentes haplotipos en las poblaciones de *T. dimidiata* estudiadas y a los que se les asignaron las denominaciones de T.dim-H1 a T.dim-H31 de acuerdo con la nomenclatura antes citada. Estos 31 haplotipos presentaron una secuencia del ITS-2 cuya longitud variaba entre 489 y 497 pb (media 495, 10) y con un alto sesgo en la composición nucleotídica, siendo el contenido en AT del 75, 25 al 76, 85% (75, 72%). Los análisis comparativos y de similitud entre estos 31 haplotipos revelaron la existencia de cuatro agrupamientos claros: el grupo 1 incluía los haplotipos T.dim-H1 a T.dim-H10; el grupo 2 a los haplotipos T.dim-H11 a T.dim-H17; el grupo 3 a los haplotipos T.dim-H18 a T. dim-H24; y el grupo 4 a los haplotipos T. dim-H25 a T. dim-H31. Estos cuatro agrupamientos aparecían relacionados con áreas geográficas concretas, incluyendo regiones y países vecinos. La única excepción resultó ser la isla Providencia, la cual, aunque perteneciente a Colombia, está situada a 720 km de distancia de la costa norte de este país pero a tan sólo 240 km de la costa oeste de Nicaragua (Bargues *et al.*, 2008).

Variabilidad de las secuencias de *Triatoma dimidiata*

El alineamiento de las secuencias del ITS-2 de los 31 haplotipos de *T. dimidiata* efectuado por Bargues *et al.* (2008) resultó ser de 501 pb de longitud, de las cuales 24 posiciones fueron parsimónico-informativas. Considerando además las inserciones y deleciones (indels), el total de posiciones polimórficas entre estos 31 haplotipos fueron 51, lo cual representó un 10, 18% de variabilidad. Los haplotipos T.dim-H25 a T.dim-H31 fueron los responsables de esta tan elevada variabilidad. De hecho, Bargues *et al.* (2008) comprobaron que al eliminar estos haplotipos del alineamiento general, entonces este elevado porcentaje de sitios polimórficos decrecía. En un primer alineamiento de 498 pb incluyendo los 24 haplotipos T.dim-H1 a T.dim-H24, los cuales procedían de siete países diferentes, la variabilidad en sitios polimórficos pasó a ser de únicamente 5, 62%, incluyendo 28 posiciones nucleotídicas variables, de las cuales 6 (1, 20%) fueron transiciones (ti), 13 (2, 61%) transversiones (tv) y 9 (1, 81%) inserciones/deleciones (indels). En

un segundo alineamiento de 495 pb de longitud, incluyendo solo a los siete haplotipos T.dim-H25 a T.dim-H31 procedentes de tan solamente tres países (México: localidades de Yucatán, Chiapas, Isla Cozumel e Isla Holbox; Guatemala: Peten; Honduras: Yoro Yoro), la variabilidad pasó a ser del 2,42% con 12 posiciones nucleotídicas variables, de las cuales 2 fueron ti (0,40%) y 10 indels (2,02%). Es de destacar el hallazgo de un microsatélite interrumpido (AT)₄₋₅ TTT (AT)₅₋₇ que fue detectado entre las posiciones 47 y 73 de todos los especímenes estudiados.

La relevancia de estos grupos dentro de *T. dimidiata* fue analizada por Bargues *et al.* (2008) en un alineamiento múltiple de 562 pb en el cual se incorporaron otras 22 secuencias del ITS-2 de especies de *Triatoma*. El set de secuencias del ITS-2 analizado fue de 53 secuencias diferentes, al que se incluyó *R. prolixus* como grupo de referencia externo. El árbol ML (-Ln = 2648.5129) fue obtenido usando el modelo evolutivo HKY+G, de acuerdo con los resultados de AIC y aplicando una distribución gamma = 0,58.

Grupos, clados y filogeografía de *Triatoma dimidiata*

Los estudios combinados de análisis de variabilidad genética y de análisis filogenéticos y filogeográficos permitieron observar a Bargues *et al.* (2008) que es precisamente en la zona del sur de México y el norte de Guatemala a donde cabe adjudicar el origen de la especie *T. dimidiata* y desde donde se habría distribuido hacia el norte (México) y hacia el sur (Centro América y hasta Colombia) generando dos linajes independientes.

Los árboles filogenéticos y poblacionales son coincidentes y muestran una distribución en dos grandes clados incluyendo a cuatro grupos bien distinguibles (Bargues *et al.*, 2008). La Tabla 1 muestra los valores medios de las diferencias entre pares de secuencias dentro de un mismo grupo y entre los cuatro grupos considerados de *T. dimidiata*. Esta distribución de poblaciones demuestra tener significado sistemático y resulta extrapolable taxonómicamente:

- Un primer gran clado, confinado exclusivamente a la Península de Yucatán, el norte del Estado de Chiapas, Guatemala y Honduras, y cuyos descendientes actuales merecen un *status* específico independiente al cual Bargues *et al.* (2008) propusieron provisionalmente denominar *T. sp. aff. Dimidiata*.
- Un segundo gran clado (desde México a Ecuador y Colombia) en el que se observaron patrones de diversidad poblacional compatibles con el rango de subespecies, las cuales muestran haber seguido una

Tabla 1. Diferencias entre los pares de secuencias de las poblaciones de *Triatoma dimidiata sensu lato*. Arriba de la diagonal, valores medios de las diferencias entre pares de secuencias entre poblaciones (p_{xy}); en la diagonal, valores medios de la diferencias entre pares de secuencias dentro de una misma población (p_x); bajo de la diagonal, valores medios corregidos de la diferencia entre pares de secuencias ($(p_{xy} - (p_x + p_y)/2)$). *T. d. dimidiata* se corresponde con el subgrupo 1A (Guatemala, Honduras y secundariamente México, Nicaragua y Ecuador); *T. d. capitata* se corresponde con el subgrupo 1B (Colombia y Panamá); *T. d. maculipennis* se corresponde con el grupo 2 (México, y esporádicamente Guatemala); *T. sp. aff. dimidiata* se corresponde con el grupo 3 (Península de Yucatán, el norte del estado de Chiapas, Guatemala y Honduras) (véase Bargues *et al.*, 2008 para más detalles sobre estos grupos).

	Colombia 1	Colombia 2	México 1	México 2	México 3	Honduras 1	Honduras 3	Ecuador	Nicaragua	Guatemala 1	Guatemala 2	Guatemala 3	Panamá
Colombia1	0	4.833	0.5	10.478	21.267	1.167	22	1.333	3	1.115	10	21.143	6
Colombia2	4.209	1.248	5.333	9.332	19.913	4.222	20.833	6.167	7.833	4.852	8.767	19.871	2.5
Mexico1	0	4.209	1	9.814	21.767	1.667	22.5	1.833	3.5	1.462	10.5	21.643	6.5
Mexico2	9.814	8.044	10.978	1.328	26.936	9.988	27.739	11.145	9.478	10.617	0.739	26.845	10.598
Mexico3	20.295	18.318	20.295	25.301	1.943	20.656	2.133	22.6	24.267	21.059	26.267	1.390	21.133
Honduras1	0.804	3.235	0.804	8.961	19.321	0.725	21.389	2.426	4.056	1.598	9.278	20.533	5.389
Honduras3	22	20.209	22	27.075	1.162	21.026	0	23.333	25	21.731	27	1.429	22
Ecuador	0.333	4.543	0.333	9.482	20.629	1.063	22.333	2	3.667	2.449	10.667	22.476	7.333
Nicaragua	3	7.209	3	8.814	23.295	3.693	25	2.667	0	4.115	9	24.143	9
Guatemala1	0.215	3.327	0.062	9.053	19.188	0.336	20.831	0.549	3.215	1.8	9.138	20.896	6.038
Guatemala2	10	8.143	10	0.075	25.295	8.915	27	9.667	9	10.038	0	26.143	10
Guatemala3	20.714	18.819	20.714	25.752	-0.009	19.740	1	21.048	23.714	19.567	25.714	0.857	21.071
Panamá	5	0.876	5	8.934	19.162	4.026	21	5.333	8	4.138	9	19.643	2

radiación adaptativa a partir de formas ancestrales presentes en Guatemala y próximas a *T. sp. aff. dimidiata*; las tres subdivisiones de este clado muestran corresponderse con las tres subespecies antedichas:

- *T. d. dimidiata*, incluyendo a las poblaciones de América Central;
- *T. d. capitata*, originada por una dispersión hacia el sur a través de Panamá y Colombia a partir de poblaciones de la anterior subespecie *T. d. dimidiata*;
- *T. d. maculipennis*, originada en otra dispersión también a partir de poblaciones de la subespecie nominal pero en este caso hacia el noroeste y llegando a México.

Es de destacar así mismo que la especie siempre considerada válida, *T. hegneri*, presente en la isla de Cozumel, se mostró en dicho trabajo genético que en realidad se trata simplemente de una forma subespecífica insular de *T. dimidiata*.

El estudio en cuestión (Bargues *et al.*, 2008) indicó también que en el pasado tuvieron lugar varias introducciones por el hombre en Ecuador y en la Isla de Providencia.

Por otro lado y de manera altamente interesante, la comparación filogenética de *T. dimidiata* con otras especies de *Triatoma* realizada en dicho trabajo mostró la existencia de dos líneas de colonización seguidas en la evolución del género *Triatoma*: una hacia el norte del Istmo de Panamá y otra hacia el sur del mismo durante periodos antiguos.

Nueva estructura taxonómica de *Triatoma dimidiata sensu lato*

La distinción de estos cinco diferentes taxones, *T. d. dimidiata* (subgrupo 1A), *T. d. capitata* (subgrupo 1B), *T. d. maculipennis* (grupo 2), *T. sp. aff. dimidiata* (grupo 3), y *T. d. hegneri* (forma insular), puede ayudar en los conceptos morfológicos y genéticos y puede facilitar el entendimiento de las diferentes capacidades de transmisión de este vector y las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas a lo largo y ancho de la vasta distribución geográfica de *T. dimidiata sensu lato* (Bargues *et al.*, 2008).

Repercusiones en epidemiología y control

Los estudios a nivel molecular con marcadores del ADN constituyen una herramienta fundamental hoy en día a la hora de enfocar y planifi-

car los programas de control vectorial en la lucha contra la enfermedad de Chagas. La información que aportan estos marcadores es especialmente útil para conocer y comprender la estructura poblacional de los Triatominae, sus fenómenos de dispersión geográfica, sus fenómenos de adaptación a los diferentes hábitats, y concretamente su capacidad de domiciliación o adaptación a los hábitats humanos. Así pues, gracias al estudio de la genética de las poblaciones de los grandes vectores, ahora nos encontramos en situación de conocer de forma rápida y fiable la procedencia geográfica y la posición taxonómica de cualquier población de este grupo de especies y subespecies. Esto nos permite actuar de forma más rápida y efectiva ante situaciones como, por ejemplo, la reinfestación en una zona tras un tratamiento con insecticidas, ya que al conocer con qué población nos enfrentamos podemos diseñar una nueva estrategia de control óptima en función de las características biológicas de dicha población.

Del amplio estudio molecular llevado a cabo sobre *T. dimidiata* a lo largo y ancho de su distribución geográfica, cabe extraer las siguientes conclusiones sobre repercusiones en epidemiología y control (Bargues *et al.*, 2008):

- las poblaciones de *T. dimidiata* demuestran seguir divergencias evolutivas diferentes en las cuales el aislamiento geográfico parece haber tenido una influencia determinante;
- el análisis filogeográfico de las especies de *Triatoma* muestra dos líneas de colonización diferentes hacia el norte y hacia el sur del istmo de Panamá durante épocas pasadas;
- una variabilidad genética intraespecífica tan amplia como la encontrada en la secuencia del ITS-2 de *T. dimidiata sensu lato* nunca había sido detectada en una especie de triatomo con anterioridad;
- la distinción entre los cinco taxones diferentes de *T. d. dimidiata*, *T. d. capitata*, *T. d. maculipennis*, *T. d. hegneri* y *T. sp. aff. dimidiata* aporta coherencia sistemático-taxonómica a los conocimientos actualmente disponibles sobre los conceptos morfológicos y genéticos en estos taxones y puede facilitar la comprensión de las diferentes capacidades de transmisión vectorial y diferentes características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas a lo largo y ancho de la amplísima área de su distribución en Centro y Meso-América;
- esa distinción también indica que *T. dimidiata* va a presentar más problemas para el control de la enfermedad con rociados insecticidas de

viviendas que en el caso de *Triatoma infestans* en Uruguay, Chile y Brasil;

- sin embargo, ello viene también a sugerir que las poblaciones de *T. dimidiata* en Ecuador (y probablemente también Perú) cabe considerarlas dianas apropiadas para fumigaciones insecticidas en respectivas estrategias de control.

Agradecimientos

Los estudios en cuestión sobre *T. dimidiata* fueron subvencionados por el Proyecto CDIA No. ICA4-2003-10049 del Programa INCO-DEV (DG XII, EC, Bruselas) y la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Proyectos No. C03/04 and No. ISCH2005-PI050574 del Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad, Madrid, España. Los trabajos comprendidos en este amplio estudio fueron fruto de la colaboración internacional dentro de la Red ECLAT.

Referencias

- Acevedo F, Godoy E, Schofield JC. 2000. Comparison of intervention strategies of *Triatoma dimidiata* in Nicaragua. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 867-871.
- Anderson JM, Lai JE, Dotson EM, Cordon-Rosales C, Ponce C, Norris DE, Beard CB. 2002. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 243-248.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bargues MD, Mas-Coma S. 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14 (5): 569-577.
- Bargues MD, Marcilla A, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 567-573.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S. 2002. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (S1): 159-164.

- Bargues MD et al. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution* 6 (1): 46-62.
- Bargues MD, et al. 2008. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(5): e233. doi: 10.1371/journal.pntd.0000233.
- Bustamante DM, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino, PM, Rojas G, Pinto N, Guhl F, Dujardin JP. 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *Journal of Medical Entomology* 41: 296-301.
- Calderon CI, Dorn P, Melgar S, Chavez JJ, Rodas A, Rosales R, Monroy C, 2004. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Entomology* 41: 882-887.
- Calderon Fernandez G, et al. 2005. Cuticular hydrocarbon variability among *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Mexico and Guatemala *Journal of Medical Entomology* 42: 780-788.
- Catala S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schettino PM, Gorla D. 2005. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of *phyllosoma* and *protracta* complexes. *Journal of Medical Entomology* 42: 719-725.
- Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy C. 2003. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. *Journal of Medical Entomology* 40: 436-440.
- Dorn PL, Monroy C, Curtis A. 2007. Discussion – *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): a review of its diversity across its geographic range and the relationships among populations. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 343-352.
- Dumonteil E, Gourbiere S, Barbera-Perez M, Rodriguez-Felix E, Ruiz-Piña H, Baños-Lopez O, Ramirez-Sierra MJ, Menu F, Rabinovich JE. 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 176-183.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA 3: Integrate software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Lehmann P, Ordoñez R, Ojeda-Baranda R, Mendez de Liria J, Hidalgo-Sosa L, Monroy C, Ramsey JM, 2005. Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* populations (Reduviidae: Triatominae) from Mexico and Northern Guatemala. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 477-482.
- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey J, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch (F.), Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18 (1): 136-142.
- Marcilla A, et al. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution* 1(3): 225-235.
- Molyneux D, edit. 2007. *Control of human parasitic diseases* Elsevier-Academic Press London, 654 pp. + colour plates.
- Monroy C, Bustamante DM, Rodas AG, Enriquez ME, Rosales RG. 2003. Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. *Journal of Medical Entomology* 40: 800-806.
- Nakagawa J, Hasimoto K, Cordon-Rosales C, Abraham Juarez J, Trampe R, Marroquin L. 2003. The impact of vector control on *Triatoma dimidiata* in the Guatemalan department of Jutiapa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 97: 288-297.
- Panzer F. et al. 2006. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Tropical Medicine and International Health* 11 (7): 1092-1103.
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

- Ramirez CJ, Jaramillo CA, Delgado MD, Pinto NA, Aguilera G, Guhl F. 2005. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. *Acta Tropica* 93: 23-29.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Meseguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, Vols. I, II & III, 1647 pp.
- Schmunis G. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of internacional migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (8), PMID: 17891282.
- Staden R, Judge DP, Bonfield JK. 2001. Sequence assembly and finishing methods. *Methods of Biochemical Analysis* 43: 302-322.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). [4.0beta]. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Zeledon R, Montenegro VM, Zeledon O. 2001. Evidence of colonization of man-made ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 659-660.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR BARGUES

Hay dos factores importantes en la distribución de los triatominos: primero, el grupo es principalmente tropical y subtropical y segundo, está restringido al hemisferio occidental y a la región oriental, encontrándose completamente ausente de las regiones palártica y etiópica (sin tomar en cuenta Triatoma rubrofasciata, especie dispersada por el hombre que toca marginalmente la región australiana). Sur América tropical y subtropical es el centro de la diversidad de la subfamilia.

Dos terceras partes del territorio de Colombia están ubicadas en la zona intertropical o ecuatorial que se caracteriza por dos épocas de lluvia y dos épocas secas en un mismo año. La duración de la radiación solar es prácticamente igual durante todo el año.

La conformación montañosa derivada de la trifurcación andina, que se extiende a través de todo el país desde el suroeste hasta el noreste, abarcando el territorio montañoso con sus valles interandinos con diferentes alturas y climas, ofrece un ambiente muy favorable para la domiciliación de varias especies de triatominos. Esta región también se caracteriza por ser la zona más densamente poblada.

La ubicación de Colombia y su orografía determinan las diferencias en el clima, generando seis grandes regiones biogeográficas que se caracterizan por su fisiografía, vegetación y suelos, que a su vez se relacionan directamente con la presencia de los triatominos.

Como es bien sabido, la mayoría de los triatominos son silvestres. Los adultos de algunas especies tienen la capacidad de llegar al domicilio humano atraídos por la luz o por transporte pasivo por el hombre en utensilios y materiales vegetales.

La tripanosomiasis americana es una zoonosis muy compleja, el parásito Trypanosoma cruzi presenta una gran variedad de cepas e infecta a través de los triatominos vectores a 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental. En la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatominos infectados a ocupar viviendas humanas, llevándose a cabo el proceso de domiciliación, ya que no solamente allí encuentran refugio sino también suficiente alimento en la sangre humana y de animales domésticos. De esta manera entra el hombre a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas. La enfermedad asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda se transmite además de los insectos triatominos, a través de transfusiones de sangre contaminadas por el parásito y también congénitamente de madre infectada a hijo.

Triatoma dimidiata es el segundo vector en importancia en Colombia y se encuentra ampliamente distribuido en el territorio nacional. Se han descrito poblaciones silvestres y también domésticas, pero aún no se conocen suficientemente sus hábitos de dispersión y colonización. Los estudios genéticos aquí presentados permitirán una mejor comprensión de la biología de este insecto con miras a establecer estrategias de control adecuadas que permitan su eliminación.

Los aspectos genéticos y evolutivos son claves para poder determinar el comportamiento de las diferentes poblaciones de este insecto.

Aspectos co-evolutivos de la interacción *Trypanosoma*-vector

Gustavo Adolfo Vallejo¹, Felipe Guhl Nannetti^{2,3}, Ximena Carolina Pulido¹,
Claudia Herrera², Daniel Zabala¹, Daniel Alfonso Urrea¹

Introducción

En las últimas dos décadas ha crecido el interés por conocer la distribución geográfica de los diferentes genotipos de *T. cruzi* y de *T. rangeli* y su asociación con los ciclos domésticos y silvestres de los triatominos. Por otro lado, existe interés en conocer los mecanismos del vector que favorecen o impiden la transmisión de estas poblaciones de parásitos, entre los cuales se destacan los factores inmunes del insecto o la presencia de otros microorganismos en el tracto intestinal, que podrían alterar el curso de la infección de *T. cruzi* o de *T. rangeli*.

Con relación a los vectores de *T. cruzi* y *T. rangeli*, se reconocen 136 nombres válidos de triatominos agrupados en seis tribus y 18 géneros (Galvão *et al.*, 2003). Se destacan dos clados de importancia epidemiológica: Rhodniini y Triatomini. Rhodniini se considera un grupo monofilético, sugiriéndose que las especies de *Rhodnius* se derivaron de una forma ancestral en la región del Amazonas, la cual dio origen a una radiación de tres principales líneas adaptativas: las formas de la "floresta amazónica" (representadas por las especies *pictipes*, *stali*, *brethesi*, *paraensis*, *dallesandroi*), el grupo "prolixus", principalmente en regiones semejantes a sabanas y áreas boscosas al oriente de la cordillera de los Andes (representados por las especies *prolixus*, *robustus*, *neglectus*, *nasutus*, *domesticus*) y el grupo "pallescens", el cual forma un cline evolutivo de norte a sur en el occidente

¹ Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. Barrio Santa Helena. A.A. 546. Ibagué, Tolima, Colombia, Telefax 2669176. Correo electrónico: gvallejo@ut.edu.co

² Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

³ Profesor Titular. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes.

de la cordillera de los Andes (representado por *pallescens*, *colombiensis*, *ecuadoriensis*) (Schofield & Dujardin, 1999).

Algunas evidencias señalan dos orígenes separados de los Triatomini en el Norte y Suramérica respectivamente, aparentemente con un tercer grupo independiente formado por el «complejo dispar» en la región noroccidental de Suramérica. Las especies suramericanas se derivaron en la región del norte del Chaco de Bolivia, Paraguay y norte de Argentina, dispersándose al noreste y hacia el sur, sin que ninguna de las especies haya ocupado las áreas forestales del Amazonas, con excepción de *Triatoma maculata* que se ha asociado a aves migratorias. Se ha sugerido que las especies de *Triatoma* de América del Norte y América Central se derivaron de *T. dimidiata* en Yucatán, extendiéndose hacia el sur por América Central hasta Colombia y las grandes Antillas y hacia el norte dando origen al complejo *Phyllosoma* en México (Schofield, 2004).

Casi la totalidad de las especies de *Rhodnius* están asociadas con palmas con excepción de *R. domesticus*, reportada en bromeliáceas y huecos de los árboles, y *R. paraensis*, la cual fue encontrada en el nido de una rata espinosa *Echimyus chrysurus* localizada en el hueco de un árbol. El género *Psammolestes* está estrechamente relacionado con *Rhodnius*, se puede encontrar en palmas, especialmente en nidos de pájaros de los géneros *Anumbius* y *Phacellodomus*. Algunas especies de *Panstrongylus* tales como *P. megistus* se pueden encontrar en palmeras; sin embargo, todas las demás especies de este género se encuentran asociadas con madrigueras terrestres y huecos de los árboles, y el género *Triatoma* se encuentra asociado a ambientes terrestres rocosos y madrigueras de roedores, con excepción de *T. sordida*, la cual se alimenta sobre aves (Gaunt & Miles, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Vectores de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli*

Al menos 11 especies de 136 triatominos se encuentran domiciliadas en diferentes regiones de América Latina, y otras nueve especies adicionales son consideradas como vectores secundarios de *T. cruzi*, por cuanto pueden invadir las viviendas humanas; 33 especies adicionales, frecuentemente se encuentran en el peridomicilio, siendo las restantes estrictamente selváticas. De acuerdo a Salvatella *et al.*, (1998), los vectores domiciliados de la enfermedad de Chagas más importantes en América Latina son *R. prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans* y *Panstrongylus megistus*. En situaciones excepcionales se han encontrado colonizando a las viviendas a *R. domesticus*, *R. neglectus*, *T. flavida*, *T. guasayana*, *T. nigromaculata*, *T. rubrovaria*, *T. williami* y *P. rufotuberculatus*. En algunas áreas, otras especies pueden ser consideradas como vectores secundarios de *T. cruzi*: *R. pallescens*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. lenti*, *T. mazzotti*, *T. phyllosoma*, *T. maculata*, *T. venosa* y *T. leucogaster*.

Otras especies se encuentran en el peridomicilio humano y algunas veces dentro de las casas, pero sin colonización de las mismas: *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pictipes*, *T. arthurneivai*, *T. barberi*, *T. breyeri*, *T. flavida*, *T. gerstaeckeri*, *T. guasayana*, *T. guazu*, *T. longipennis*, *T. melanocephala*, *T. melanosoma*, *T. nigromaculata*, *T. obscura*, *T. platensis*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria*, *T. venosa*, *T. vitticeps*, *T. williamsi*, *E. mucronatus*, *P. diasi*, *P. herreri*, *P. lenti*, *P. lignarius*, *P. lutzi*, *P. rufotuberculatus*, *P. tuppynambai* y *Mepraia spinolai*.

Con relación a *T. rangeli*, el hallazgo de flagelados de este parásito en el intestino del insecto no constituye una prueba de su capacidad vectorial. La evidencia definitiva consiste en la demostración de tripomastigotes metacíclicos a nivel de glándulas salivares, capaces de ser transmitidos a los vertebrados por vía inoculativa. Precisamente se ha demostrado que las especies del género *Rhodnius* son capaces de desarrollar formas infectivas en las glándulas salivares, de manera que se han registrado 12 de las 16 especies de *Rhodnius* con infección natural o experimental de *T. rangeli* a nivel de glándulas salivares. Estos vectores biológicamente comprobados son: *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. dalessandroi*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. prolixus* y *R. robustus* (Guhl & Vallejo, 2003).

Variabilidad de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Originalmente los polimorfismos genéticos de *T. cruzi* fueron demostrados mediante electroforesis de isoenzimas (Miles *et al.*, 1978; Tibayrenc *et al.*, 1986), RFLP de kDNA (Morel *et al.*, 1980), PFGE (Henriksson *et al.* 1990), impresiones digitales de DNA (Macedo *et al.*, 1992), análisis de RAPD (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993). Los análisis de los genes 24S α rRNA y de mini-exón mostraron dos grupos denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998; Anonymus, 1999). Adicionalmente mediante una reacción de PCR del espaciador no transcrito del gen mini-exón, fue posible determinar si un tripanosoma corresponde a *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* Z3 o *T. rangeli* (Fernandes *et al.*, 2001). Otros resultados han mostrado que el análisis de los RFLP-ITS rDNA constituye una herramienta útil para detectar variabilidad intraespecífica en *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 1999; Cuervo *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2002). El análisis de microsatélites de *T. cruzi* ha permitido realizar estudios de reconstrucción filogenética y definición de la clonalidad de varias cepas (Oliveira *et al.*, 1998, Macedo *et al.*, 2001). Los microsatélites han mostrado que *T. cruzi* es diploide y que la mayoría de las cepas aisladas de pacientes chagásicos crónicos tienen estructura clonal mientras que las cepas aisladas de hospederos no humanos tienen estructura multiclonal (Oliveira *et al.*, 1998, 1999;

Rozas *et al.*, 2007b). Nuevos estudios utilizando análisis de RAPD y electroforesis de isoenzimas mostraron que *T. cruzi* II está conformado por cinco grupos filogenéticamente separados (IIa-IIe). En contraste, *T. cruzi* I forma una población homogénea (Brissé *et al.*, 2000). Similares resultados fueron obtenidos analizando la región 24S α rRNA, mini-exón y 18S rRNA (Brissé *et al.*, 2001).

Nuevos polimorfismos de diferentes genes de *T. cruzi* se han utilizado recientemente para la genotificación de los aislados del parásito. Se han utilizado los polimorfismos de la Calmadulina-3'UTR (Brandão & Fernandes 2006; Brandão *et al.*, 2008); los polimorfismos de Tripanotion reductasa y cruzipaina (Rojas *et al.*, 2007); análisis multilocus PCR-RFLP (Rozas *et al.*, 2007a). Más recientemente se ha estudiado la variabilidad del espaciador intergénico del gen minixon en aislados de *T. cruzi* I (O'Connor *et al.*, 2007). Adicionalmente, Herrera *et al.*, (2007) secuenciaron el espaciador intergénico del gen minixon de 12 aislados de *T. cruzi* I de Colombia, encontrando cuatro haplotipos, identificados a través de polimorfismos de nucleótidos simples y procesos de inserción/delección, asociados a ciclos de transmisión del parásito en diferentes regiones geográficas. El haplotipo 1 se encontró asociado a infecciones humanas y a vectores (*T. dimidiata* y *R. prolixus*) domiciliados; el haplotipo 2 se observó asociado con infecciones humanas y vectores selváticos; el haplotipo 3 se observó en dos cepas aisladas dentro de vectores capturados en el interior de viviendas humanas y el haplotipo 4 fue encontrado en *R. prolixus* silvestres de los departamentos de Casanare y de Vichada y en *D. marsupialis* del departamento del Tolima.

T. cruzi presenta una estructura genética predominantemente clonal, con restringida recombinación de manera que diversas líneas celulares individuales persisten como genotipos clonales estables y se propagan a través de amplias regiones geográficas (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala 1988). El modelo clonal no significa que la recombinación esté totalmente ausente y, por el contrario, es compatible con la existencia de recombinación genética ocasional (Tibayrenc *et al.*, 1990; Machado & Ayala, 2001; Brisse *et al.*, 2003).

En el caso de *T. rangeli*, los estudios preliminares de minisatélites de DNA mostraron diferencias genéticas entre las cepas del sureste de Brasil y las aisladas en Honduras, Colombia y Venezuela (Macedo *et al.*, 1993). Vallejo *et al.* (1994) analizaron los polimorfismos del kDNA encontrando un minicírculo denominado KP1, el cual fue detectado en las cepas de *T. rangeli* aisladas en Colombia, Honduras y Venezuela pero no en las cepas aisladas al sureste de Brasil. Una divergencia genética similar entre estos dos grupos fue mostrada por Steindel *et al.* (1994) usando análisis de isoenzimas y RAPD. Una conclusión similar fue obtenida con el análisis del cariotipo molecular de varias cepas de *T. rangeli* revelando la existencia de

polimorfismo cromosómico (Toaldo *et al.*, 2001). Utilizando amplificación del kDNA con los primeros S35/S36/KP1L se han detectado dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes. Un grupo de cepas presentan tres clases de minicírculos de kDNA denominados KP1, KP2 y KP3 (*T. rangeli* KP1+), mientras que otro grupo presenta solamente los minicírculos KP2 y KP3 (*T. rangeli* KP1-) (Vallejo *et al.*, 2002, 2003, 2007; Urrea *et al.*, 2005).

La caracterización de 80 cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *R. neglectus*, *R. prolixus*, *P. megistus*, *D. marsupialis*, perro y humano mostró el dimorfismo de cepas KP1(+) y KP1 (-) (Vallejo *et al.*, 2002; 2004). Por otro lado, utilizando dos marcadores independientes: kDNA (Vallejo *et al.*, 2002) y el espaciador intergénico del gen minixón (Grisard *et al.*, 1999) en 66 cepas aisladas de glándulas salivares de diferentes especies de *Rhodnius*, se corroboró el dimorfismo del kDNA observándose que un producto de 380 pb de amplificación del mini-exón siempre se presentó asociado con los productos derivados de KP2 y KP3 de kDNA y un producto de 340 pb siempre se presentó asociado con los minicírculos KP1, KP2 y KP3. La ausencia de segregación entre estos dos marcadores moleculares independientes (nuclear y mitocondrial) sustenta dos hipótesis alternativas sobre el origen de los dos grupos de *T. rangeli*, pues por un lado podría tratarse de grupos con evolución clonal en la cual la reproducción sexual sería rara o inexistente o se trataría de grupos en proceso de especiación críptica (Vallejo *et al.*, 2003, 2004).

Recientes trabajos de caracterización de 53 cepas adicionales de *T. rangeli* de Centroamérica, Colombia, Venezuela y Brasil han mostrado de nuevo la existencia generalizada en diferentes regiones de América Latina del dimorfismo del kDNA que permite genotipificar a los aislados como *T. rangeli* KP1(+) o *T. rangeli* KP1(-) (Vallejo *et al.*, datos no publicados). Se espera que nuevas cepas aisladas de vectores o de nuevas regiones geográficas presenten uno de estos dos genotipos.

Nuevos polimorfismos moleculares fueron detectados en la secuencia líder (SL) y secuencias SSUrRNA en 61 aislados de *T. rangeli*, los cuales mostraron cuatro genotipos (A, B, C, D) (Maia da Silva *et al.*, 2004a, 2004b, 2007). Veintitrés de las 61 cepas de *T. rangeli* fueron aisladas de diferentes especies de *Rhodnius*. Los autores describen el genotipo A de la región noroccidental de Suramérica (Colombia y Venezuela), América Central (Honduras, Guatemala y Brasil (regiones occidental y oriental de la Amazonía). El genotipo A se observó asociado a *R. prolixus* y *R. robustus*. El genotipo B se encontró de manera exclusiva en la Amazonía brasilera, asociado a *R. brethesi* y se cree que en algunas regiones estaría asociado a *R. pictipes*. El genotipo B se encontró asociado a *R. pallescens* de Colombia y Panamá. El genotipo D estuvo representado por un único aislado SC58,

el cual se obtuvo por hemocultivo del roedor *Echimyus dasythrix* en el su-
reste brasileiro.

El análisis comparativo de los dos sistemas de genotipificación (kDNA y (SL, SSU-rRNA) indica que el linaje A corresponde a cepas de *T. rangeli* KP1(+) y que el linaje C corresponde a cepas de *T. rangeli* KP1(-). La cepa SC58 de Brasil, correspondiente al linaje D, mostró el perfil de *T. rangeli* KP1(-). Se desconoce el perfil del kDNA de las cepas del linaje B, aisladas de la región del Amazonas y se espera que su caracterización corresponda a uno de los dos grupos *T. rangeli* KP1(+) o *T. rangeli* KP1(-); cualquiera que sea este resultado, podría arrojar importante información sobre el significado de la presencia o ausencia del minicírculo de kDNA de 1764 bp (KP1) y las relaciones filogenéticas entre los grupos KP1(+) y KP1(-).

Asociaciones entre *T. cruzi*, *T. rangeli* y triatominos

Numerosos trabajos indican que *T. cruzi* II (Z2) predomina en los ciclos de transmisión doméstica en los países del cono sur de América del Sur (Gaunt & Miles, 2000). En los países del norte de Suramérica predomina la transmisión de *T. cruzi* I (Z1) en ambientes domésticos y silvestres (Botero *et al.*, 2007). Por otro lado, numerosos aislamientos de *T. cruzi* I (Z1) en diferentes regiones de América Latina, muestran una fuerte asociación entre especies de *Rhodnius*, *T. cruzi* I (Z1) y *Didelphys*. La subpoblación de *T. cruzi* Z3 se ha asociado en la cuenca del Amazonas con el armadillo *Dasypus novemcinctus* y el marsupial *Monodelphis brevicaudata* y con *P. geniculatus*, comúnmente encontrado en madrigueras de armadillos (Povoa *et al.*, 1984).

Para el caso de *T. rangeli*, la caracterización de cepas aisladas de las especies de *Rhodnius* del grupo «*pallenscens*» (*pallenscens*, *colombiensis*, *ecuadoriensis*) presentó el perfil de *T. rangeli* (KP1-), mientras que las cepas aisladas del grupo «*prolixus*» (*prolixus*, *neglectus*) presentaron el perfil de *T. rangeli* (KP1+), indicando una asociación evolutiva entre las subpoblaciones de *T. rangeli* y los grupos de especies de *Rhodnius* (Urrea *et al.*, 2005; Vallejo *et al.*, 2007).

Empleando análisis de RAPD se caracterizaron 29 cepas de *T. rangeli* aisladas de *Rhodnius prolixus*, *R. pallenscens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *Bradypus variegatus*, *Tylomys miriae* y *Saimiri sciureus*. El dendrograma generado mostró tres ramificaciones correspondientes a los grupos A, B y C. Adicionalmente el grupo C se subdividió en tres subpoblaciones correspondientes a las cepas aisladas de *R. pallenscens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. Los mismos agrupamientos se observaron al comparar las secuencias del espaciador del gen minicírculo de las mismas 29 cepas de *T. rangeli* (Urrea *et al.*, datos no publicados) (Figura 1).

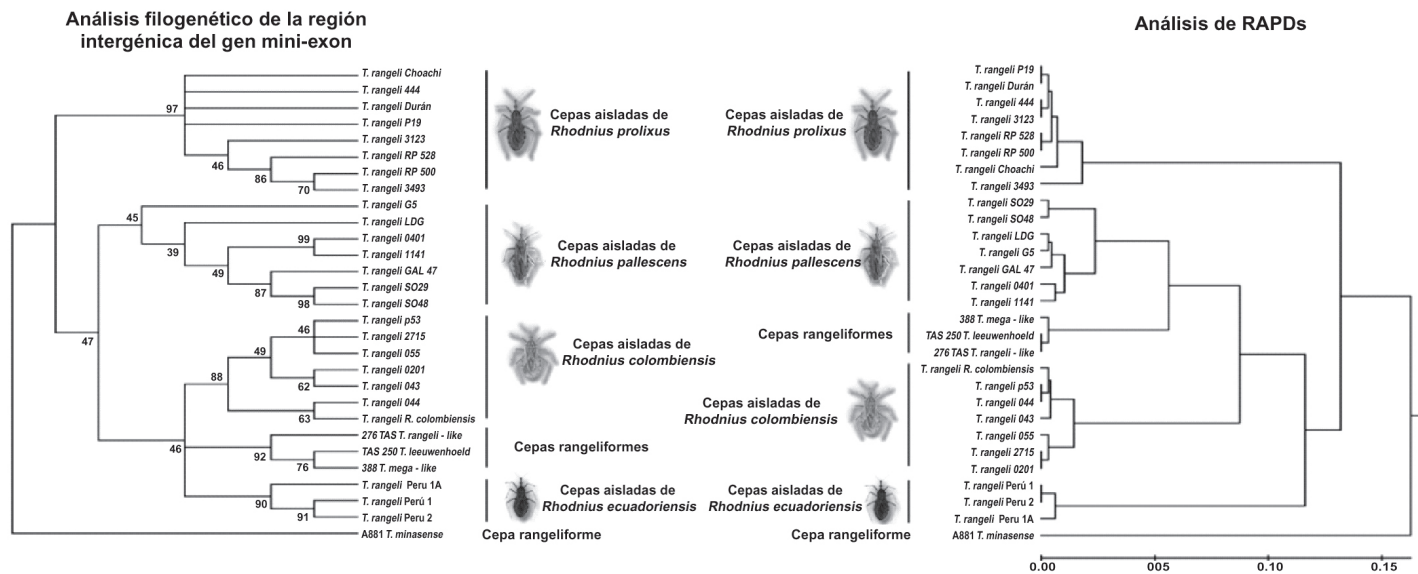


Figura 1. Dendrogramas obtenidos a partir de: 1) comparación de las secuencias de la región intergénica del gen minixon de 25 cepas de *T. rangeli* y 2) utilizando 13 iniciadores para generar RAPD de las mismas 25 cepas de *T. rangeli* aisladas de *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. En el análisis se incluyeron cuatro cepas de tripanosomas rangeliformes aislados de reservorios vertebrados, para un total de 29 cepas.

Estos resultados, en unión con otros obtenidos en nuestro laboratorio, señalan que KP1(+) y KP1(-) están asociados a vectores específicos del género *Rhodnius* de manera que, en condiciones naturales, las especies que transmiten KP1(+) son incapaces de transmitir a las subpoblaciones KP1(-) y viceversa. Se espera que cualquier nueva cepa de *T. rangeli* corresponda al linaje KP1(+) o KP1(-) y que dentro de los dos linajes aparezcan nuevos grupos definidos por la variabilidad del gen minixon o por análisis de RAPD.

Por otro lado, la caracterización de cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes especies de *Rhodnius*, utilizando la variabilidad de los genes SL y SSU-rRNA mostraron también una asociación de genotipos de *T. rangeli* con especies del género *Rhodnius* (Maia da Silva *et al.*, 2007).

El papel de los triatominos en la transmisión selectiva de *T. cruzi* y *T. rangeli*

Son pocos los estudios sobre la transmisión diferencial subpoblaciones de *T. cruzi*, en diferentes especies de triatominos. Sin embargo, De Lana *et al.* (1998) y Da Silveira *et al.* (2000) demostraron por técnicas de PCR e hibridización, que *T. infestans* no presenta la misma eficiencia en la transmisión de diferentes genotipos clonales de *T. cruzi*, evidenciando una transmisión selectiva de los mismos. Recientemente Campos *et al.* (2007) demostraron que *Mepraia spinolai* transmite mayor número de subpoblaciones (TcI, TcIIb, TcIIId, TcIIe) que *T. infestans*.

En relación con *T. rangeli*, D'Alessandro (1976) mostró que la mayoría de las cepas aisladas en Colombia y en Venezuela se desarrollan en *R. prolixus* con excepción de las cepas aisladas de *R. pallescens* o de *R. ecuadoriensis*, las cuales no producen infección en *R. prolixus* a nivel de glándulas salivares. Así mismo, cepas aisladas de *R. prolixus* en Colombia y Costa Rica no infectan a *R. pallescens* o *R. ecuadoriensis*. Estos resultados sugieren que en la naturaleza, las especies de *Rhodnius* son susceptibles solamente a ciertos grupos del parásito. De conformidad con lo anterior, el vector sería un filtro biológico de determinadas poblaciones. Esta hipótesis sobre el papel de los vectores como filtros biológicos en la transmisión de subpoblaciones genéticamente definidas de *T. rangeli* resultó fortalecida una vez se examinaron 150 *R. colombiensis* y 777 *R. prolixus*, los cuales fueron disectados individualmente para estudiar el contenido intestinal, la hemolinfa y las glándulas salivares (Vallejo *et al.*, 2004). En los individuos positivos para *T. rangeli* se realizó la reacción en cadena de la polimerasa al DNA extraído de los flagelados del intestino, hemolinfa y glándulas salivares, para identificar a *T. rangeli* KP1(+) y KP1(-). Los resultados mostraron que los individuos de

R. colombiensis en condiciones naturales pueden infectarse con *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+), pero solo transmiten a través de la picadura a KP1(-). De igual manera los individuos de *R. prolixus*, se infectan con *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+), pero solo transmiten a través de la picadura a las subpoblaciones KP1(+) (Vallejo *et al.*, 2002, 2003).

La transmisión selectiva de poblaciones de *T. rangeli* ha sido estudiada en nuestro laboratorio en condiciones experimentales, utilizando mezclas de formas de cultivo (KP1+ / KP1-), cuyos resultados mostraron que a partir de las mezclas, finalmente, a las glándulas salivares de *R. prolixus* solo llega KP1+ y a las glándulas salivares de *R. colombiensis* solo llega KP1(-) (Rodríguez *et al.*, datos no mostrados).

De acuerdo con Maia da Silva *et al.* (2007) y Vallejo *et al.* (2007), las cepas de *T. rangeli* aisladas de las especies de *Rhodnius* del grupo «*pallescens*» (*pallescens*, *colombiensis*, *ecuadoriensis*) transmiten selectivamente a *T. rangeli* KP1(-) o grupo C, mientras que las cepas aisladas del grupo «*prolixus*» (*prolixus*, *robustus*, *neglectus*) transmiten selectivamente a *T. rangeli* KP1(+) o al grupo A, indicando una asociación evolutiva entre las subpoblaciones de *T. rangeli* y estos grupos de especies de *Rhodnius*. Aunque se desconoce el perfil de kDNA del grupo B de *T. rangeli* aislado de los vectores del Amazonas (*bretesi*, posiblemente *pictipes*, *stali*), su caracterización abriría nuevas perspectivas para estudiar la interacción entre *T. cruzi* o *T. rangeli* y estos vectores, cuyos resultados podrían arrojar evidencias sobre la evolución y dispersión de las especies de *Rhodnius* en América.

Previos estudios sobre la interacción *R. prolixus*-*T. rangeli* han señalado diversos mecanismos humorales y celulares por parte del vector que actuarían como factores limitantes del parásito. De estos mecanismos se destacan la existencia de lisozimas y factores tripanolíticos (Mello *et al.*, 1995, 1999; Gomes *et al.*, 1999), activación del sistema profenoloxidasa (Mello *et al.*, 1995, Gomes *et al.*, 1999, Garcia *et al.*, 2004), fagocitosis y microaglutinación por hemocitos (Mello *et al.* 1995, Garcia *et al.* 2004), producción de óxido nítrico y superóxido nítrico (Whitten *et al.*, 2001). Recientemente se reportó que la incubación de la hemolinfa de *R. prolixus* con las cepas de *T. rangeli* evidenciaba la existencia de una proteína tripanolítica contra *T. rangeli* KP1(-) (Pulido *et al.*, 2008). Esta actividad tripanolítica ha sido observada sobre cepas de *T. rangeli* KP1(-) aisladas de *R. pallescens* de Colombia y Panamá, *R. colombiensis* de Colombia y *R. ecuadoriensis* del Perú (Sánchez *et al.*, 2005). Adicionalmente a la hemolinfa de *R. prolixus*, también hemos observado la misma actividad tripanolítica contra las cepas KP1(-) en hemolinfa de *R. robustus* y de *R. stali*, lo cual indica una adaptación específica por parte de la subpoblación *T. rangeli* KP1(+) a vectores del complejo “*prolixus*” y de los vectores de la “floresta amazónica” y de la subpoblación *T. rangeli* KP1(-) a

vectores del grupo “pallescens” (*pallescens*, *colombiensis*, *ecuadoriensis*) (Zabala *et al.*, datos no publicados). Por otro lado, es importante resaltar la sobrevivencia de las poblaciones de *T. rangeli* KP1(+) en la hemolinfa de *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis* sin invasión de las glándulas salivares, lo que evidencia una ausencia de actividad lítica en la hemolinfa de estos vectores y una posible restricción de desarrollo de las formas KP1(+) a nivel de glándulas salivares. De otra parte, el factor lítico de la hemolinfa de *R. prolixus* estaría actuando como una barrera biológica en las especies del complejo *prolixus* que impediría el desarrollo y la transmisión de las formas *T. rangeli* KP1(-), confirmando el papel de filtro biológico que cumplen los vectores en la dinámica de transmisión de los parásitos y la estrecha asociación coevolutiva entre las dos subpoblaciones de *T. rangeli* y las dos líneas evolutivas del género *Rhodnius*.

Conclusiones

Los estudios sobre la interacción entre genotipos de *T. cruzi* y *T. rangeli* y las diferentes especies de triatomos, así como los mecanismos que regulan la transmisión y su dispersión son importantes elementos para la documentación de la epidemiología de los tripanosomas que en Latinoamérica infectan al hombre. A partir de este enfoque, será posible establecer cuáles subpoblaciones de tripanosomas son transmitidas por vectores específicos en una determinada área geográfica. Por otro lado, los estudios de la interacción tripanosoma-triatomino permitirán identificar procesos coevolutivos para fortalecer las hipótesis acerca de la evolución y dispersión de las subpoblaciones de parásitos y de los insectos vectores de *T. cruzi* en América o para identificar los mecanismos que facilitan o impiden la transmisión de los parásitos en diferentes especies de vectores, los cuales podrían ser aplicables al control de la Tripanosomiasis Americana.

Agradecimientos

El presente trabajo recibió financiación del Instituto Colombiano Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS), proyecto 1105-05-16919 y del Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

Referencias

Anonymus. 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Supl. II): 429-432.

- Botero LA, Mejía AM, Triana O. 2007. Biological and genetic characterization of two Colombian clones of *Trypanosoma cruzi* groups I and II. *Biomedica* 27 Suppl 1: 64-74.
- Brandão A, Fernandes O. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Exp Parasitol* 112(4): 247-252.
- Brandao A, Samudio F, Fernandes O, Calzada JE, Sousa OE. 2008. Genotyping of Panamanian *Trypanosoma cruzi* stocks using the calmodulin 3'UTR polymorphisms. *Parasitol Res* 102(3): 523-526.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30: 35-44.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJP, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. 2003. Evidence of genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 173-183.
- Campos R, Acuña-Retamar M, Botto-Mahan C, Ortiz S, Cattán PE, Solari A. 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop* 104(1): 25-29.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. 2002. Genetic diversity of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 877-880.
- de Lana M, da Silveira Pinto A, Barnabé C, Quesney V, Noël S, Tibayrenc M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 90(1): 20-25.
- da Silveira Pinto A, de Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M. 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int J Parasitol* 30(7): 843-848.
- D'Alessandro A. 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 p. 327-493. In VHR Lumsden & DA Evans (eds), *Biology of Kinetoplastida VI*, Academic Press, London, New York and San Francisco.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TB, Degraeve W, Zingales B, Campbell DA, Coura

- JR. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. *Am J Trop Med Hyg* 58: 807-811.
- Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbell DA, Zingales B, Coura JR. 1999. Population heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 195-197.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mondonga B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barrett TB, Campbell DA, Coura JR. 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 97-99.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sánchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA. 2008. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses previously neglected. *Tropical Diseases* 2(4): e210.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- García ES, Machado EM, Azambuja P. 2004. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol* 50: 157-165.
- Gaunt M, Miles M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
- Gomes SA, Feder D, Thomas NE, Garcia ES, Azambuja P. 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli* *in vivo* and *in vitro* experiments. *J Invertebr Pathol* 73: 289-293.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitólogo* 118: 375-382.
- Guhl F and Vallejo GA. 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: An updated review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(4): 435-442.
- Henriksson J, Asiund L, Macina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U. 1990. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 42: 213-223.

- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 2007; 7(4): 535-539.
- Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SDJ. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol* 55: 147-154.
- Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SDJ. 1993. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ. (Eds.). *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, pp. 321-329.
- Macedo AM, Pimenta J, Aguiar RS, Melo AIR, Chiari E, Zingales B, Pena SDJ, Oliveira RP. 2001. Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 407-413.
- Machado CA, Ayala FJ. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 98: 7396-7401.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MMG. 2004a. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology* 128: 283-294.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira ACV, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MMG. 2004b. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129: 549-561.
- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MM. 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol* 16(16): 3361-3373.
- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus* J Invertebr Pathol 65: 261-268.
- Mello CB, Nigam Y, Garcia ES, Azambuja P, Newton RP, Ratcliffe NA. 1999. Studies on a hemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Exp Parasitol* 91: 289-296.

- Mendonça MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TB, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitólogo* 124: 177-184.
- Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. 1978. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas's disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-882.
- Morel C, Chiari E, Plessmann Camargo E, Marrei DM, Romanha AJ, Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF. 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect Genet Evol* 7(5): 587-593.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ. 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3776-3780.
- Oliveira RP, Mello AIR, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. 1999. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 65-70.
- Póvoa MM, De Sousa AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA. 1984. Chagas disease in the Amazon Basin IV. Hosts records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 479-487.
- Pulido XC, Pérez G, Vallejo GA. 2008. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(2): 172-179.
- Rojas W, Caro MA, Lopera JG, Triana O, Dib JC, Bedoya G. 2007. Analysis of polymorphisms in the trypanothione reductase and cruzipain genes in Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica* 27 (Suppl 1): 50-63.
- Rozas M, De Doncker S, Adaui V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC. 2007a. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis* 195: 1381-1388.
- Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán PE, Solari A. 2007b. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *Am J Trop Med Hyg* 77: 647-653.

- Salvatella R, Franca Rodríguez ME, Curto de Casas SI, Barata JMS, Carcavallo RU. 1998. Human Environment: Dwellings and Peridomiliary sites. In: Atlas of Chagas Disease in the Americas. Vol II Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H (Edits). Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 601-619.
- Sánchez IP, Pulido XC, Carranza JC, Triana O, Vallejo GA. 2005. Inmunidad natural de *R. prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) frente a la infección con *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* KP1(-) aislados de *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. Rev Asoc Col Cien Biol 17: 108-118.
- Schofield CJ. 2004. Evolution and dispersal of *Triatoma* and *Rhodnius* in the Americas. IX European Multicolloquium of Parasitology. Valencia, Spain 18-23 July 2004, Programme and Abstracts pp. 179-180.
- Schofield CJ, Dujardin JP. 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actualidades Biológicas 21: 183-197.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Bernabé CH, Tibayrenc M, Breniere F, Campbell DA, Zingales B. 1996. Two independent nuclear markers define two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi* and may suggest genetic transfer between them. Mol Biochem Parasitol 83: 141-152.
- Steindel M, Días Neto E, de Menezes C, Romanha AJ, Simpson AJG. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol Biochem Parasitol 60: 71-80.
- Steindel M, Dias-Neto E, Carvalho-Pinto CJ, Grisard E, Menezes C, Murta SMF, Simpson AJG, Romanha AJ. 1994. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* Strains. J. Euk. Microbiol 41: 261-267.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci USA 83: 115-119.
- Tibayrenc M. & Ayala FJ. 1988. Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas ' disease. Evolution 42: 277-292.
- Tibayrenc M, Kjelberg F, Ayala FJ. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 2414-2418.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Bernabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proc Anti Acad Sci USA 90: 1335-1339.
- Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC. 2001. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding 0-tubulina, Cisteina

- Proteinase, HSP 70 and Actin in *Trypanosoma rangeli*. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 113-121.
- Urrea DA, Carranza JC, Cuba-Cuba CA, Gurgel-Goncalves R, Guhl E, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA. 2005. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Perú, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panamá, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. Infection, Genetics and Evolution 5(2): 123-129.
- Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. Mol Bioch Parasitol 67: 245-253.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, Gualtero D, Castañeda N, Silva JC, Steindel M. 2002. KDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin- America. Acta Trópica 81(1): 77-82.
- Vallejo GA, Guhl R, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard CE. 2003. Parity between kinetoplast DNA and minixon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. Infection, Genetics and Evolution 3: 39-45.
- Vallejo GA, Guhl FR, Carranza JC, Cuba-Cuba CA, Schofield CJ, Triana O. 2004. Interaction between *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* spp: A model for molecular epidemiology in American trypanosomiasis. Medimond Monduzzi International Proceedings. Bologna, Italy. IMedimond E720R9137 pp. 121-127.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, Pérez G, Ortiz PA, Marín DH, Villa M, Suárez J, Sánchez IP, Pulido X, Rodríguez IB, Lozano LE, Urrea DA, Rivera FA, Cuba CC, Clavijo JA. 2007. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. Biomédica 27: 110-118.
- Whitten MM, Mello CB, Gomes SA, Nigam Y, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *R. prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. Exp Parasitol 98: 44-57.

COMENTARIOS AL TRABAJO DEL PROFESOR VALLEJO

Repercusión del trabajo "Aspectos coevolutivos de la interacción Trypanosoma-vector sobre las poblaciones humanas afectadas por Trypanosoma cruzi y T. rangeli en Colombia."

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas en América, se encuentra distribuido entre México y Argentina en donde se estima la existencia de 13 a 15 millones de personas infectadas, de las cuales entre el 15 y el 30% de ellas desarrollan cardiopatías o alteraciones digestivas. Trypanosoma rangeli es el segundo tripanosoma que infecta al hombre en diferentes países latinoamericanos y aunque no presenta patogenicidad para el humano, en estos países los vertebrados y los triatomíneos vectores se encuentran infectados con las dos especies de tripanosomas. Los recientes desarrollos de la Biología Molecular, entre los que se destacan los métodos de genotipificación y la secuenciación de ADN, han aportado nuevos abordajes para el estudio de la interacción parásito-vector-hospedero de diferentes subpoblaciones de parásitos. Los autores del presente trabajo, además de estudiar a T. cruzi y T. rangeli, también estudian las interacciones entre el parásito, el vector y el hospedador, tanto a nivel individual, poblacional, como a nivel de especie. Se trata entonces del análisis de un fenómeno fundamentalmente evolutivo en el cual los desarrollos del tripanosoma, del vector y del vertebrado evolucionan conjuntamente. Este fenómeno constituye la base del concepto denominado coevolución. Por otro lado, durante los últimos 35 años, los grupos de investigación en diferentes países latinoamericanos han mostrado una extensa variabilidad bioquímica, genética y molecular de las poblaciones de T. cruzi y T. rangeli en diferentes países latinoamericanos. Adicionalmente, algunos triatomíneos vectores de estos flagelados también han mostrado variabilidad biológica, bioquímica, genética y molecular. Los autores del presente trabajo han utilizado marcadores de ADN nuclear (24S a rRNA, 18S rRNA, ITS1, ITS2, miniexón) y de ADN mitocondrial (NADH7, kDNA), entre otros, para identificar los genotipos de los tripanosomas que circulan en el hombre, en los insectos vectores y en los vertebrados reservorios en Colombia y en América Latina. La utilización de los modernos métodos filogenéticos sobre las secuencias de genes y espaciadores de ADN han permitido la obtención de filogenias comparables de parásitos, y hospedadores, proporcionando así un camino para el análisis de la coevolución parásito-vector-vertebrado. Con estas modernas metodologías este grupo de investigación ha identificado algunos mecanismos en los triatomíneos vectores utilizados para contrarrestar a nivel molecular la acción de los parásitos, aportando nuevos enfoques para el estudio de la coevolución tripanosoma-vector-hospedador y su futura aplicación como biomoléculas antiparasitarias. Fue así como el estudio de la interacción T. rangeli-Rhodnius spp logró identificar un factor tripanolítico en la hemolinfa de Rhodnius prolixus que explica claramente la transmisión selectiva de las poblaciones KP1+ de este parásito por parte del vector, constituyéndose así en un excelente modelo para el estudio de la coevolución

parásito-vector y para el estudio de los mecanismos que favorecen la transmisión selectiva de subpoblaciones del parásito.

En resumen, el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima, en colaboración con varios grupos de investigación colombianos y del exterior han trabajado en los últimos 12 años sobre la epidemiología molecular de Trypanosoma cruzi y T. rangeli y algunos de sus más importantes vectores triatominos. Asumiendo que la variabilidad de los parásitos y de sus principales especies vectoras podría explicar total o parcialmente algunas de las diferencias en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en América, estos investigadores han orientado sus esfuerzos para resolver entre otros los siguientes interrogantes:

- ¿Cuáles genotipos de T. cruzi pueden correlacionarse con los ciclos domésticos, peridomésticos y silvestres en Colombia?*
- ¿Cuáles genotipos de T. cruzi pueden correlacionarse con las formas clínicas de la enfermedad de Chagas en Colombia?*
- ¿Cuáles vectores o reservorios albergan estos genotipos de T. cruzi y cuál es su distribución geográfica en Colombia?*
- ¿Cuáles genotipos de T. rangeli que puedan producir infecciones humanas en Colombia?*
- ¿Cuáles vectores o reservorios albergan estos genotipos de T. rangeli y cuál es su distribución geográfica en Colombia?*
- ¿Cuáles mecanismos moleculares y celulares intervienen en los fenómenos de coevolución entre los diferentes vectores triatominos y las sub-poblaciones de T. cruzi y T. rangeli en Colombia?*

Sin duda, las respuestas a estos interrogantes permitirán conocer en detalle la epidemiología molecular de la Tripanosomiasis Americana para obtener información útil aplicable al manejo, al control y a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas en el territorio colombiano.

***Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae): una comparación de las poblaciones colombianas y panameñas, basada en su ecología, epidemiología, morfometría y biología molecular**

Nicolás Jaramillo O.*¹, Sair Arboleda Sánchez¹, Duverney Chaverra¹,
Harling Caro Riaño^{1, 2}, Andrés Gómez Palacio¹, Leysa Gómez¹,
Azael Saldaña³, José Calzada³, Lorenzo Cáceres³

Resumen

Rhodnius pallescens es el principal vector de *Trypanosoma cruzi* en la república de Panamá, pero uno secundario en Colombia. ¿Tales diferencias en importancia vectorial entre ambos países se correlacionan con la variación genética y fenotípica y su interacción con el ambiente? Con el fin de aportar a la respuesta se estudiaron por métodos epidemiológicos, morfométricos, cromosómicos, moleculares y de sistemas de información basados en sensores remotos, insectos colectados en 27 municipios de nueve departamentos colombianos, en tres municipios de dos provincias de Panamá y de colonias de laboratorio.

Varios de los resultados apuntaron a diferencias intrínsecas entre las poblaciones colombianas y panameñas. La variación macroclimática, la variación en las secuencias del gen mitocondrial *Cytb* y las prevalencias de la infección mostraron las evidencias más fuertes de que existen diferencias

* Autor para correspondencia: Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Sede de Investigaciones Universitarias –SIU–. Calle 62 No. 52-59 laboratorio 620. Medellín, Colombia. Tel: +57-4-219 6521, Fax: +57-4-219 6565. Correo electrónico: nicolas.jaramillo@siu.udea.edu.co

¹ Grupo de Chagas, Instituto de Biología, Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Laboratoire de Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses (GEMI), UMR CNRS-IRD, 2724 UR 165, Montpellier, Francia.

³ Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá, Panamá.

infra-específicas entre ambos países. La variación morfológica y la citogenética no mostraron diferencias claras entre ambas regiones; pero sí patrones que se pudieron correlacionar con la variación ambiental o geográfica. Estos resultados estimulan nuevas investigaciones dirigidas a explorar más detalladamente los grados de correspondencia entre la variación genética y fenotípica con las posibles diferencias en la capacidad vectorial, lo cual, de confirmarse, tendría importantes repercusiones epidemiológicas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Rhodnius pallescens*, Triatominae, morfometría, citogenética, sensores remotos, mtCytb, Colombia, Panamá.

Abstract

Rhodnius pallescens is the main vector of *Trypanosoma cruzi* in Panama, but a secondary one in Colombia. Are those differences between the two countries correlated with genetic and phenotypic variation, and their interaction with environment? In order to contribute to the response, we studied by epidemiological methods, morphometrics, chromosomal, molecular, and information systems based on remote sensing, insects collected in 27 municipalities of nine Colombian states, three municipalities of two Panamanian states, and laboratory colonies.

Several of the results pointed to intrinsic differences between Colombian and Panamanian populations. Variation of macro-climate, of mitochondrial sequences of the gene *Cytb*, and the prevalence of infection showed the strongest evidence of intra-specific differences between both countries. Morphometrics and cytogenetics showed no clear differences between the two regions, but they show patterns of variation correlated with environmental or geographic variation. These results encourage further research aimed at exploring in greater detail the levels of correspondence between genetic and phenotypic variation with the possible differences in vectorial capacity, which would have major epidemiological implications.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Rhodnius pallescens*, Triatominae, morphometrics, cytogenetics, remote sensors, mtCytb, Colombia, Panamá.

Introducción

La enfermedad de Chagas continúa siendo un problema importante de salud pública en América Latina; según las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud presenta una prevalencia de 7'694.500 perso-

nas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico, y 28 millones viven en zonas de riesgo (Guhl & Lazdins-Helds, 2007).

Los programas de control se han centrado en la interrupción de la transmisión del parásito por transfusiones sanguíneas y por el insecto vector, lo cual ha tenido un relativo éxito en los países del Cono Sur (Silveira *et al.*, 2002). El control vectorial por rociamiento intra-domiciliario con insecticidas ha demostrado ser eficaz para aquellas especies de hábitos fundamentalmente domésticos, sin influencia de poblaciones extra-domiciliares. Sin embargo, muchas especies presentan patrones de transmisión extra-domiciliar y además muestran unas características biológicas y ecológicas complejas. Por ello se hace indispensable esclarecer el comportamiento biológico, la dispersión y la genética de poblaciones peri-domésticas presentes en extensas áreas (Guhl & Lazdins-Helds, 2007). En algunas regiones de los países Andinos no se ha implementado un programa de control vectorial o éste se ha interrumpido debido en gran parte a la falta de conocimiento acerca de las características biológicas de las poblaciones de triatomíneos y la consecuente incertidumbre acerca de las estrategias más apropiadas para el control (Guhl, 2007).

Rhodnius pallescens es una de las especies que requieren tal esclarecimiento. Es un vector secundario de *T. cruzi* en Colombia, pero es el principal transmisor de este parásito en la república de Panamá (Calzada *et al.*, 2006; Guhl *et al.*, 2007); a causa de lo cual la Organización Mundial de la Salud lo tiene entre los objetivos de control (Guhl & Lazdins-Helds, 2007). Por tales motivos nos propusimos estudiar esta especie utilizando métodos epidemiológicos, morfométricos, cromosómicos, moleculares y de sistemas de información basados en sensores remotos con el objetivo de contribuir a explicar las posibles diferencias infra-específicas que se asocian con diferencias en la importancia vectorial.

Materiales y métodos

Epidemiología: entre 1989 y 2008 se colectaron *R. pallescens* en 27 municipios de 9 departamentos colombianos (Tabla 1). Los insectos se capturaron mediante búsqueda activa en el peri- e intra-domicilio y en el hábitat silvestre disecando palmas y usando trampas de cebo animal (Noireau). Los insectos colectados se transportaron al laboratorio de Chagas donde, en los que llegaron vivos, se evaluó la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* usando los protocolos estándar. En dos municipios (San Carlos, departamento de Antioquia, y San Onofre, departamento de Sucre) se hicieron estudios parasitológicos y serológicos de reservorios silvestres y domésticos. En las mismas localidades se evaluaron por serología (ELISA e IFI) 48 personas.

Tabla 1. Registro detallado del número de *Rhodnius pallescens* colectados por el grupo de Chagas de la Universidad de Antioquia entre 1989 y 2008 y los resultados de los análisis para detectar infecciones por trypanosomas.

DEPARTAMENTO: municipios	Domicilios / peri-domicilios infestados	Palmas infestadas / evaluadas	Insectos capturados domicilio / peridomicilio / palmas	Insectos evaluados	Infección por <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> y mixta
ANTIOQUIA: Carepa, Necoclí, San Carlos, Sonsón, Vegachí	12-abr	36 / 98	36 / 146 / 330	251	44 / 4 / 0
BOLIVAR: Cicuco, Margarita, Mompós, San Fernando, Talaigua Nuevo.	0 / 0	nov-16	0 / 0 / 188	90	51 / 0 / 0
CALDAS: Norcasia, Victoria	0 / 0	10-oct	0 / 0 / 208	36	9 / 0 / 0
CESAR: Bosconia	1 / 0	0 / 0	1 / 0 / 0	0	0 / 0 / 0
CHOCO: Acandí, San Francisco, Triganá	4 / 0	sep-16	4 / 0 / 84	72	44 / 0 / 0
CORDOBA: San Bernardo del Viento	1 / 0	06-ago	1 / 0 / 42	42	17/01/2001
GUAJIRA: Dibulla	0 / 1	0 / 0	0 / 1 / 0	1	0 / 0 / 0
MAGDALENA: Guamal, Puente Carretero, San Sebastián, San Zenón, Santa Marta	0 / 0	22 / 22	0 / 0 / 277	124	34 / 0 / 0
SUCRE: Galeras, San Antero, San Onofre	01-ene	36 / 48	5 / 2 / 441	391	61 / 6 / 3
TOTAL	19-jun	130 / 218	47 / 149 / 1570	1007	274 / 11 / 6

Las personas y reservorios se seleccionaron por encontrarse en casas y palmas infestadas con *R. pallescens*.

Sistemas de información geográfica usando sensores remotos: se utilizaron datos georreferenciados de 101 sitios en donde se ha colectado la especie a lo largo de la distribución conocida (seis en Nicaragua, ocho en Costa Rica, 27 en Panamá y 60 en Colombia) y 100 datos de ausencia, definidos porque en ellos se ha hecho búsqueda de triatominos y se han encontrado especies diferentes a *R. pallescens*.

Como variables ambientales se utilizaron imágenes producidas por el sensor AVHRR, el cual se encuentra a bordo de satélites meteorológicos de la serie NOAA. Las imágenes mensuales comprenden un periodo de 18 años (1982-2000) y corresponden a los valores promedio, mínimo, máximo, tres fases anuales y la varianza del índice normalizado de vegetación (NDVI), la temperatura de la superficie de la tierra (LST), la temperatura del aire

(TAIR), la radiación del infrarrojo medio (MIR) y el déficit de presión de vapor (VPD). Adicionalmente se incluyó una variable de elevación digital (DEM). El gran número de variables se redujo a 56 mediante análisis temporal de Fourier, para lo cual se contó con la ayuda del grupo TALA de la Universidad de Oxford.

La posible asociación entre los sitios de presencia del vector y las variables ambientales se exploró mediante un análisis discriminante estándar (AD) y más ampliamente mediante análisis discriminante por pasos hacia delante (ADf). Para el AD se utilizó el 100% de las variables; mientras que los ADf se hicieron sobre cinco matrices, cada una con el 75% de los datos originales seleccionados al azar. Las funciones de clasificación de presencia y ausencia para las variables seleccionadas en cada uno de los cinco ADf fueron utilizadas para construir un mapa de presencias y uno de ausencias, respectivamente. Las imágenes de los mapas se sometieron a un procedimiento de escogencia multidimensional utilizando el programa IDRISI Andes (Clark, 2006), obteniéndose cinco modelos de distribución potencial de *R. pallezens*. El modelo final se construyó utilizando las áreas que fueron predichas como presencias en los cinco modelos. Finalmente se estudió la variación ambiental al interior del conjunto de sitios de presencias, para lo cual se calcularon distancias de Ward (1963) entre los valores ambientales de cada sitio de presencia y con ellas se construyó un dendrograma por el método UPGMA (Sokal & Sneath, 1972). El dendrograma permitió evaluar si existe un agrupamiento natural de los sitios de presencia dado por las variables ambientales.

Análisis morfológico: este análisis se dividió en dos partes: en la primera se utilizó para evaluar la diferenciación geográfica y en la segunda, la plasticidad fenotípica ante diferentes condiciones de densidad poblacional y ritmo de alimentación.

Para el análisis de diferenciación geográfica se utilizaron cabezas y alas de insectos colectados en los municipios colombianos: Acandí (n=30; 8, 523333333 N, -77, 27194444 W), Galeras (n=20; 9, 163055556 N, -75, 0525 W), San Onofre (n= 35; 9, 74 N -75, 52777778 W), Mompós (n=29; 9, 229166667 N, -74, 33555556 W), Norcasia (n=20; 5, 5666667 N, -74, 8833333 W), San Bernardo del Viento (n=15; 9, 35611111 N, -75, 95583333 W) y Vegachí (n=14; 6, 773055556 N, -74, 80166667 W), y los Panameños: Cerro Cama (n=18; 9, 029991667 N, -79, 904625 W), Chilibre (n=25; 9, 15 N -79, 61666667 W) y Metetí (n=17; 8, 5 N, -77, 96666667 W) (Figura 3).

Para el análisis de la plasticidad fenotípica se tomaron al azar, de colonias de laboratorio, 320 ninfas de primer estadio, las cuales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro contenedores plásticos de 15, 6 x 15 x 18, 3 cm. Dos de ellos contenían 40 ninfas cada uno y otros dos 120 ninfas. Los insectos de

uno de los contenedores de 40 ninfas y el otro de 120 se alimentaron semanalmente por 35 minutos sobre gallina. Los otros dos contenedores de 40 y 120 ninfas se alimentaron mensualmente, de igual manera (en total cuatro tratamientos). Cuando alcanzaron la madurez sexual se sacrificaron y se disecaron sus cabezas y alas para ser analizadas por métodos de morfometría geométrica.

Para el estudio de diferenciación geográfica se seleccionaron nueve puntos anatómicos de las cabezas y trece de las alas. Para el estudio de plasticidad fenotípica se seleccionaron siete puntos de las cabezas y diez de las alas. Los puntos se digitalizaron a coordenadas cartesianas mediante un software especializado (Rohlf, 2008). Las coordenadas se procesaron mediante el Análisis generalizado de Procrustes (AGP), el cual genera variables que contienen toda la información biológica del tamaño y la conformación de las alas (Marcus *et al.*, 1996), la cual se analizó mediante estadísticas univariadas y multivariadas (ver párrafo siguiente). Debido al notable dimorfismo sexual de la especie, los análisis se hicieron separadamente para cada sexo.

La variación geográfica de tamaño se comparó entre poblaciones mediante ANOVA y con la temperatura promedio anual de los lugares de origen de las poblaciones mediante análisis de regresión lineal. La temperatura se calculó a partir de información provista por el sensor remoto AVHRR desde 1982 hasta el 2000.

La variación geográfica de la conformación alar se estudió mediante análisis de Relative Warps (Marcus *et al.*, 1996). Éste consiste en un estudio de componentes principales efectuados sobre las variables de conformación que se generaron durante el GPA. Se examinó visualmente la ordenación de los individuos sobre los dos primeros Relative Warps, que son los que explican la mayor parte de la variación de la conformación, y se evaluó cualitativamente si tal ordenación se relacionó con las distancias geográficas y las zonas de vida según Holdridge (1982). También se calcularon las distancias de Mahalanobis entre los centroides (promedios multivariados de la conformación) de las poblaciones y se evaluó la hipótesis de que tales distancias no son diferentes de las esperadas por el azar mediante la construcción de un modelo nulo con 1000 permutaciones.

Para el estudio de plasticidad fenotípica se evaluó la variación de tamaño y conformación entre tratamientos, mediante la prueba de Kruskal-Wallis y Mancova, respectivamente. Para el tamaño se evaluó visualmente la magnitud y dirección del cambio en gráficas de cuantiles. Un efecto significativo de la interacción en el Mancova informó que el cambio morfológico no fue igual entre los tratamientos, lo cual se interpretó como plasticidad fenotípica. En

estos casos se calculó la diferencia en las distancias euclidianas entre el factor densidad poblacional y el factor ritmo de alimentación. Adicionalmente se evaluó si había diferencias en la dirección del cambio fenotípico para lo cual se calculó el ángulo (arcoseno) de los vectores dados por las diferencias morfométricas entre tratamientos. Mediante 1000 permutaciones se evaluó si las diferencias en dirección y/o ángulo eran significativas.

Composición y variación genética: se utilizaron especímenes de campo colectados en palmas *Attalea butyracea* en diversas localidades de Colombia y Panamá. En la Tabla 2 se muestra la procedencia y el número de individuos analizados. Estos fueron los mismos individuos utilizados por Gómez-Palacio *et al.* (2008) para evaluar la citogenética; trabajo en el cual se detectó un polimorfismo cromosómico importante que permitió definir dos citotipos. La clasificación en citotipos también se muestra en la Tabla 2.

Para la cuantificación del contenido haploide del ADN se obtuvo de las gónadas extraídas de cada individuo (Pérez *et al.*, 1992) una suspensión celular, según lo reportado por Panzera *et al.* (2007), la cual fue teñida con Ioduro de Propidio (50 µg/ml). La determinación del contenido de ADN se calibró con una muestra de linfocitos humanos fijados en etanol/ácido acético, utilizando el valor calculado por núcleo diploide (2C) presentado por el Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano (IHGSC, 2001). El número de pares de bases se calculó utilizando la equivalencia de 1pg de ADN = 0, 978 × 10⁹ pb (Dolezel *et al.*, 2003). La medición del contenido celular de ADN se realizó en un Citómetro de Flujo Laser EPICS XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL) a 488 nm y 15 mW. El contenido de ADN en las células individuales se determinó a partir de histogramas lineales de la fluorescencia del Ioduro de Propidio (FL3). Para cada muestra se obtuvo la información de un mínimo de 10000 eventos utilizando el software del sistema (Beckman-Coulter).

Para el análisis de secuencias mitocondriales se amplificó y secuenció un fragmento de 682 pb del gen *mtCytb* (Monteiro *et al.*, 2003). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). La composición nucleotídica, el número de sitios polimórficos, la diversidad haplotípica y nucleotídica y la similaridad de las secuencias aminoacídicas putativas se estimaron usando los programas MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) y DAMBE (Xia & Xie, 2001). El cálculo de la distancia genética se hizo entre las regiones de origen de *R. pallescens* descritas por Gómez-Palacio *et al.* (2008), usando el modelo de Kimura 2 Parámetros (K2P) e incluyendo todos los sitios de la secuencia nucleotídica.

Para el análisis de microsatélites se utilizaron individuos colectados en los municipios de San Onofre y Norcasia (Tabla 2). Se amplificaron diez loci

Tabla 2. Origen de las poblaciones y número de individuos de *R. pallescens* analizados por cuantificación de ADN, secuencias del gen mitocondrial *mtCytB* y por microsatélites de ADN. Los individuos analizados son los mismos utilizados en Gómez-Palacio *et al.* (2008); trabajo en el cual se detectaron los polimorfismos cromosómicos (citotipos) A y B.

País	Región [†]	Departamento (municipio)	Latitud, longitud	Citotipo	No. de individuos analizados		
					Cuantificación de ADN	mtCytB	Microsatélites
Colombia	Norte	Magdalena (San Sebastián)	9.2408 N, 75.6503 W	A	16	2	0
		Sucre (San Onofre)	9.7400 N, 76.4722 W	A	0	0	26
	Sur	Antioquia (Vegachi)	6.7669 N, 75.2056 W	B	6	2	0
		Caldas (Nocasia)	5.5778 N, 75.1147 W	B	6	0	11
	Occidente	Antioquia (Necocli)	8.4239 N, 77.2089 W	A	4	1	0
				B	1	0	0
Panamá	Nor- occidente	Veraguas (Santa Fe)	8.5167 N, 82.9167 W	A	4	0	0
				B	14	4	0

[†] Regiones geográficas señaladas en Gómez-Palacio *et al.* (2008).

microsatélites (L3, L9, L13, L17, L25, L33, L43, L47, L50, L58) descritos previamente para *R. pallescens* por Harry *et al.* (1998). Posteriormente se realizó una electroforesis capilar en un ABI PRISM MT310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer). Los estadísticos descriptivos utilizados para cuantificar la variabilidad genética fueron: el número promedio de alelos por locus y la heterocigosidad esperada y observada. La estructuración poblacional se infirió mediante el estadístico *F_{st}* (Weir & Cockerham, 1984), cuyo nivel de significancia se basó en un Bootstrap de 1000 réplicas. Para evaluar el flujo génico entre ambas poblaciones, se calculó el número de migrantes por generación *N_m* (Barton & Slatkin, 1986).

Resultados

Epidemiología. En los 19 años de estudio se colectaron 1766 *R. pallescens*, de los cuales 3% se encontraron en intra-domicilios, 8% en peri-domicilios y 89% en palmas (Tabla 1). De los insectos capturados en las viviendas, cinco se encontraron infectados con *T. cruzi*. Sólo en dos casas se encontraron estadios ninfales y adultos (veredas Miraflores y Jardín del municipio de San Carlos, departamento de Antioquia). Sin embargo, visitas posteriores a estas casas las encontraron libres de insectos; lo cual sugirió que la colonización fue transitoria. En el resto de localidades los insectos capturados en el domicilio siempre fueron adultos y su presencia se asoció con la

atracción por la luz y por gallineros o nidos de animales domésticos intra-domiciliares. Entre los pocos insectos de domicilio sexados se encontró una proporción similar de machos y hembras (cinco machos y seis hembras).

De las 218 palmas evaluadas el 60% se encontraron infestadas (Tabla 1). La “palma de vino” *Attalea butyracea* distribuida ampliamente en los departamentos muestreados, excepto en Chocó, fue la más abundantemente colonizada (58%), seguida por la “palma mil pesos” *Oenocarpus bataua* con un 33% de infestación. Otras palmas, asociadas con zonas ganaderas o costeras, que también presentaron infestación, fueron *Elaeis oleífera* (7%), *Coco nucífera* (2%) y *Sabal mauritiiformis* (0,8%). En las palmas infestadas se observaron zarigüeyas, marmosas, tamandúas (osos hormigueros), osos perezosos, puerco espines, ratones silvestres, murciélagos, lagartos, lagartijas, serpientes y anfibios; todos los cuales pudieron servir de fuente de alimento para los insectos. En los dos municipios estudiados el 31% de 13 zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) presentó infección por *T. cruzi* y el 54% por *T. rangeli*, constituyéndose en el reservorio más importante, seguido por los perros (*Canis familiaris*) con un 0,05% (3/64) para *T. cruzi* y nada para *T. rangeli*. Los tres perros positivos lo fueron por serología. En ningún otro animal se detectó *T. cruzi*; pero sí *T. rangeli* en uno de dos Tamandúa (*Tamandua tetradactyla*), dos de cuatro murciélagos (*Molossus molossus*), dos de dos osos perezosos (*Bradypus tridactylus*) y uno de dos ratones silvestres (no se determinó la especie). Finalmente tres murciélagos *Eumops glaucinus* se hallaron negativos para *Trypanosoma* spp.

Tres personas de 30 evaluadas en el municipio de San Carlos fueron seropositivas para *T. cruzi* y en otra se detectó mediante el xeno-diagnóstico una infección por *T. rangeli*. En el municipio de San Onofre se evaluaron 18 personas, una de las cuales se encontró seropositiva para *T. cruzi*.

Las tasas de infección por *T. cruzi* en los insectos variaron desde 16% hasta 61% (promedio 26%). Hay que aclarar que para el departamento de la Guajira y el César probablemente hay subregistro, pues en cada uno de estos sitios se colectó sólo un insecto (Tabla 1). Los mayores índices de infección para *T. cruzi* se encontraron en Chocó y Bolívar: 61% y 57%, respectivamente (Tabla 1). La infección con *T. rangeli* no se evaluó para todas las muestras de insectos examinadas para *T. cruzi*; a pesar de ello se encontraron índices de infección entre 1% y 2% (Tabla 1). Adicionalmente se encontraron infecciones mixtas en el 0,4% de los insectos examinados (Tabla 1).

Sistemas de información geográfica usando sensores remotos el AD estándar mostró una sensibilidad del 89% (sitios de presencias predichos correctamente) y una especificidad del 92,8% (sitios de ausencia predichos correctamente). Por otro lado, los ADf (AD por pasos hacia adelante) para las cinco matrices construidas con el 75% de los datos clasificaron correctamente los sitios de

presencia y ausencia, en promedio, entre un 78% y 89,3%, respectivamente. Además se pudo observar diferencias significativas en el perfil ambiental de dichos sitios (Tabla 3). El modelo obtenido de distribución geográfica potencial de *R. pallescens* (Figura 1) muestra los sitios donde se encuentra *R. pallescens*;

Tabla 3. Resultados de los análisis discriminantes por pasos hacia delante para las cinco matrices construidas con el 75% de los datos originales tomados al azar. Se muestra el porcentaje de sitios de presencia (%) y de ausencia (%) bien clasificados y el porcentaje total. También se muestran los valores del estadístico Wilks, Lambda, F, los grados de libertad (gl) y el valor de significancia P, que para todos los casos fue altamente significativo.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Ausencia (%)	79.7	72.4	75.6	87.2	86.8
Presencia (%)	80.3	83.8	83.3	91.7	87.8
Total (%)	80	78	79.3	89.3	87.3
Wilks' Lambda	0.6	0.6	0.6	0.4	0.5
F	15.2	17.2	22.2	23.9	15.2
gl	7 y 142	5 y 144	4 y 145	8 y 141	11 y 138
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

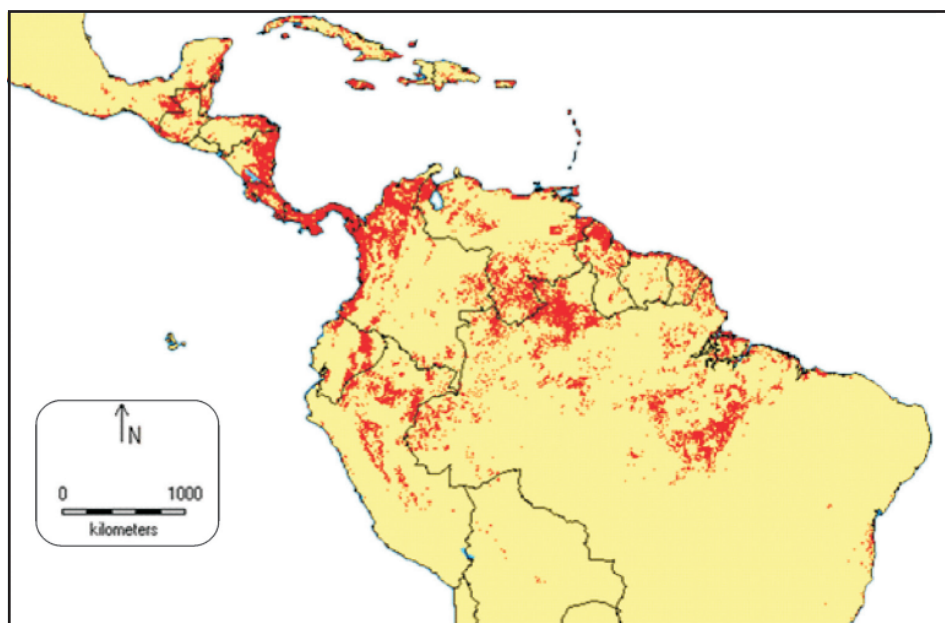


Figura 1. Modelo de distribución geográfica de *R. pallescens* basado en las variables ambientales medidas por el sensor remoto AVHRR a lo largo de 18 años. Las áreas oscuras corresponden a sitios donde se ha registrado la especie y a otros lugares que tienen una similitud ambiental con los sitios donde se ha colectado y que tienen condiciones ambientales apropiadas para ser ocupados por ella.

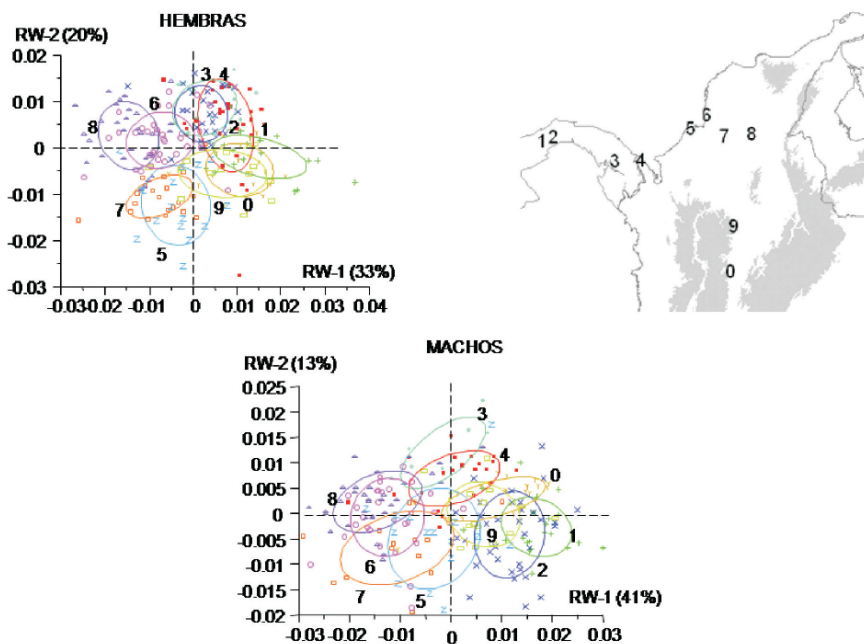
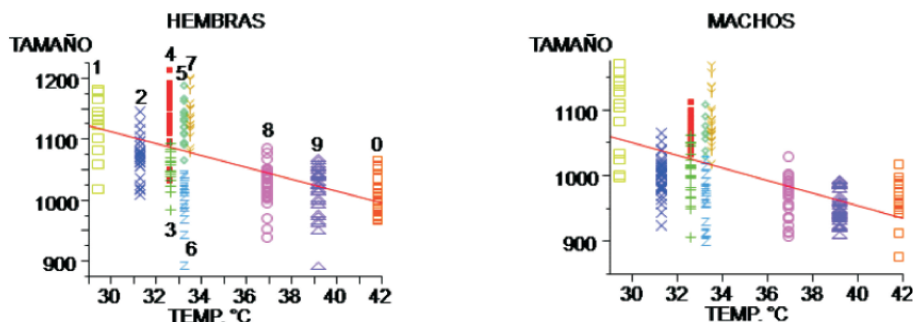
además de otros lugares que tienen características ambientales similares con los sitios en donde se ha colectado la especie. Las variables ambientales más fuertemente correlacionadas con la presencia de *R. pallescens* fueron: el mínimo del déficit de presión de vapor (la más importante), tres variables relacionadas con la temperatura de la superficie de la tierra, cuatro relacionadas con la temperatura del aire y el promedio de la radiación infra-roja.

El análisis de las variables ambientales de los sitios de presencia (excluyendo la variación ambiental de los sitios de ausencia) identifica dos agrupaciones: una correspondiente a Centro América y otra a Colombia, señalando condiciones climáticas diferentes en ambas regiones (Figura 2). Los sitios de Colombia que se solapan con los de Centro América son aquellos que se ubican en la zona fronteriza con Panamá.

Análisis morfométrico: la variación de tamaño de las cabezas mostró diferencias significativas entre las poblaciones geográficas (Anova hembras: $F = 53, 96, R^2 = 0, 69$ g.l. = 9 y 213, $P < 0, 0001$; machos: $54, 38, R^2 = 0, 71$, g.l. = 9 y 205, $P < 0, 0001$), pero siguió un patrón asociado con la temperatura: las poblaciones con los individuos más grandes en promedio son aquellas provenientes de altitudes más altas sobre el nivel del mar y viceversa. Este patrón se repitió en ambos sexos (Figura 3). La variación geográfica de las alas fue muy similar a la de las cabezas (resultados no mostrados).

No se logró detectar un patrón de variación geográfica en la conformación de las alas, pero sí en la variación de las cabezas. Por tal motivo sólo presentaremos los resultados de la variación de las cabezas. El examen visual de los individuos proyectados sobre los dos primeros Relative Warps mostró un gran solapamiento entre las poblaciones; sin embargo, se alcanzó a distinguir un patrón de variación similar para ambos sexos (Figura 4). Tal patrón se detectó al definir intervalos de confianza del 50% para cada población. De esta manera se observó que la variación en la conformación de las cabezas proporciona información sobre la distancia geográfica y también sobre las zonas de vida. Los individuos de poblaciones cercanas geográficamente tendieron a ordenarse más próximos sobre los dos primeros Relative Warps; por otro lado, los individuos procedentes de zonas de bosque húmedo tropical tendieron a concentrarse en el cuadrante superior derecho del mapa factorial, mientras los procedentes de bosque seco tropical tendieron a concentrarse sobre el cuadrante inferior izquierdo (Figura 4).

A pesar del gran solapamiento entre los individuos de las diferentes poblaciones que se observó en el análisis de Relative Warps, las distancias de Mahalanobis entre los centroides de las poblaciones no pudieron ser atribuidas al azar, con excepción de las distancias entre Acandí y Metetí y entre Vegachí y Norcasia en los machos y entre Vegachí y



Norcasia en las hembras (resultados no mostrados). Es decir, el análisis estadístico de las distancias de Mahalanobis mediante 1000 permutaciones mostró evidencias de que las cabezas son diferentes entre las poblaciones, con las excepciones anotadas. Es de resaltar que las poblaciones que no mostraron diferencias significativas en las distancias de Mahalanobis se encuentran muy próximas geográficamente y comparten la misma zona de vida.

En el estudio de la plasticidad fenotípica se observó el mismo patrón de variación de tamaño para machos y hembras. Sin embargo, no se detectaron diferencias de tamaño entre tratamientos para las cabezas, pero sí para las alas (Figura 5). En general se observó una disminución del tamaño de las alas con el aumento de la densidad; aunque fue notorio en ambos sexos que los insectos dispuestos en una densidad de 40 individuos por contenedor y alimentación mensual exhibieron alas

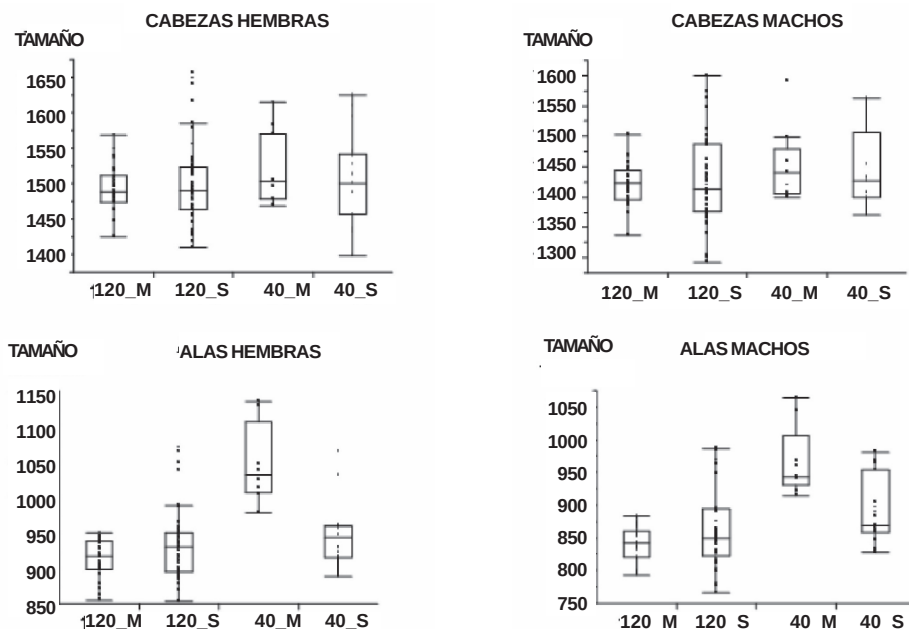


Figura 5. Plasticidad fenotípica de tamaño en *R. pallescens*. Las cajas esquemáticas (cuantiles 0%, 25%, mediana, 75%, 100%) muestran la varianza de tamaño en los diferentes tratamientos: 120_M = 120 individuos por contenedor _ alimentación mensual, 120_S = 120 individuos por contenedor _ alimentación semanal, 40_M = 40 individuos por contenedor _ alimentación mensual, 40_S = 40 individuos por contenedor _ alimentación semanal. La variación del tamaño de las cabezas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que la de las alas sí (Kruskal-Wallis: aproximación Chi cuadrado hembras = 22, 45, g.l. = 3, $P < 0,0001$; aproximación Chi cuadrado machos = 27, 53, g.l. = 3, $P < 0,0001$).

significativamente más grandes que los sometidos a los otros tratamientos (Figura 5). Por su parte, la variación de conformación se halló estadísticamente igual dentro de los diferentes tratamientos; es decir, no se detectó plasticidad de la conformación.

Composición y variación genética: el valor haploide por insecto fue 0,67 pg, correspondiendo a un tamaño genómico aproximado de $6,6 \times 10^2$ Mpb (Figura 6); cantidad no significativamente diferente en ambos citotipos (Kruskal-Wallis $P > 0,05$).

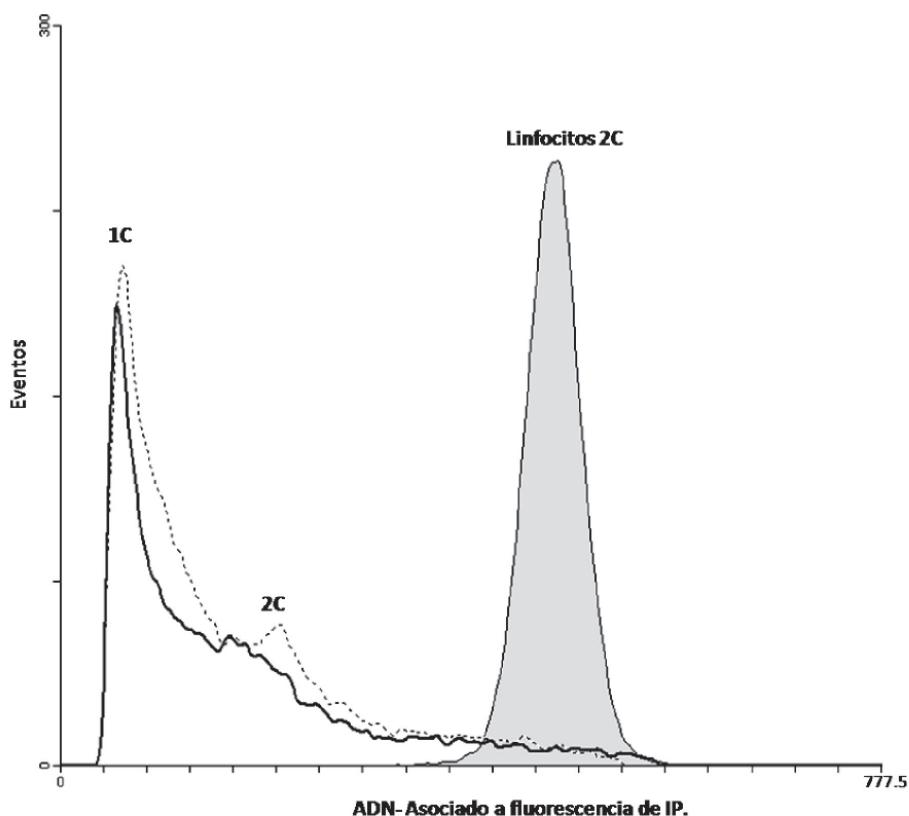


Figura 6. Cuantificación de ADN genómico por citometría de flujo. En el eje de las abscisas se muestra la intensidad relativa (en unidades arbitrarias) de ADN asociado con fluorescencia del Ioduro de Propidio (IP). El número promedio de células correspondiente se muestra en el eje de las ordenadas. Los principales picos corresponden al valor 1C y 2C de las poblaciones celulares muestreadas. El pico gris corresponde a la población celular diploide de linfocitos humanos en etapa G0 (2C) usados como control interno de referencia (2C = 6,436 pg). La línea continua representa al citotipo A y la línea punteada al citotipo B de *R. pallens* (media del valor 1C = $0,67 \pm 0,01$ pg) descritos en Gómez-Palacio *et al.* (2008).

La composición nucleotídica del fragmento secuenciado de *mtCytb* fue aproximadamente de un 32% de A, 37% T, 18% C y 13% G; lo cual corresponde a una composición A: T del 69%. Se detectaron 44 sitios polimórficos en las 682 posiciones, lo cual refleja una divergencia nucleotídica del 6,5% al interior de la especie. La diversidad haplotípica (*h*) fue de 0,3 y la diversidad nucleotídica fue de 0,0355 $\pm$ 0,017. Las distancias genéticas (K2P) promedio separaron las poblaciones en dos grandes grupos: las del Norte y Sur se diferenciaron de las de Occidente y Noroccidente por distancias superiores a 0,050 (Figura 7). La elevada diferenciación genética fue corroborada al nivel aminoacídico, donde se identificaron 39 sustituciones de los 227 aminoácidos, derivados de la secuencia nucleotídica.

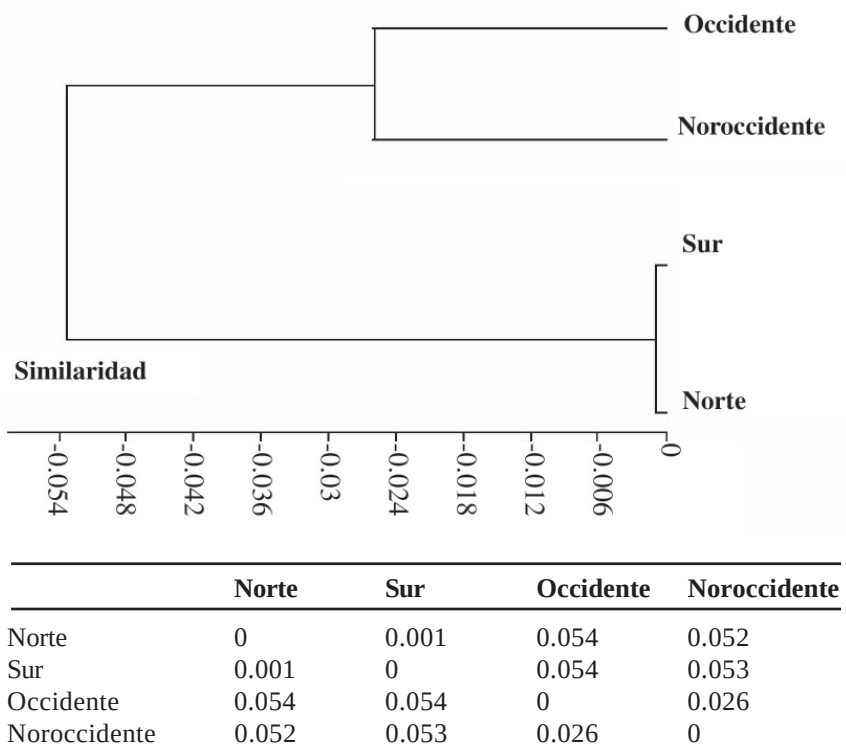


Figura 7. Dendrograma construido por el método UPGMA (Sokal & Sneath, 1972), a partir de las distancias de Kimura 2 Parámetros, las cuales se presentan en la tabla abajo del dendrograma. Las poblaciones examinadas al Norte de la distribución de la especie fueron San Sebastián (departamento del Magdalena) y San Onofre (departamento de Sucre), las del Sur fueron Vegachí (departamento de Antioquia) y Norcasia (departamento de Caldas), la población del Occidente fue Necoclí (departamento de Antioquia) y la población del Nor-occidente fue Veraguas (provincia de Santa Fe, Panamá). Un mapa con la ubicación geográfica precisa de estas poblaciones se encuentra en Gómez-Palacio *et al.* (2008).

Los diez loci microsatélites analizados fueron polimórficos, mostrando un promedio de doce alelos por locus; con excepción del locus L33 que fue monomórfico en los individuos de Norcasia, región Sur. Sin embargo, el número de alelos promedio por locus varió considerablemente entre ambas poblaciones: nueve alelos en San Onofre (región Norte) y tres en Norcasia. En ambas poblaciones la diferencia entre la heterocigosidad esperada (H_e) y la observada (H_o) conservó las mismas proporciones; indicando en ambas un bajo déficit de heterocigotos y sugiriendo un moderado grado de endogamia intrapoblacional (San Onofre: $0,747H_e - 0,596H_o = 0,151$ y Norcasia $0,711H_e - 0,535H_o = 0,176$). El análisis de la estructuración y flujo genético mostró un F_{st} de $0,26$ (intervalo de confianza por bootstrap: $0,34 - 0,12$) y una tasa de migración, N_m , de $0,25$.

Discusión

La principal intención de este trabajo es la de contribuir a esclarecer las causas que hacen a *R. pallescens* el principal vector de *T. cruzi* en Panamá, pero un vector secundario en Colombia. Existen al menos cuatro respuestas: 1) hay diferencias intrínsecas entre las poblaciones de la especie viviendo en Panamá y Colombia, las cuales están asociadas con diferencias en la capacidad vectorial; 2) los hábitos de las comunidades humanas en ambos países difieren, tal que en Panamá ayudan a incrementar el contacto vector-hombre; 3) esta es una especie relativamente homogénea en cuanto a sus características biológicas y su capacidad vectorial, por lo que la diferencia está en el subregistro en Colombia debido a los pocos e incompletos estudios epidemiológicos en este país; 4) como no existe *R. prolixus* en Panamá su papel fue cubierto por *R. pallescens*. Este trabajo buscó evaluar la primera posibilidad. Las otras requieren de estudios enfocados, que no son el objetivo particular aquí presente.

R. pallescens ha sido reportado en once departamentos de Colombia (Guhl *et al.*, 2007); a los cuales se deben agregar el departamento de La Guajira, municipio de Dibulla (colecta en palmas *A. butyracea* por el grupo de Chagas, Universidad de Antioquia), y Tolima, municipio de Honda (colecta en palmas *A. butyracea* por el grupo LIPT, Universidad del Tolima).

La distribución continental se enmarca dentro de los paralelos 4 y 17 y meridianos -72 y -85, área regida por unas variables climáticas que demostraron estar fuertemente correlacionadas con la presencia del vector ya que el 89% de los sitios de presencia fueron clasificados correctamente por el AD; al igual que cerca del 93% de los sitios de ausencia, lo cual es una asociación casi perfecta de las variables ambientales con las presencias y ausencias. Tal poder estadístico se conservó cuando los AD se hicieron sólo

con el 75% de los datos (Tabla 3). Destacó el mínimo del déficit de presión de vapor, lo cual confirma el estatus estenohídrico de la especie (Zeledón *et al.*, 2001); a pesar que el área de distribución del vector comprende zonas de bosque húmedo tropical y bosque seco tropical (Figura 2). Por otro lado, el análisis a un nivel más detallado (al interior de los sitios de presencia) señaló una variabilidad macro-ambiental en el área que ocupa *R. pallescens*, sugiriendo que los individuos encontrados en Centroamérica viven en condiciones climáticas diferentes a los que se encuentran en Colombia.

Pipkin (1968) presentó evidencias de una posible domiciliación de *R. pallescens* en la zona central de Panamá; sin embargo, casi cuarenta años después no se pudo corroborar tal situación (Vásquez *et al.* 2004). A la fecha se considera una especie silvestre pero que realiza frecuentes incursiones en los domicilios, probablemente desde palmas cercanas a estos; fenómeno bien documentado en Centroamérica (Calzada *et al.*, 2006; Vásquez *et al.*, 2004, Zeledón *et al.*, 2006a, b) y ahora en este trabajo, en Colombia. El proceso de domesticación involucra interacciones complejas entre variables ambientales e intrínsecas al vector (Dujardin *et al.*, 2000). La llegada regular de adultos a las casas y el establecimiento en algunos casos de colonias transitorias incrementa la posibilidad de que una variante fenotípica (y/o genética) interactúe favorablemente con el ambiente humano, generándose las características propias del ciclo doméstico, según lo describen Dujardin *et al.* (2000). Por tal motivo es importante montar y mantener programas de vigilancia entomológica y educación en salud pública en aquellas comunidades afectadas por la presencia del vector. Las cifras de adultos encontrados en las casas sugieren una mayor frecuencia de arribo a las viviendas humanas en Panamá y Nicaragua, comparados con Costa Rica y Colombia (Calzada *et al.*, 2006; Vásquez *et al.*, 2004, Zeledón *et al.*, 2006a, b), haciendo más probable un evento de domiciliación en los primeros países, por lo cual las exigencias de la vigilancia entomológica son mayores para ellos.

Los porcentajes de infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* son los primeros que se informan simultáneamente para un gran número de localidades en el país. No difieren mucho de lo reportado por Pipkin (1968) quien en *R. pallescens* colectados en cinco localidades de Panamá detectó tasas promedio de infección por *T. cruzi* de 32, 71% (rango: 27, 36% - 48.57%) y de 4.17% por *T. rangeli*. Sin embargo, otros trabajos en el mismo país reportan tasas superiores al 60% por *T. cruzi* y 23% por *T. rangeli* (Calzada *et al.*, 2006; Sousa & Johnson, 1971, 1973; Vásquez *et al.*, 2004; Whitlaw y Chaniotis, 1978). En Nicaragua 41, 9% de 43 adultos albergaban *T. cruzi* (Zeledón *et al.*, 2006a), mientras que en Costa Rica 32 insectos colectados en una sola palma *A. butyracea* estaban infectados con *T. cruzi* (Zeledón *et al.*, 2006b). Es probable, entonces, que las variantes centroamericanas de *R. pallescens* tengan una susceptibilidad mayor a la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* que las

colombianas; no obstante, encontramos en algunas localidades de los departamentos de Bolívar y Chocó en nuestro país tasas de infección superiores al 60%.

Al nivel de fuente alimenticia no parece haber diferencias entre Colombia y Panamá; la zarigüeya *Didelphis marsupialis* se muestra como la principal fuente de sangre para *R. pallescens*, aunque Christensen & Vásquez (1981) detectaron sangre humana en más de la mitad de 1303 insectos panameños evaluados, incluidos aquellos capturados en palmas y nidos de aves; siguiendo en orden de importancia la sangre de zarigüeya.

Tanto en Centroamérica como en Colombia se pueden asociar serologías humanas positivas con la presencia del vector intra- y extra-domiciliar. Los resultados en ambas regiones no son comparables pues los tamaños muestrales difieren mucho y los diseños experimentales no siguieron el mismo patrón (Calzada *et al.*, 2006; Zeledón *et al.*, 2006a). De todas maneras, señalan la importancia que tiene este vector para la salud pública a lo largo de su distribución geográfica.

R. pallescens presentó una variación de tamaño asociada a la temperatura promedio anual de los lugares de origen, lo cual se conoce en organismos endotermos como regla de Bergmann (Figura 3). Esta se interpreta como una respuesta fisiológica a la variación ambiental, pero hay evidencias que por mecanismos de asimilación y/o acomodación genética el vector adquirió un polimorfismo genético correlacionado con el fenotipo de tamaño (Dujardin *et al.*, 2008). La conformación de las cabezas, por su parte, proporcionó otra información. Un primer vistazo de la ordenación de los individuos sobre los dos primeros relative warps muestra un solapamiento importante, lo cual se puede interpretar como que no hay diferencias en este rasgo relacionadas con los lugares de origen (Figura 4). Sin embargo, un examen más detallado de la gráfica, además del cálculo de las distancias de Mahalanobis entre las conformaciones promedio de cada localidad, muestra un patrón de variación asociado con las zonas de vida y con las distancias geográficas (las poblaciones más cercanas geográficamente tienen conformaciones de las cabezas más similares). No se observó, entonces, una asociación clara entre la variación de tamaño o de conformación y el origen en Panamá o en Colombia; quizás el bajo número de poblaciones estudiadas en Centroamérica (dos en la zona central de Panamá) impidió detectar un patrón morfológico diferencial con Colombia.

También es posible que al menos una porción de la variación morfológica sea una respuesta plástica a las condiciones cambiantes del medio. En este trabajo, los experimentos de laboratorio demostraron la capacidad de esta especie de cambiar significativamente su tamaño dentro de una sola gene-

ración, pero no su conformación. Tal resultado concuerda con la observación general de que el tamaño es más plástico que la conformación debido a que el primero es más afectado por los factores ambientales, mientras que la segunda, por ser más estable y menos alterada por el ambiente, informa más sobre la micro- y macro-evolución de las poblaciones y especies. Los resultados de los experimentos de plasticidad fenotípica ante diferentes condiciones de alimentación y densidad poblacional van en el mismo sentido de los encontrados en los estudios morfométricos de diferenciación geográfica. En los experimentos de laboratorio la densidad poblacional y el ritmo de alimentación alteraron la variación de tamaño; al igual que lo hizo la temperatura en las poblaciones geográficas. Pero la conformación se mantuvo estable en los diferentes tratamientos de laboratorio, lo cual apoya la idea de que la variación geográfica observada en la conformación informa del patrón de variación propio de cada población. Es interesante notar que la plasticidad fenotípica (la capacidad de un genotipo de cambiar su expresión fenotípica en diferentes ambientes) parece ser un fenómeno muy común en Triatominae (Dujardin *et al.*, 2008).

R. pallescens ha demostrado tener un polimorfismo cromosómico importante (Gómez-Palacio *et al.*, 2008), con diferencias en la cantidad y distribución de la heterocromatina autosómica; dando origen a dos citotipos (A y B). La distribución de las frecuencias de tales citotipos sugiere una divergencia geográfica en tres grupos: las poblaciones de la región Norte del área de distribución de la especie (incluye las poblaciones de la costa Caribe de Colombia), las distribuidas al Sur (las poblaciones de los valles interandinos de Colombia) y las del Occidente-Noroccidente (zona del Darién en la frontera Colombo-panameña y el centro de Panamá) (Gómez-Palacio *et al.*, 2008). Este trabajo complementó la información del cariotipo midiendo la cantidad de contenido haploide de ADN, el cual se informa por primera vez para *R. pallescens*, el cual es similar a los reportados para otros *Rhodnius* (Panzera *et al.*, 2007). Es de resaltar que la cantidad del genoma no fue estadísticamente diferente para los citotipos A y B, lo cual no era lo esperado de acuerdo con lo encontrado para otras especies polimórficas (Panzera *et al.*, 2004; 2006). Tales resultados sugieren que los cambios cromosómicos en *R. pallescens* han involucrado rearrreglos cromosomales importantes con una mínima diferenciación en la cantidad y el tamaño del genoma en comparación con otras especies de la subfamilia.

Los análisis de las secuencias del mtCytb mostraron una rica composición de A: T (69%), lo cual concuerda con lo descrito para el genoma mitocondrial de insectos (De Salle *et al.*, 1987). El nivel de polimorfismo alélico, la divergencia y diversidad nucleotídica, al igual que la diversidad haplotípica, demuestran gran variabilidad genética y alto grado de diversidad infraespecífica; todo corroborado al nivel aminoacídico. Fue sorpren-

dente, además, encontrar distancias genéticas (K2P) superiores a 0,050 entre las poblaciones de Colombia y Panamá (Figura 7). Estos resultados llevaron a Abad-Franch *et al.* (2008) a sugerir que *R. pallescens* comprende al menos dos especies filogenéticas distintas.

Al interior de los haplotipos también se encuentra una heterogeneidad genética importante. El análisis de microsatélites efectuado en dos poblaciones colombianas (San Onofre y Norcasia), separadas entre sí por más de 500 km, detectó doce alelos en promedio por locus; cifra mayor a la reportada por Harry *et al.* (1998), quienes informaron nueve alelos promedio por locus para la población de San Onofre. En ambas poblaciones la diferencia entre la heterocigosidad esperada y la observada conservó las mismas proporciones indicando un bajo déficit de heterocigotos y sugiriendo un moderado grado de endogamia intrapoblacional. El análisis de la estructuración poblacional y flujo génico mostró que la subdivisión entre ambas poblaciones es significativa; reflejando, posiblemente, las consecuencias del aislamiento geográfico.

Conclusiones: varios de los resultados del trabajo presente sugieren diferencias intrínsecas entre las poblaciones colombianas y centroamericanas de *R. pallescens*. Tales diferencias parecen estar asociadas a la variación macroclimática, descrita por el análisis de variables ambientales tomadas diariamente durante 18 años por un satélite meteorológico. En particular, el análisis del gen *mtCytb* presentó evidencias muy fuertes de la separación genética del vector entre Colombia y Panamá, hasta el punto que se podría pensar en especies filogenéticas distintas. Adicionalmente, las variantes centroamericanas parecen más susceptibles a la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli*, aunque no mostraron diferencias claras con las colombianas en la asociación con mamíferos silvestres o en la incriminación vectorial al nivel de la seropositividad. Otros rasgos (la variación morfológica y la citogenética) no mostraron diferencias entre Panamá y Colombia; pero sí patrones de variación que se pudieron correlacionar con diferentes niveles de variación ambiental o geográfica. Todos estos resultados estimulan nuevas investigaciones dirigidas a explorar más detalladamente los grados de correspondencia entre la variación genética y fenotípica con las posibles diferencias en la capacidad vectorial, lo cual, de confirmarse, tendría importantes repercusiones epidemiológicas.

Agradecimientos

A las personas que participaron activamente en el desarrollo práctico y en la asesoría de este trabajo, especialmente a Jaime Moreno-Mejía, Fernando Monteiro, Fernando Abad-Franch y Francisco Panzera. Este trabajo se

benefició de la colaboración internacional a través de la red ECLAT. Fue financiado con proyectos auspiciados por Colciencias (proyecto 1115-05-11485; contrato RC-160-2001) y el “Comité para el Desarrollo de la Investigación – CODI” (proyectos CPT-0604, SIU-2-1-035, IN10024CE, CPT-0201, CPT-0016), Universidad de Antioquia, Colombia; proyecto CDIA y “Specific Support Action - American Trypanosomiasis Update Project” (Contract No: INCO-SA 515942); “Dirección General de Cooperación para el Desarrollo, Presidencia de Gobierno de la Generalitat Valenciana”, Valencia, España (Expediente 2000/3042); Département soutien et formation (DSF) de L’Institut de recherche pour le développement (IRD).

Referencias

- Abad Franch F, Monteiro FA, Jaramillo N, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L. 2008. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica* (in press).
- Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S. 2008. Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. *Acta Tropica* (accepted).
- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. *Recherches Taxonomiques, Biologiques et Génétiques*. Académie Royale des Sciences d’Outre-mer, Brussels, 162 pp.
- Calzada JE, Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaria AM, Samudio F, Bayard V, Caceres L, Saldaña A. 2006. Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 762-765.
- Christensen HA, de Vásquez AM. 1981. Host feeding profiles of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in rural villages of central Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30: 278-283.
- Clark Labs. 2006. IDRISI Andes (versión 15.0) Geographical Analysis Software. URL: <http://www.clarklabs.org/>
- De Salle R, Freeman T, Prager EM, Wilson AC. 1987. Tempo and mode of sequence variation in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* 42: 1076-1084.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A: 127-128.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha D, Jurberg J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera:

- Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Triana-Chávez O, Saldaña A, Calzada J, Pérez R, Panzera F. 2008. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Rhodniini). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 160-164.
- Gower JC. 1975. Generalised Procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33-51.
- Guhl F. 2007. Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(supl. 1): 29-37.
- Guhl F, Lazdins-Helds J. (Eds.). 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR-WHO & PAHO, TDR/GTC/06-July 2007. Disponible libremente en: http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf
- Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. 2007. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica* 27(supl. 1): 143-162.
- Holdridge L. 1982. Zonas de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura –IICA–. p 216. San José de Costa Rica.
- IHGSC. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Jaramillo N, Schofield CJ, Gorla D, Caro-Riano H, Moreno J, Mejia E, Dujardin JP. 2000. The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. *Research and Reviews in Parasitology* 60: 75-82.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology* 12: 997-1006.
- Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor GJP, Slice DE. (Eds.). 1996. *Advances in Morphometrics: Proceedings of the NATO ASI held in Il Ciocco, Tuscany, Italy, July 18-30, 1993. Series: Nato Science Series A Vol. 284, 620 p.*
- OPS Organización Panamericana de la Salud (Eds.). 2003. Taller Técnico de Estudio sobre *Rhodnius pallescens* Barber, 1932: su vigilancia y su control,

- Panamá, Panamá, 16-17 septiembre, 2002. Tegucigalpa: (OPS/HCP/HCT/234/03). Disponible libremente en: <http://www.ops-oms.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-ca-r-pallescens-2002.htm>
- Panzerá F, Ferrandis I, Ramsey J, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy C, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo V, Jaramillo N, Pérez R. 2007. Genome size determination in Chagas Disease transmitting bugs (Hemiptera -Triatominae) by flow cytometry. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 516-521.
- Pérez R, Panzerá Y, Scafiezzo S, Mazella MC, Panzerá F, Dujardin JP, Scvortzoff E. 1992. Cytogenetics as a tool for Triatominae species distinction (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87: 353-361.
- Pipkin AC. 1968. Domiciliary reduviid bugs and the epidemiology of Chagas' disease in Panama (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology* 5: 107-124.
- Rohlf FJ. 2008. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Serie de programas computacionales para morfometría geométrica disponibles libremente en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Silveira AC, Segura E, Guillén G, Pinto Dias JC, Lorca M, Schenone H, Valdés J, Rojas de Arias MA, Russomando G, Salvatella R. 2002. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional, 1991/2001 (Libro electrónico bilingüe español-portugués). Iniciativa del Cono Sur para Control/Eliminación de Chagas (INCOSUR) y Organización Panamericana de la Salud OPS (Eds.). Disponible libremente en: <http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/cd/dch-historia-incosur.htm>
- Sokal R, Sneath P. 1972. Principles of numerical taxonomy, Freeman, London.
- Sousa OE, Johnson CM. 1971. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20: 405-410.
- Sousa OE, Johnson CM. 1973. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in triatomines (Hemiptera: Reduviidae) collected in the Republic of Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22: 18-23.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: Xensible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

- Vásquez AM, Samudio FE, Saldaña A, Paz HM, Calzada JE. 2004. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 217-222.
- Ward J. 1963. Hierarchical Grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58: 236-244.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Whitlaw JT, Chaniotis BN. 1978. Palm trees and Chagas' disease in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27: 873-881.
- WWF-TNC (World Wildlife Fund and the Nature Conservancy). 2001. Ecoregions of Latin America and the Caribbean. http://conserveonline.org/docs/2001/06/lac_ecoregions.jpg
- Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *The Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Zeledón R, Ugalde JA, Paniagua LA. 2001. Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 757-764.
- Zeledón R, Marin F, Calvo N, Lugo E, Valle S. 2006a. Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 75-79.
- Zeledón R, Morales JA, Scally M, Torres J, Alfaro S, Gutiérrez H, Vargas JA. 2006b. The finding of *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Reduviidae: Triatominae) in palm trees (*Attalea butyracea*) in north Costa Rica. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 46: 15-20.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR JARAMILLO

Países como Colombia sólo entrarán en la senda firme y progresiva del desarrollo una vez se ataquen con firmeza y compromiso males crónicos entre los que se destacan las enfermedades transmitidas por vectores. Una de ellas es la enfermedad de Chagas, causada por el parásito hemoflagelado Trypanosoma cruzi, el cual es transmitido por insectos de la subfamilia Triatominae. En nuestro país es un problema grave de salud pública; el 7% de la población colombiana se estima infectada con el parásito y el 23% se encuentra en riesgo de contraer la infección.

Los métodos de control de la transmisión están bien definidos: la vigilancia entomológica, el control químico de los insectos, de las transfusiones sanguíneas y de la transmisión congénita, la educación continuada, el mejoramiento de las condiciones de vida, en particular de la vivienda, y el tratamiento del paciente en fase aguda de infección. Un programa nacional integral que comprenda todos los componentes mencionados es complejo y costoso y solo puede ser abordado por los gobiernos con la ayuda de la comunidad internacional. El gobierno colombiano se comprometió con la Iniciativa del Pacto Andino (unido a los gobiernos de Venezuela, Ecuador y Perú). Esta fue lanzada oficialmente en 1997 con el objetivo de interrumpir en diez años la transmisión del parásito mediante el control químico de los vectores domésticos y serológico de los donantes de sangre. Se tuvo éxito en el tamizaje serológico mejorado, pero las actividades de control vectorial aún no se implementan. Responsables del incumplimiento son las políticas gubernamentales de descentralización de la administración de salud y de la disminución de las plantas de personal en el Ministerio de Protección Social y en las secretarías de salud departamentales; además de las prioridades del Gobierno en salud que se han enfocado en la solución de otras enfermedades de mayor impacto político. Han sido los grupos de investigación basados en las universidades quienes han mantenido la atención sobre el problema de la enfermedad de Chagas en Colombia. Su esfuerzo se sintetiza en pruebas piloto de intervención de los vectores domésticos, de investigaciones académicas con las resultantes publicaciones de gran impacto científico y social y de reuniones periódicas donde se convoca a los investigadores universitarios y a los funcionarios del Ministerio de Protección Social y del Instituto Nacional de Salud para analizar y actualizar el conocimiento en todos los componentes de la enfermedad.

Quizás una de las reuniones recientes más importantes por la calidad de los académicos participantes y por el impacto que seguramente tendrá en la decisión política de retomar el Programa Nacional de Prevención y Control de la enfermedad de Chagas fue el Seminario Internacional sobre tendencias y futuro de la investigación en parasitología que se llevó a cabo del 4 al 6 de agosto en las instalaciones de la Universidad de Los Andes en Bogotá, patrocinado por prestigiosas asociaciones académicas nacionales. Durante este encuentro tuvimos oportunidad de presentar los resultados de investigación que el grupo de Chagas de la

Universidad de Antioquia desarrolla sobre Rhodnius pallescens, uno de los vectores secundarios más frecuentemente encontrado en la costa Caribe colombiana y la vertiente occidental del valle del río Magdalena. Conjugamos en este trabajo una multitud de acercamientos experimentales (análisis eco-epidemiológicos, morfométricos, de secuencias del gen mitocondrial Cytb, citogenéticos y de tamaño del genoma) para comprender su estructuración poblacional e importancia como vector en nuestro país. Se complementó este trabajo por comparación con poblaciones de Panamá donde R. pallescens se considera el transmisor primario de T. cruzi y T. rangeli, los dos tripanosomas humanos. Este es, además, un buen ejemplo de un trabajo multidisciplinario a gran escala que ayuda a entender de manera integral el comportamiento de un vector silvestre de la enfermedad de Chagas, lo cual provee el conocimiento indispensable para focalizar eficiente y efectivamente los programas de control.

El Programa Nacional de Control y Prevención de la enfermedad de Chagas estimó a gran parte del área de distribución de Rhodnius pallescens como de mediano y bajo riesgo. En esta región conviven especies de hábitos fundamentalmente silvestres con vectores primarios importantes como Triatoma dimidiata y T. maculata. La convivencia con otras especies que, aunque de hábitos fundamentalmente silvestres, contactan con relativa frecuencia al hombre impiden que nos olvidemos de estas regiones en la planeación de la prevención y el control de la transmisión por T. cruzi. Pero para poder prevenir y controlar eficazmente a cualquier vector de un parásito tropical es necesario conocer bien su ecología, estructura genética y fenotípica y su dinámica poblacional. R. pallescens, una especie fundamentalmente silvestre con su principal hábitat en las coronas de hojas de las palmas, no parecería merecer un programa de vigilancia y prevención como los mencionados vectores primarios. Sin embargo, su gran abundancia en las palmas, su frecuente incursión en los domicilios y el gran contacto del hombre con el vector hacen necesario tomar medidas precautelativas.

Filogenia de los Lymnaeidae vectores de *Fasciola hepatica*

S. Mas-Coma^{*1}, P. Artigas¹ y M.D. Bargues¹

Resumen

La fascioliasis humana pasa al primer plano de la actualidad a partir de la década de los noventa, al constatar la existencia de zonas de endemia humana, un incremento constante de la casuística humana en todos los continentes y una mayor patogenicidad de la conocida con anterioridad. Todo este panorama habría de conducir a la OMS a lanzar una iniciativa mundial contra esta enfermedad. La importancia de los moluscos Lymnaeidae en la transmisión a los humanos, encontrándose diferentes especies de Lymnaeidos implicadas en las diferentes características de transmisión y distintos patrones epidemiológicos, lleva a la decisión de incluir una revisión mundial de los Lymnaeidae ante el caos sistemático-taxonómico actual en estos moluscos. Se seleccionaron marcadores moleculares basados en genes y espaciadores del ADN ribosomal, tras comprobación de su idoneidad. Los trabajos en América del Sur demostraron que incluso los estudios transnacionales pueden también resultar insuficientes y que en esos casos hay que recurrir a estudios comparados intercontinentales. Esto es consecuencia de la marcada capacidad de los Lymnaeidos de expandir su distribución geográfica aprovechando pasivamente distintos vehículos de transporte esencialmente aportados por el hombre. La revisión, terminada o muy avanzada ya en Europa, América del Sur y Central y África, en marcha en Asia y recién comenzada en América del Norte, indica que no parecen existir tantas especies como en principio se había creído. Los análisis filogenéticos muestran varias líneas filéticas con características suficientes como para ser distinguidas a nivel genérico y una

* Correo electrónico: S.Mas.Coma@uv.es

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España.

mayor riqueza de las faunas en el Hemisferio Norte (Europa, Asia, América del Norte) en comparación con las faunas homólogas del Hemisferio Sur (América del Sur, África, Oceanía), lo que avala la hipótesis de un origen holártico de los Lymnaeidae y que se ajustaría a la propuesta antigua de un origen de los mismos en la región neártica.

Palabras clave: fascioliasis, Lymnaeidae, vectores, iniciativa mundial.

Abstract

Human fascioliasis became of first concern from the decade of the 90s, when detecting the existence of human endemic areas, a constant increase of human cases in all continents and a higher pathogenicity than the one known previously. This frame led the World Health Organization to launch a worldwide initiative against this disease. The importance of the molluscs of the family Lymnaeidae in the transmission to humans, different lymnaeid species underlying the different transmission characteristics and different epidemiological patterns, led to the decision of including a worldwide review of the Lymnaeidae owing to the chaotic systematic-taxonomic situation of these molluscs in the present. Molecular markers based on genes and spacers of the nuclear ribosomal DNA were selected after proving their appropriateness. Studies in South America demonstrated that even transnational analyses could be insufficient and that intercontinental studies should be needed in those cases. This is the consequence of the marked capacity of Lymnaeidae to expand their geographic distribution by taking advantage of different passive transport ways essentially furnished by humans. The review, finished or almost completed for Europe, South and Central America and Africa, under way in Asia and only just started in North America, show that there appear to be not so much species as believed from the beginning. The phylogenetic analyses show several phyletic lines with sufficient weight as to be considered at genus level and a larger richness of the faunas in the Northern Hemisphere (Europe, Asia, North America) in comparison to the homolog faunas in the Southern Hemisphere (South America, Africa, Oceania), a conclusion which supports the hypothesis for a Holarctic origin of Lymnaeidae and which appears to fit with the old proposal of an origin in the Nearctic region.

Key words: fascioliasis, Lymnaeidae, vectors, worldwide initiative.

Introducción

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria bien conocida desde hace muchísimos años debido a su gran importancia veterinaria al originar enor-

mes pérdidas en el ganado, esencialmente ovino y bovino, pero también en caprino, porcino, equino y ya más localizadamente en otros como los camélidos en África y Asia o los auquénidos en América del Sur. Esta parasitosis está causada por dos especies de helmintos del grupo de los Trematodos y pertenecientes al género *Fasciola*: *F. hepatica* originaria de Europa y actualmente distribuida en todos los continentes como consecuencia de la exportación de ganado por los colonizadores europeos, y *F. gigantica* cuya distribución se circunscribe a África y Asia (Mas-Coma & Bargues, 1997).

La fascioliasis humana siempre había sido considerada una enfermedad secundaria debido al relativamente escaso número de personas afectadas en el mundo, únicamente unos 2000 casos publicados en el periodo 1970-1990 (Chen & Mott, 1990). Sin embargo, esta visión comienza a cambiar en los primeros años de la década de los noventa a raíz de los trabajos iniciados en esos años por parte del Equipo de Expertos de la Universidad de Valencia (España) dirigido por el Prof. S. Mas-Coma en colaboración con la Unidad de Schistosomiasis and Other Trematode Infections del Parasitic Diseases Programme (PDP) de la Sede Central de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) de Ginebra (Suiza) dirigida por el Dr. K.E. Mott, tanto en la isla mediterránea de Córcega como en el altiplano norte boliviano. Así es como el enfoque tradicional sobre esta enfermedad empieza a modificarse (WHO, 1995) y poco después aparecen ya las primeras publicaciones internacionales en las cuales se procede ya a describir una problemática antes desconocida y relacionada con la existencia de áreas de endemia humana en países andinos como Bolivia y Perú (Mas-Coma, 1996, 1998; Mas-Coma *et al.*, 1999b, c). El nuevo panorama sugiere la conveniencia de ofrecer una base de partida sobre la cual los países puedan proceder a describir sus situaciones epidemiológicas de acuerdo con una nueva clasificación de situaciones epidemiológicas dentro de la cual destaca por primera vez la distinción entre hiper-, meso- e hipoendemias humanas, así como de epidemias humanas en situación de endemia animal y epidemias humanas en situación de endemia humana (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

En los años que siguen se efectúan estudios de campo en muchos otros países latinoamericanos y se inician prospecciones semejantes en África y Asia, constatándose que la problemática de la fascioliasis humana se encuentra distribuida por América Latina, Europa, África y Asia (Mas-Coma, 2004a, b; Mas-Coma *et al.*, 2005, 2007), con una enorme capacidad de adaptación y expansión incluso a medios inhóspitos (Mas-Coma *et al.*, 2003), relacionada tanto con el cambio global (Mas-Coma, 2007a) como con el cambio climático (Mas-Coma *et al.*, 2008). Estos resultados conllevan el que la fascioliasis sea catalogada como la enfermedad parasitaria de transmisión vectorial ostentando una distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal

más amplia y conocida (Mas-Coma *et al.*, 2003; Mas-Coma, 2004). A sus efectos patológicos importantes ya conocidos (Mas-Coma & Bargues, 1997; Mas-Coma *et al.*, 2000), pasan a añadirse toda una serie de nuevas características patológicas y clínicas antes despreciadas o ignoradas por su rareza en los casos agudos de la enfermedad pero que en los casos crónicos o de alta cronicidad habituales en zonas de endemia humana adquieren enorme trascendencia, como la litiasis (Valero *et al.*, 2003), la bacteriobilia (Valero *et al.*, 2006) y la anemia (Valero *et al.*, 2008). Todo ello, unido al efecto inmunosupresor tanto en la fase aguda como la crónica y crónica avanzada de la fascioliasis (Girones *et al.*, 2007) que lleva aparejada una gran problemática adicional relacionada con las asociaciones de infecciones concomitantes que la fascioliasis establece con varias otras afecciones parasitarias (Mas-Coma, 2004; Mas-Coma *et al.*, 2005), confecciona un cuadro con evidente y alarmante capacidad subdesarrollante de las comunidades humanas afectadas.

Todo este panorama gradualmente detectado a lo largo de los últimos 20 años habría de conducir a la OMS a lanzar en su momento, en colaboración con el Equipo de Expertos de Valencia, una iniciativa mundial contra esta enfermedad incluyendo dos ejes fundamentales: (i) estudios sobre transmisión y epidemiología para caracterizar la enfermedad en los distintos lugares y comprender qué es lo que está sucediendo que nos permita entender la actual emergencia de la fascioliasis por doquier, y (ii) acciones de control que comprenden tanto la evaluación de nuevos tratamientos como estrategias y medidas de control en aquellos lugares en los que los conocimientos epidemiológicos son ya suficientes (WHO, 2007, 2008).

Los Lymnaeidae vectores de la fascioliasis

La fascioliasis está transmitida por moluscos Lymnaeidos dulceacuícolas vectores. Los Lymnaeidae son una familia de Gasterópodos que, conjuntamente con los Planorbidae, comprenden ya no sólo la mayoría sino también las especies vectoras de mayor importancia en la transmisión de Trematodiasis tanto humanas como animales. Los Lymnaeidos basan su interés aplicado en su capacidad de transmitir a especies de Fasciolidae, Schistosomatidae y Echinostomatidae (Bargues *et al.*, 2001).

La familia de los Lymnaeidae comprende un gran número de especies y géneros descritos por todo el mundo, incluyendo distribuciones geográficas abarcando desde climas fríos hasta climas cálidos (Hubendick, 1951). En lo que se refiere a la fascioliasis, cabe destacar la marcada especificidad que las dos especies de *Fasciola* muestran respecto de determinadas especies de Lymnaeidos. De un modo simplificado, se puede decir que *F. hepatica*

es transmitida por especies de pequeño tamaño del grupo *Galba/Fossaria* mientras que *F. gigantica* lo es por especies de en general gran tamaño del género *Radix*. Especies de otros grupos como los Stagnicolinos y *Pseudosuccinea* pueden actuar de vectores secundarios en determinadas circunstancias o en ausencia de las especies vectoras primarias (Bargues *et al.*, 2001).

Como en toda enfermedad de transmisión vectorial, las características epidemiológicas de la fascioliasis vienen en gran parte marcadas por las especies de Lymnaeidos vectores responsables de la transmisión en una zona endémica concreta. Así, los Lymnaeidae muestran particularidades ecológicas bien diferentes según especies y medios en que habitan. Las especies de *Galba/Fossaria* se muestran en general ligadas a colecciones de agua pequeñas y poco profundas, a veces temporales, relacionadas con las lluvias, mientras que las especies de *Radix* suelen encontrarse en colecciones de agua profundas, más permanentes. Ello conlleva el que, en zonas de solapamiento de ambas especies de *Fasciola* como en África y Asia, existan localidades en las que la gente muestra infecciones por ambas especies si bien la contaminación por cada uno de los dos Fasciólidos tiene lugar en sitios o focos de transmisión diferentes alrededor de dicha localidad. Consecuentemente, las características de los Lymnaeidos resultan ser de gran trascendencia epidemiológica (Mas-Coma, 2005). Los estudios de los últimos años están demostrando incluso que las zonas de endemia humana parecen mostrarse ligadas a únicamente determinadas especies de cada uno de dichos grupos de *Galba/Fossaria* y *Radix*, por lo cual la clasificación de las especies de Lymnaeidos involucradas en la transmisión en cada lugar se convierte en trascendental y viene a constituir un marcador de gran utilidad para los estudios epidemiológicos y las estrategias de control (Mas-Coma, 2005).

La problemática de los Lymnaeidae

A pesar de la gran importancia de los Lymnaeidae, y a diferencia de los Planorbidae, los Lymnaeidos han estado siempre sumidos en un confusiónismo sistemático a nivel de especie y un caos taxonómico a nivel de género muy notables, debido a la pronunciada similitud de muchas especies, a la falta de caracteres de claro valor diferenciador y sistemático, a su habitual gran variabilidad intraespecífica y a la innumerable cantidad de especies y géneros descritos hace muchísimos años mediante descripciones totalmente insuficientes que han conducido a una actual situación de sinonimias y contrasimonimias en la cual cualquier especialista se pierde (Bargues *et al.*, 2001). A pesar del enorme esfuerzo de Hubendick (1951) al realizar su revisión mundial de esta familia, los malacólogos actuales si-

guen mostrando pareceres muy dispares sobre la clasificación de los Lymnaeidae y los caracteres morfoanatómicos de las partes blandas y características de la concha a considerar (Bargues *et al.*, 2001).

Ante el caos clasificatorio-sistemático de esta familia de moluscos y dado el interés aplicado evidente de los Lymnaeidae como marcadores de la fascioliasis humana y animal, se decidió proceder a estudiar a estos vectores mediante métodos moleculares nunca antes utilizados en los mismos. Así es como se optó por la secuenciación de genes y espaciadores del ADN como dianas más adecuadas y aportando el máximo de información posible para solventar el confusionismo antes aludido. Otros métodos moleculares como RAPD, PCR-RFLP, bandeo por microsatélites, etc., fueron desechados por su falta de concreción, problemas de reproducción de resultados y problemas de interpretación. Las secuencias de ADN constituían el único método capaz de diferenciar especies y también diferenciar poblaciones y cepas dentro de una especie de Lymnaeido (Bargues & Mas-Coma, 2005).

Marcadores moleculares utilizados en Lymnaeidae

Dado que los moluscos se caracterizan en general por su antigüedad, se iniciaron los estudios mediante la obtención de las secuencias completas del gen de la subunidad pequeña del operón ribosomal o gen 18S del ARNr en ciertas especies bien conocidas de Europa y alguna de América (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 1997). Este gen demostró su utilidad ya no únicamente para la diferenciación de las especies analizadas sino sobre todo para el análisis de las relaciones supraespecíficas entre especies de Lymnaeidae. Un resultado sorprendente e inesperado, pero de gran interés, fue la detección de diferencias en la hélice E10-1 de la región variable V2 de la estructura secundaria del gen que permitían la distinción entre especies de Lymnaeidae que transmiten *F. hepatica* respecto de especies de Lymnaeidae que transmiten *F. gigantica*. Este fenómeno se proyectaba también en las filogenias obtenidas por diferentes métodos de análisis filogenético como máxima parsimonia, neighbor-joining y de máxima verosimilitud (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 1997).

Sin embargo, este gen demostró ser demasiado conservado para la diferenciación de especies próximas, por lo que en pasos sucesivos se recurrió primero a la obtención de las secuencias completas del espaciador transcrito interno ITS-2, como mejor marcador conocido a nivel de especie en la mayoría de organismos estudiados (Bargues *et al.*, 2001, 2003, 2007a, b; Mas-Coma *et al.*, 2001; Meier-Brook & Bargues, 2002) y más tarde también a las secuencias completas del espaciador transcrito interno ITS-1 (Bargues *et al.*, 2006a, b, 2007b). Las filogenias utilizando cada uno de estos espaciadores

mostraban de nuevo la separación de las especies que transmiten una u otra especie de *Fasciola*, indicando así el valor aplicado de ambos marcadores específicos.

Para la facilitación de los haplotipajes de poblaciones, cepas y especies se procedió oportunamente a proponer una nueva nomenclatura de códigos de haplotipos combinados que permite la caracterización y diferenciación a partir de una única diferencia nucleotídica (single nucleotide polymorphisms–SNPs) (Bargues & Mas-Coma, 2005). Por el momento, la caracterización de los Lymnaeidae se está basando casi exclusivamente en secuencias de marcadores del ADN ribosomal, ya que los conocimientos de marcadores del ADN mitocondrial (ADNmt) aún siguen siendo insuficientes por descansar solamente en secuencias parciales de genes (esencialmente el 16S y la COI).

Tal y como se está viendo recientemente en numerosos grupos de invertebrados, los marcadores moleculares basados en secuencias de genes mitocondriales presentan numerosos problemas que nunca se habían tenido en cuenta o ni siquiera se conocían con anterioridad. Así, la creencia de que los nucleótidos evolucionaban uniformemente a lo largo de un mismo gen mitocondrial, hecho que constituía una base fundamental para poder aceptar como significativos y definitivos los resultados comparados y filogenéticos obtenidos con fragmentos o secuencias parciales de estos genes fácilmente obtenibles al contarse con cebadores (= primers) universales, se está viendo en estos últimos años que desgraciadamente esto no es siempre así, por lo que todos los análisis efectuados con fragmentos de genes del ADNmt no cabe por el momento considerarlos sino a nivel preliminar a la espera de confirmación por realización de los mismos estudios contando con las secuencias completas de dichos genes (Mas-Coma & Bargues, 2008).

Una segunda problemática planteada por los marcadores del ADNmt es precisamente su rápida saturación, por lo menos en invertebrados. El análisis de la saturación en las secuencias de los genes mitocondriales ha sido también constatada muy recientemente, observándose que ésta tiene lugar mucho más rápidamente de lo que se pensaba y que esta problemática también implica a los dos genes ribosomales 12S y 16S del ADNmt. Así es como en determinados grupos de insectos se ha podido constatar cómo las informaciones que suministran las secuencias de los genes mitocondriales dejan de ser válidas o significativas a niveles mucho más bajos de lo que se pensaba hasta la fecha. Análisis recientes demuestran cómo dicha saturación deja su efecto ya no únicamente en las comparaciones a grandes niveles taxonómicos, sino también dentro de géneros próximos e incluso dentro de especies dentro de un mismo género, mostrándose como útiles solamente en comparaciones de especies próximas dentro de un mismo género o de subespecies o poblaciones de una misma especie (Mas-Coma & Bargues, 2008).

Habida cuenta de las características singulares de los moluscos y la antigüedad evolutiva de los Lymnaeidos en general, resulta evidente, pues, que los marcadores mitocondriales podrán ser de gran utilidad futura en estudios poblacionales o de dispersión geográfica de especies, pero que por el momento no se muestran como unos marcadores apropiados para la inmediata necesidad que se plantea y que no es otra que una finalidad sistemático-taxonómica que comprende la utilización de marcadores válidos para (i) la reorganización general de la familia de los Lymnaeidae (subfamilias, tribus, géneros, grandes líneas evolutivas, etc.), (ii) el establecimiento de especies válidas y no válidas (sinónimos), y (iii) la distinción de la variabilidad intraespecífica con carácter sistemático (subespecies) pero también de cepas geográficas, razas susceptibles o resistentes a la transmisión, etc. (mediante caracterización por haplotipaje combinado). Y para todo ello, los marcadores del ADN ribosomal se muestran mucho más adecuados por sus características.

Necesidad de estudios transnacionales e intercontinentales

Los estudios realizados con secuencias del ITS-2 de diferentes especies europeas mostraron resultados sorprendentes, tales como (i) individuos clasificados como pertenecientes a especies diferentes presentaban secuencias idénticas o muy similares, (ii) individuos adscritos a la misma especie presentaban secuencias diferentes, (iii) a veces las diferencias nucleotídicas eran escasas sugiriendo diferencias intraespecíficas, pero (iv) otras veces estas diferencias eran tan grandes que indican que se trataba de especies diferentes y en algunos casos de incluso géneros distintos. En otras palabras, los resultados moleculares vinieron a constatar el enorme confusionismo existente: los malacólogos y científicos se confundían con frecuencia en sus clasificaciones de especímenes y la situación caótica en la sistemática y taxonomía de esta familia de moluscos quedaba perfectamente plasmada (Bargues *et al.*, 2001).

Ante esta situación se decidió lanzar una iniciativa mundial a largo plazo cuya finalidad era la clarificación de la sistemática y taxonomía de los Lymnaeidae, como prerequisite imprescindible para poder establecer las relaciones de la fascioliasis humana y animal con las distintas especies de Lymnaeidae vectoras en los diferentes continentes. Los estudios antes mencionados (Bargues *et al.*, 2001) nos habían demostrado claramente que los datos de la literatura no resultaban en absoluto fiables ni siquiera en Europa, continente en el que precisamente se contaba con los mejores conocimientos sobre Lymnaeidos en comparación con los demás continentes.

Para el resto de continentes, y sobre todo en relación con las regiones del mundo en donde la fascioliasis humana se muestra como un gran pro-

blema de salud pública, todo sugería que la situación de confusionismo podía llegar a ser incluso mucho mayor que en Europa, tal y como se podía deducir de lo detectado en el altiplano norte boliviano. En esta zona de Bolivia, precisamente el área de mayor endemia humana conocida en el mundo (Mas-Coma *et al.*, 1999c), los datos previos indicaban que la fascioliasis estaba transmitida por dos especies latinoamericanas: *L. viatrix* y *L. cubensis* (Ueno *et al.*, 1975). Los estudios moleculares demostraron que (i) en vez de dos especies de Lymnaeidos había en realidad una única especie de molusco vector responsable de toda la endemia y que ostentaba una variabilidad morfométrica tal que confundió a los expertos en su momento y (ii) que esta única especie existente no era en realidad ni *L. viatrix* ni *L. cubensis* sino otra especie importada desde otro continente, *Galba truncatula* de Europa (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 1997; Mas-Coma *et al.*, 2001). Exactamente lo mismo ha sido detectado recientemente en Argentina, donde las poblaciones siempre adscritas a *L. viatrix* en la zona de Mendoza han resultado pertenecer en algunos casos también a *G. truncatula* y además precisamente al mismo haplotipo combinado que el existente en el altiplano norte boliviano (Bargues *et al.*, 2006b, 2007a).

Los estudios realizados en diferentes países de Europa demostraron que los especialistas se equivocan fácilmente en sus clasificaciones de especímenes, en gran parte debido a basarse en literatura antigua errónea referente a la fauna de moluscos de agua dulce del país en cuestión. Dichos estudios comparados demostraron de manera patente la necesidad de efectuar análisis de especímenes procedentes de diferentes países, tanto vecinos como alejados dentro del mismo continente, antes de poder decidir cuál o cuáles especies se tiene en la mano y cuáles son en realidad las existentes en un país concreto. Estos estudios europeos demostraron también la conveniencia, siempre que sea factible, de obtener especímenes de la localidad tipo de cada especie antes de poder adscribir una secuencia determinada y sus secuencias próximas a una especie de Lymnaeido concreto (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2003, 2006), así como también la posibilidad molecular de adscribir las especies a diferentes géneros, comprendiendo incluso la necesidad de crear géneros nuevos (Meier-Brook & Bargues, 2002) o revalidar géneros previamente sinonimizados (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2003, 2006). Estos estudios realizados en Europa permitieron también distinguir los rangos máximos de variabilidad intraespecífica en Lymnaeidae, con lo que ello conlleva de utilidad práctica al poder dilucidar hasta qué punto se puede hablar de distintas poblaciones o cepas dentro de una misma especie y a partir de qué puntos podemos hablar de diferentes subespecies, especies y géneros (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2003, 2006).

Los estudios llevados a cabo en Bolivia (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 1997; Mas-Coma *et al.*, 2001) y Argentina (Bargues *et al.*, 2006b,

2007a) vienen a su vez a demostrar que los estudios transnacionales pueden a veces también resultar insuficientes en determinadas ocasiones y que en esos casos no hay otro remedio que recurrir a estudios comparados intercontinentales. Esto es consecuencia de la muy marcada capacidad de los Lymnaeidos de expandir su distribución geográfica aprovechando pasivamente distintos vehículos de transporte esencialmente aportados por el hombre. La cuestión estriba en este punto en que son las especies más antropófilas aquellas que están más sujetas a tales fenómenos de expansión distribucional pasiva y que son precisamente estas especies de Lymnaeidos próximas al hombre las que suelen estar ligadas a la transmisión de la fascioliasis humana y animal.

La importancia de estos fenómenos la hemos podido constatar en los estudios moleculares que hemos efectuado con Lymnaeidos en los últimos años. Los resultados de estos estudios nos han mostrado numerosos errores de clasificación de los Lymnaeidos vectores y de interpretación de las características epidemiológicas de la enfermedad en diferentes países.

La iniciativa mundial sobre los Lymnaeidae

Lo antedicho constituye la base de la decisión tomada en su día de lanzar una iniciativa de estudio molecular de la familia de los Lymnaeidae a nivel de los diferentes continentes dentro de la iniciativa mundial de la OMS contra la fascioliasis humana como requisito indispensable para poder realizar una revisión apropiada de estos moluscos y sus relaciones con la transmisión, epidemiología y control de la fascioliasis humana y animal.

En el momento actual esta revisión está finalizada en lo referente a las especies que habitan el continente europeo, lo está también casi por completo en lo referente a Latinoamérica, está terminada en África y muy avanzada en Asia. En lo que concierne a América del Norte, en cambio, los estudios han comenzado hace poco tiempo.

Dado lo avanzado de los estudios, los resultados permiten ya vislumbrar determinadas características generales de esta familia de moluscos:

- En primer lugar cabe mencionar que no parecen existir tantas especies como en un principio se había creído, si bien existen muchas más especies de las admitidas por Hubendick (1951) quien estableció un gran número de sinonimias; por tanto, el número de especies parece situarse en un gradiente intermedio entre las dos posiciones extremas mantenidas por los malacólogos especialistas en estos moluscos dulceacuícolas;

- En segundo lugar es de destacar que los análisis filogenéticos muestran varias líneas filéticas con características suficientes como para ser distinguidas a nivel genérico; también aquí, pues, los resultados moleculares indican una posición intermedia entre el extremo fragmentador de aquellos malacólogos que describieron un sinnúmero de géneros diferentes y aquellos que sostienen la posición opuesta de un único género *Lymnaea* como Hubendick (1951);
- En tercer lugar cabe resaltar la claramente mayor riqueza de las faunas de Lymnaeidae en el Hemisferio Norte (Europa, Asia, América del Norte) en comparación con las faunas homólogas del Hemisferio Sur (América del Sur, África, Oceanía), lo que avala la hipótesis de un origen holártico de los Lymnaeidae y que se ajustaría a la propuesta antigua de un origen de los mismos en la región neártica (Inaba, 1969).

Evolución y filogenia de los Lymnaeidae

Los análisis filogenéticos realizados con diferentes métodos sugieren que los grupos más arcaicos (*Radix* y *Galba/Fossaria*) serían aquellos en los que las secuencias del ITS-2 serían más cortas, aquellos con secuencias más largas del ITS-2 (Stagnicolinos europeos, *Omphiscola*) cabría considerarlos los grupos más recientes, y finalmente los que ostentan secuencias del ITS-2 de longitud intermedia (Stagnicolinos americanos) serían los de origen intermedio también (Bargues *et al.*, 2001).

El conflictivo grupo *Galba/Fossaria* se muestra como el de mayor interés respecto de la fascioliasis tanto humana como animal causada por *F. hepatica*. La filogenia incluye especies que se ubican dentro de este clado y que muestran distribuciones geográficas en América del Norte, América Central, América del Sur, Europa, partes de África, Próximo Oriente y Norte de Asia. Es de destacar la expansión de este grupo con especies autóctonas (*L. viatrix*) hasta la Patagonia austral argentina (Bargues *et al.*, 2007b), a diferencia de lo que sucede en África, a cuyo extremo más meridional sólo llega a través de la introducción de *G. truncatula*. En este grupo cabe resaltar asimismo la gran riqueza de especies que presenta en el nuevo Mundo respecto de la total pobreza (sólo *G. truncatula*) en el viejo Mundo y que sugiere un más que probable origen del grupo en la región neártica.

El género *Radix* aparece bien individualizado en todas las filogenias y se trata de un clado monofilético que no ha podido salir nunca de Europa, África y Asia, si se exceptúa algunas introducciones fortuitas en América del Norte efectuadas por el hombre. Si se considera las necesidades de temperaturas elevadas de *F. gigantica*, ello explica la restricción de la

fascioliasis por *F. gigantica* a los dos continentes de Africa y Asia (Bargues *et al.*, 2001). En este sentido es de destacar también el que *Radix* se muestre un género rico en especies tanto en Europa como en Asia (preferentemente Sur de Asia), lo que sugiere un origen del mismo en la región palaeártica y posterior expansión a África a través de la colonización por una única especie *R. natalensis* y responsable de la transmisión de *F. gigantica* en este continente.

Los Stagnicolinos resultan ser un grupo que, a pesar de mostrarse morfológicamente homogéneo, muestra dos clados bien separados. Por un lado están los Stagnicolinos europeos, con *Lymnaea* (*Lymnaea*) y *Lymnaea* (*Stagnicola*) en Europa y con *Hinkleyia* en América del Norte, contando con el género recientemente descrito *Catascopia* (Meier-Brook & Bargues, 2002), único holártico, como puente entre los Stagnicolinos palaeárticos y los neárticos (Bargues *et al.*, 2003, 2006).

Pseudosuccinea columella se muestra como una especie singular, con escasísima variabilidad intraespecífica a pesar de su distribución geográfica por todos los continentes, la cual claramente sugiere una expansión muy reciente por introducción pasiva gracias a la mano del hombre.

Finalmente cabe mencionar a *Lymnaea cousini*, especie singular originariamente descrita en Ecuador y posteriormente en Colombia y que constituye un buen vector de la enfermedad (Mas-Coma, 2007b). En los árboles filogenéticos, esta especie se emparenta con el grupo *Galba*/*Fossaria*, explicándose evolutivamente así su capacidad de transmisión.

Agradecimientos

Los estudios moleculares sobre Lymnaeidae han sido realizados dentro del marco de numerosos proyectos financiados y colaboraciones internacionales, de entre los cuales cabe destacar los actualmente en vigor: Proyecto No. SAF2006-09278 del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología, Madrid, España; la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Proyectos No. C03/04, No. PI030545 y No. RD06/0021/0017 del programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa) y Proyecto No. PI030545, ambos del FIS, Ministerio Español de Sanidad, Madrid, España. Las actividades de campo han sido realizadas dentro de la iniciativa mundial de la OMS (Sede Central de Ginebra, Suiza) contra la fascioliasis humana. La coordinación de actividades en Bolivia, Perú, Argentina, Uruguay, México y Cuba han sido llevadas a cabo también dentro del Proyecto Regional No. RLA5049 de la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA, Sede Central, Viena, Austria).

Se agradece muy especialmente el soporte proporcionado por el Dr. L. Savioli, Dr. D. Engels y Dr. A. Gabrieli (PVC/CPE, OMS, Sede Central de Ginebra) y el Dr. G.J. Viljoen (Animal Production and Health Section, Department of Nuclear Sciences and Applications, IAEA, Sede Central, Viena) para la facilitación de la colaboración internacional sin la cual no se hubiesen podido desarrollar los estudios de investigación llevados a cabo en varios países.

La lista de los científicos y personas que colaboraron en la obtención de muestras de Lymnaeidae en países de todo el mundo es demasiado extensa como para ser enumerada aquí, lo que no impide el que queramos manifestar nuestro agradecimiento a todos y cada uno de ellos.

El soporte técnico ha sido proporcionado por el Servicio Central de Secuenciación para la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (Dr. A. Martínez).

Referencias

- Bargues MD, Mas-Coma S, 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14(5): 569-577.
- Bargues MD, Mas-Coma S, 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology* 79(3): 257-267.
- Bargues MD, Mangold AJ, Muñoz-Antoli C, Pointier JP, Mas-Coma S, 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *Journal of Parasitology* 83(6): 1086-1092.
- Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S, 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1(2): 85-107.
- Bargues MD, Horak P, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S, 2003. Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite* 10: 243-255.
- Bargues MD, Artigas P, Jackiewicz M, Pointier JP, Mas-Coma S, 2006a. Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline

- Lymnaeidae (Gastropoda). In: *Beiträge zur Süßwasser-Malakologie - Festschrift für Claus Meier-Brook und Hans D. Boeters* (P. Glöer & G. Falkner edit.), Heldia (Münchner Malakologische Mitteilungen), München 6(1/2): 29-40.
- Bargues MD, Mera y Sierra R, Gomez HG, Artigas P, Mas-Coma S. 2006b. Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. *Animal Biodiversity and Conservation* 29(2): 191-194.
- Bargues MD, Mera y Sierra R, Gomez HG, Artigas P, Mas-Coma S. 2007a. Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública. *Enfermedades Emergentes*, Barcelona, 9(2): 77-82.
- Bargues MD, Artigas P, Mera y Sierra RL, Pointier JP, Mas-Coma S. 2007b. Characterization of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101(7): 621-641.
- Chen MG, Mott KE. 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin* 87 (4): R1-R38.
- Girones N, Valero MA, Garcia-Bodelon MA, Chico-Calero MI, Punzon C, Fresno M, Mas-Coma S. 2007. Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases* 195(10): 1504-1512.
- Hubendick B. 1951. Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, Fjärde Serien* 3: 1-223 + 5 pl.
- Inaba A. 1969. Cytotaxonomic studies of lymnaeid snails. *Malacologia* 7: 143-168.
- Mas-Coma S. 1996. Fascioliasis humana en Iberoamérica. In: *Parasitismos y Desarrollo* (A.R. Martínez Fernández coord.), Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, Real Academia de Farmacia, Madrid: 31-86.
- Mas-Coma S. 1998. Human fascioliasis in Europe and Latin America. In: *Infectious Diseases and Public Health. A Research and Clinical Update* (M. Angelico & G. Rocchi edit.) Balaban Publishers, Philadelphia, L'Aquila: 297-313.
- Mas-Coma S. 2004a. Human fascioliasis. In: *World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. (J.A.

- Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer & V.P.J. Gannon edit.), IWA Publishing, London, UK: 305-322.
- Mas-Coma S. 2004b. Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35 (Suppl. 1): 1-11.
- Mas-Coma S. 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology* 79 (3): 207-216.
- Mas-Coma S. 2007a. Parasitic diseases, global change and the developing world: the example of emerging fascioliasis. *Scientia Parasitologica* 8(1): 10-20.
- Mas-Coma S. 2007b. *Lymnaea cousini* (Gastropoda: Lymnaeidae) as transmitter of fascioliasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(2): 241-242.
- Mas-Coma S, Bargues MD. 1997. Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology* 57(3-4): 145-218.
- Mas-Coma S, Bargues MD. 2008. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Submitted.
- Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD. 1999a. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization* 77(4): 340-346.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D. y Esteban, J.G. 1999b. Human Fasciolosis. In: *Fasciolosis* (J.P. Dalton edit.), CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK: 411-434.
- Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, Strauss W. 1999c. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine and International Health* 4(6): 454-467.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Marty AM, Neafie RC. 2000. Hepatic Trematodiasis. In: *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (W.M. Meyers, R.C. Neafie, A.M. Marty & D.J. Wear edit.), Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington D.C.: 69-92.
- Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 123: S115-S127.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA, Fuentes MV. 2003. Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. In:

- Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites (C. Combes & J. Jourdan edit.), Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan, Vol. 2: 81-123.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* 35: 1255-1278.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. 2007. Plantborne trematode zoonoses: fascioliasis and fasciolopsiasis. In: *World Class Parasites*, Vol. 11. Food-Borne Parasites, Fish and Plant-Borne Parasites (D. Murrell & B. Fried edit.), Springer Verlag, New York, Vol. 11: 293-334.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. In: *Impact of Climatic Changes on the Epidemiology and the Control of Animal Diseases* (S. De La Rocque ed.). Scientific and Technical Review, World Organization for Animal Health (OIE), Paris. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties*, in press.
- Meier-Brook C, Bargues MD. 2002. *Catascopia*, a new genus for three Nearctic and one Palaearctic stagnicoline species (Gastropoda: Lymnaeidae). *Folia Malacologica* 10(2): 83-84.
- Ueno H, Arandia R, Morales G, Medina G. 1975. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano region of Bolivia. *National Institute of Animal Health Quarterly* 15: 61-67.
- Valero MA, Santana M, Morales M, Hernandez JL, Mas-Coma S. 2003. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases* 188: 787-793.
- Valero MA, Navarro M, Garcia-Bodelon MA, Marcilla A, Morales M, Garcia JE, Hernandez JL, Mas-Coma S. 2006. High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica* 100(1-2): 17-23.
- Valero MA, Girones N, Garcia-Bodelon MA, Periago MV, Chico-Calero MI, Khoubbane M, Fresno M, Mas-Coma S. 2008. Anemia in advanced chronic fascioliasis. *Acta Tropica* in press.
- WHO. 1995. Control of Foodborne Trematode Infections World Health Organization, Geneva, WHO Technical Report Series No. 849: 1-157.
- WHO. 2007. Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. World Health Organization, Headquarters Geneva, 17-18 October 2006: WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.
- WHO. 2008. Fact sheet on fascioliasis. In: *Action Against Worms*, World Health Organization, Headquarters Geneva (December 2007), Newsletter 10: 1-8.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR MAS-COMA

La fascioliasis humana pasa al primer plano de la actualidad a partir de la década de los noventa, al constatarse la existencia de zonas de endemia humana, un incremento constante de la casuística humana en todos los continentes y una mayor patogenicidad de la conocida con anterioridad. Todo este panorama habría de conducir a la OMS a lanzar una iniciativa mundial contra esta enfermedad. La importancia de los moluscos Lymnaeidae en la transmisión a los humanos, encontrándose diferentes especies de Lymnaeidos implicadas en las diferentes características de transmisión y distintos patrones epidemiológicos, lleva a la decisión de incluir una revisión mundial de los Lymnaeidae ante el caos sistemático-taxonómico actual en estos moluscos. Se seleccionaron marcadores moleculares basados en genes y espaciadores del ADN ribosomal, tras comprobación de su idoneidad. Los trabajos en América del Sur demostraron que incluso los estudios transnacionales pueden también resultar insuficientes y que en esos casos hay que recurrir a estudios comparados intercontinentales. Esto es consecuencia de la marcada capacidad de los Lymnaeidos de expandir su distribución geográfica aprovechando pasivamente distintos vehículos de transporte esencialmente aportados por el hombre. La revisión, terminada o muy avanzada ya en Europa, América del Sur y Central y África, en marcha en Asia y recién comenzada en América del Norte, indica que no parecen existir tantas especies como en principio se había creído. Los análisis filogenéticos muestran varias líneas filéticas con características suficientes como para ser distinguidas a nivel genérico y una mayor riqueza de las faunas en el Hemisferio Norte (Europa, Asia, América del Norte) en comparación con las faunas homólogas del Hemisferio Sur (América del Sur, África, Oceanía), lo que avala la hipótesis de un origen holártico de los Lymnaeidae y que se ajustaría a la propuesta antigua de un origen de los mismos en la región neártica.

Las miosinas de *Plasmodium falciparum*

Jacqueline Chaparro Olaya¹

Antecedentes

La malaria

La malaria es una de las infecciones parasíticas más importantes en el mundo y es uno de los retos más grandes que en salud pública enfrentan los países del tercer mundo. Cada año mueren casi un millón de personas a causa de la enfermedad y se presentan 300 millones de casos clínicos (RBM, WHO, UNICEF, 2005). Aunque hay cuatro especies del género *Plasmodium* que infectan seres humanos, casi todas las muertes y gran proporción de la morbilidad son causadas por *P. falciparum* (World Health Organization, 2005). Se calcula que aproximadamente 100.000 nuevos casos de malaria se presentan cada año en Colombia, de los cuales entre el 30 y el 35% son causados por *P. falciparum* (Carmona Fonseca, 2001). Así, de los 91.839 casos de malaria que se presentaron en el año 2006, 30.229 fueron causados por *P. falciparum*, 60.597 por *P. vivax* y 1003 casos fueron diagnosticados como malaria mixta.

Los apicomplexa

Los parásitos que causan la malaria pertenecen al Phylum Apicomplexa, el cual agrupa casi 7000 especies de patógenos de considerable importancia médica y veterinaria. Todos los apicomplexa son parásitos obligados y por eso su proliferación depende de la invasión a células hospederas. Para que el proceso de invasión ocurra, los apicomplexa alcanzan estados de desarrollo especializados llamados “zoitos”, los cuales penetran activamente a sus células hospederas exhibiendo un sistema de locomoción, único en eucariotes, denominado “gliding” (Russell, 1983; King, 1988; Preston & King, 1996).

¹ Instituto de Biología Molecular. Universidad El Bosque, LIBBIQ. Universidad Nacional de Colombia, Laboratorio de Bioquímica. Instituto Nacional de Salud.

El proceso de invasión

Considerando que los apicomplexa tienen ciclos de vida complejos que son llevados a cabo dentro de diferentes hospederos e incluso dentro de diferentes tipos de células en esos hospederos (Figura 1), es de vital importancia que estos parásitos sean capaces de invadir células de muy diversos tipos. El proceso de invasión involucra una secuencia de eventos que es más o menos la misma para todos los miembros del Phylum, lo que no deja de ser sorprendente si se considera el amplio rango de hospederos y tipos celulares que invaden (Dubremetz *et al.*, 1998). Considerando que las enfermedades causadas por estos parásitos tienen tremendo impacto médico y económico, nuestro punto de partida en esta línea de investigación fue la idea que la estrategia única de invasión de los apicomplexa podría representar también estrategias únicas de control.

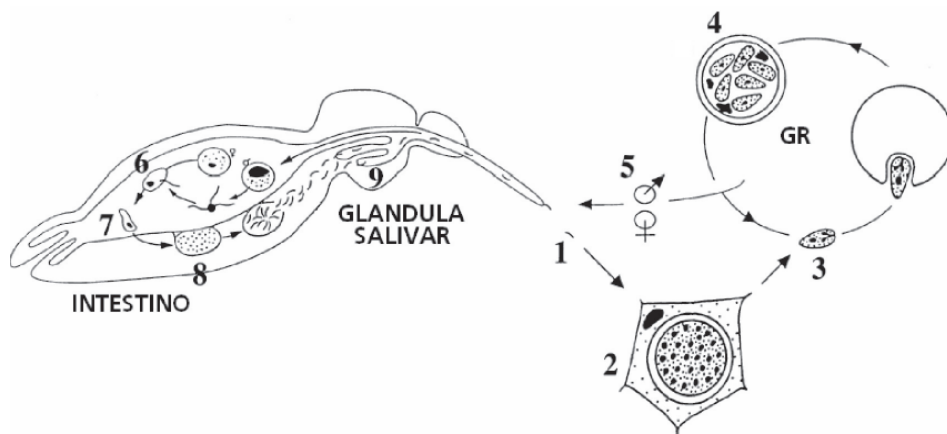


Figura 1. Ciclo de vida de parásitos del género *Plasmodium*.

(1): El mosquito toma sangre de un hospedero e inyecta saliva con esporozoitos. (2): Los esporozoitos invaden rápidamente células del hígado y se transforman en esquizontes hepáticos. (3): Los esquizontes maduran y rompen las células hepáticas liberando hasta 30.000 merozoitos. (4): Cada merozoito puede invadir un glóbulo rojo y desarrollarse en él, pasando por los estadios de anillo, trofozoito y finalmente esquizonte. (5): El esquizonte madura y rompe el eritrocito liberando entre 10 y 20 merozoitos que pueden invadir nuevos glóbulos para iniciar el ciclo intraeritrocítico. En esta etapa también se pueden formar gametocitos dentro del eritrocito, los cuales corresponden a estadios sexuales del parásito. (6): Poco después de que el mosquito ha ingerido eritrocitos infectados, los gametocitos se liberan y forman cigotos diploides. (7): El cigoto rápidamente se transforma en un ooquinate móvil que atraviesa las células epiteliales del intestino y se transforma, entre las células epiteliales y la lámina basal del intestino, en un oocito. (8): El oocito genera (en 5 a 15 días) hasta 10.000 esporozoitos haploides, los cuales son liberados en el hemocelo y llevados a las glándulas salivares por la hemolinfa hasta que alcanzan e invaden células secretoras de la glándula. (9): Una vez en las glándulas salivares, los esporozoitos esperan a que el mosquito se alimente para así ser transmitidos a un nuevo vector vertebrado. Modificado de Menard, 2000.

Motores moleculares

Hasta ahora, todos los motores moleculares identificados en eucariotas pertenecen a una de tan sólo tres familias: (i) motor miosina basado en actina, (ii) motor kinesina basado en microtúbulos, y (iii) motor dineina basado en microtúbulos. El proceso de entrada de los zoitos en las células hospederas sigue una secuencia de pasos bien definidos que ha de estar dirigida por algún motor molecular del parásito. ¿Cuál de estos tres tipos de motor molecular dirige el “gliding”? En 1979 se había demostrado que la invasión podía ser detenida si los zoitos eran pretratados con citocalasina B, lo cual apoyaba la existencia de un motor basado en actina (Miller *et al.*, 1979). En 1993 se confirmó la presencia de actina monomérica en los zoitos de *P. falciparum* (Field *et al.*, 1993; Dobrowolski *et al.*, 1997; Pinder *et al.*, 1998) pero durante un tiempo, las técnicas convencionales de microscopía fueron incapaces de detectar filamentos de actina (Shaw & Tilney, 1999) y esa aparente ausencia de microfilamentos era irreconciliable con la idea de un motor actina-miosina responsable de los procesos de “gliding” e invasión. Sin embargo, tiempo después fue posible comprobar que los microfilamentos no habían sido detectados por medio de técnicas convencionales de microscopía porque eran muy cortos para ser resueltos (100nm) (Schmitz *et al.*, 2005), y que su formación era importante durante la invasión (Bubb *et al.*, 1994; Shaw & Tilney, 1999; Bubb *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2002; Wetzel *et al.*, 2003).

Una vez confirmado uno de los componentes del motor actina-miosina, el interés se volcó en la miosina. En el año 2000 los análisis filogenéticos definieron 15 clases diferentes de miosinas (Sellers, 2000), luego 17 (Korn, 2000), posteriormente 18 (Berg *et al.*, 2001), en el 2005 se reconocían 20 (Krendel *et al.*, 2005) y para el 2007 ya se hablaba de 24 clases (Li JF & Nebenführ A, 2007). La Clase XIV se creó con el descubrimiento de tres miosinas en *T. gondii* (Heintzelman & Schwartzman, 1997, Mermall *et al.*, 1998), y ha venido creciendo a medida que se identifican miosinas en apicomplexa. La miosina C de *P. falciparum* (PFMYO-C) constituye la única excepción, ya que algunos autores afirman que podría pertenecer a la Clase V, mientras que otros proponen que podría ser el primer miembro identificado de una nueva clase (Hettmann *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2001; Lew *et al.*, 2002; Vale, 2003).

Miosinas de *Plasmodium falciparum*

Usando “primers” degenerados diseñados con base en secuencias consenso de todas las miosinas descritas, los ensayos de PCR revelaron la existencia de un único gen de miosina denominado *Pf-myosin1*, hoy *PfMyo-A* (Pinder *et al.*, 1998; Bement *et al.*, 1994).

La secuencia completa de *PfMyo-A* fue publicada poco después (Hettmann *et al.*, 2000), así como la cinética de transcripción y expresión durante el

ciclo asexual (Ben Mamoun 2001; Calvo *et al.*, 2002). Aunque análisis computacionales habían revelado la existencia de otros tres genes de miosina en el genoma de *P. falciparum* (PfM-B (Dame, 1996), PfM-C (Hettmann, 2000) y PfM-D (Heintzelman & Schwartzman, 1999)), al momento de abordar esta línea de investigación en nuestros laboratorios, no existía información alguna sobre la estructura, expresión o función de alguno de ellos.

A pesar de los avances, aún quedan muchas preguntas sin resolver acerca de la movilidad y la invasión de los parásitos apicomplexa, preguntas que están relacionadas no solo con la arquitectura misma del sistema, sino con su funcionamiento y su regulación. El “gliding” como estrategia de movimiento e invasión puede explicar el gran éxito de los apicomplexa a través de la evolución, y su estudio y comprensión pueden proporcionar herramientas que permitan bloquear el proceso y controlar la enfermedad.

Aporte del grupo al estado del arte

Confirmación de la existencia de las secuencias Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D en el genoma de Plasmodium falciparum

Cuando nuestros grupos crearon esta línea de investigación, había sólo una secuencia reportada como miosina en *P. falciparum* (Pfmyo-A) y otras dos secuencias habían sido asignadas como miosinas putativas (Pfmyo-B y Pfmyo-C). Se hicieron ensayos de PCR sobre ADN genómico de *P. falciparum* y de este modo, se confirmó experimentalmente y por vez primera, la presencia de las secuencias Pfmyo-B y Pfmyo-C en el genoma de *P. falciparum* (Chaparro-Olaya *et al.*, 2003).

Evaluación de la transcripción de Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D durante el ciclo asexual de Plasmodium falciparum

Aunque se había demostrado la existencia de secuencias de miosina en el genoma del parásito, no se sabía si se trataba de genes o de pseudogenes. Como la secuencia completa de Pfmyo-D acababa de ser reportada en el NCBI, se hicieron los ensayos de RT-PCR para Pfmyo-A, Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D. Los ensayos demostraron, por primera vez, que los genes Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D son transcritos durante el estadio intraeritrocítico de *P. falciparum* (Chaparro-Olaya *et al.*, 2005).

Evaluación de los patrones de transcripción de los genes Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D durante el ciclo asexual de Plasmodium falciparum

Para tratar de establecer el patrón de transcripción de los genes de miosina a lo largo del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*, se hicieron

ensayos de RT-PCR sobre mRNA obtenido de cultivos sincronizados en estadio de anillos, trofozoitos o esquizontes. Para *Pfmyo-A* y *Pfmyo-B* se obtuvieron productos de PCR en todos los estadios, con un incremento paulatino en la intensidad de la señal a medida que el parásito avanzaba en el desarrollo. Para *Pfmyo-C* hubo amplificación preferencialmente en trofozoitos, y para *Pfmyo-D* en trofozoitos y esquizontes. La Figura 2 muestra la abundancia de los transcritos para cada estadio de desarrollo (Chaparro-Olaya *et al.*, 2003; 2005).

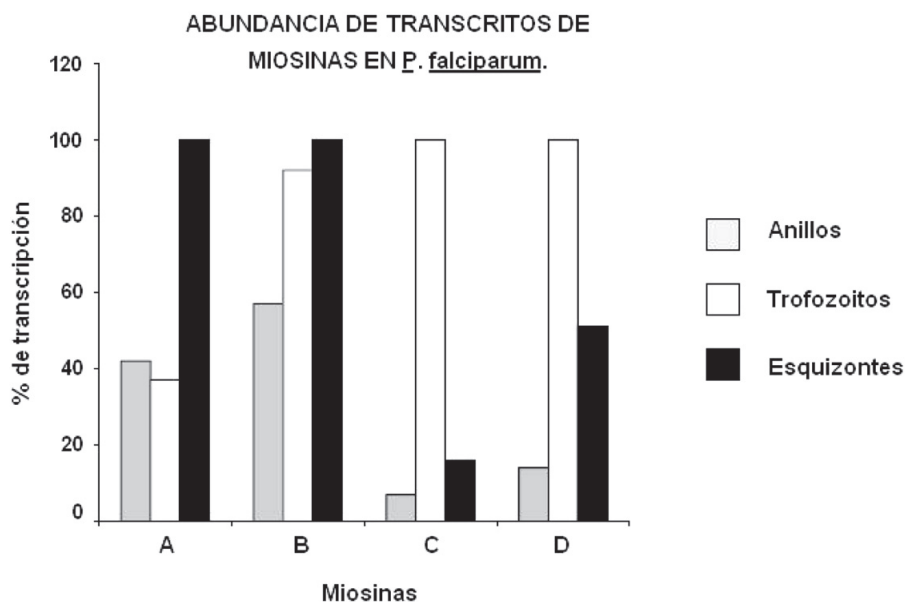


Figura 2. Abundancia de transcritos de *Pfmyo-A*, *Pfmyo-B*, *Pfmyo-C* y *Pfmyo-D* en estadios intraeritrocíticos de *Plasmodium falciparum*.

La cuantificación de la abundancia de los transcritos para cada una de las miosinas en cada uno de los tres estadios de desarrollo, se hizo por medio de imágenes digitales. La intensidad de las bandas obtenidas, cada gen en estadio de anillos, trofozoitos o esquizontes fue medida, y a la banda más intensa se le asignó un porcentaje de transcripción del 100%. Luego, la intensidad de las señales obtenidas para los otros dos estadios fue expresada como porcentaje relativo al 100%.

El paso siguiente fue estudiar la expresión de las proteínas. Para esto se clonaron fragmentos de los genes, se obtuvieron proteínas recombinantes para PFMYO-B (147aa), PFMYO-C (167 aa) y para PFMYO-D (149 aa), y las recombinantes para PFMYO-B y PFMYO-D, que correspondían a porciones del dominio de cabeza, fueron usadas para generar anticuerpos policlonales.

Ensayos de inmunoblot

Los anticuerpos fueron usados en ensayos de inmunoblot, para detectar la presencia de las proteínas PFMYO-B y PFMYO-D sobre extractos de proteína total de parásitos sincronizados en estadios de anillo, trofozoito y esquizonte. Con anti-Pfmyo-B se observó una señal muy evidente en esquizontes, una señal casi imperceptible para trofozoitos y ninguna señal aparente para los anillos (Chaparro-Olaya *et al.*, 2003). Al usar el anti-Pfmyo-D no se detectó señal al usar extractos de anillos pero sí en extractos de parásitos adultos, principalmente en trofozoítos (Chaparro-Olaya *et al.*, 2005).

Ensayos de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia mostró que PFMYO-B es expresada únicamente en los esquizontes tardíos y en los merozoitos (Figura 3). El ensayo de inmunofluorescencia usando anti-Pfmyo-D produjo una señal citoplasmática con áreas de mayor intensidad alrededor de los núcleos en los esquizontes, una señal débil hacia la periferia del parásito y hacia la zona donde se ubica el núcleo en trofozoitos y ninguna señal en anillos (Figura 4) (Chaparro-Olaya *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos para PFMYO-B hacen pensar que muy posiblemente esta miosina tiene un papel relevante en la invasión a células hospederas, ya que su expresión está limitada a los estadios tardíos intraeritrocíticos del parásito. Los resultados obtenidos con PFMYO-D indican que su función se relaciona con actividades que tienen lugar cerca del momento en que ocurre la segregación del material nuclear en los esquizontes.

Bioinformática

Cuando este trabajo se inició, se conocían cuatro secuencias de miosinas y se había hecho trabajo experimental con sólo una de ellas (*Pfmyo-A*). En octubre de 2002, fue liberado el borrador del “Proyecto genoma de *Plasmodium falciparum*” y se decidió hacer una búsqueda de secuencias adicionales de miosina en el parásito, con base en la presencia de dominios conservados de miosina. Con este propósito, se usaron los programas bioinformáticos Blast y PlasmoDB para buscar los motivos: (i) [SG]-XXXX-GK[ST] (Smith & Rayment, 1996; Bannister *et al.*, 2003); (ii) EAFGNAKT (Rayment *et al.*, 1993; Cope *et al.*, 1996) y (iii) PHYIRCIKPN (Cope *et al.*, 1996). La búsqueda reveló que entre todas las secuencias depositadas en los bancos genómicos de *P. falciparum*, 20 de ellas contenían estos tres motivos. Entre estas 20 secuencias estaban las cuatro miosinas ya identificadas y el siguiente paso fue establecer cuáles de las 16 secuencias restantes eran miosinas nuevas y cuáles eran secuencias redundantes de *Pfmyo-A*, *B*, *C* y *D*. Para eso, se hizo un alineamiento múltiple

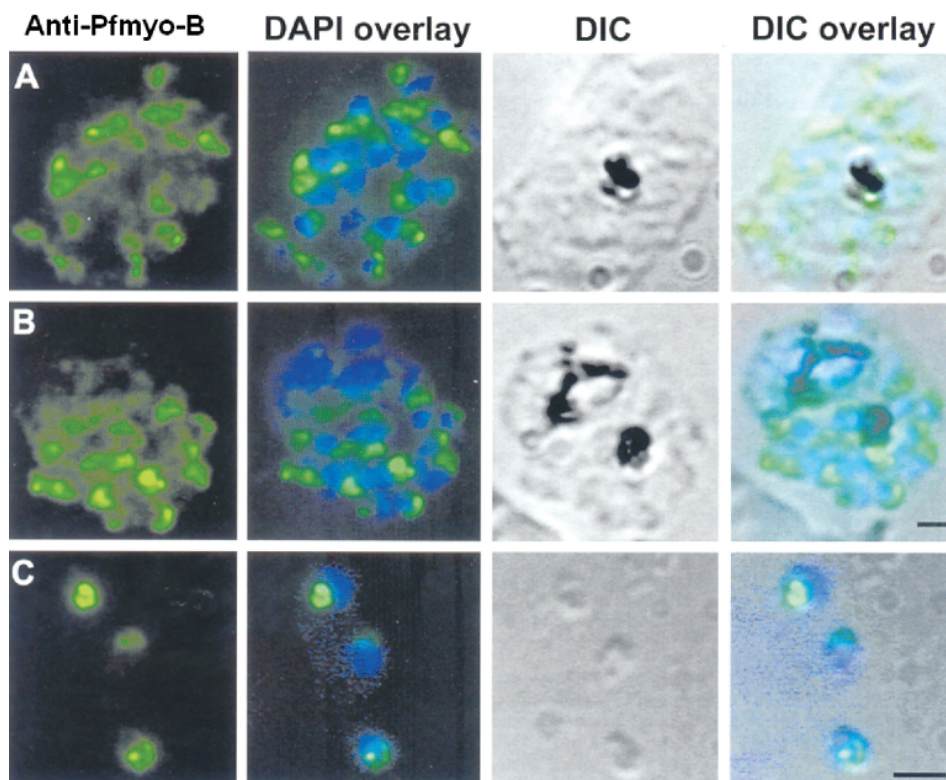


Figura 3. Microscopía de inmunofluorescencia sobre células rojas infectadas con *Plasmodium falciparum* usando anti-Pfmyo-B.

(A). Célula roja infectada con un esquizonte. (B). Célula roja infectada con dos parásitos. Uno de los dos parásitos está en un estado más avanzado de desarrollo (ver los paneles DIC). (C) Merozoitos libres inmuno-marcados con Pfmyo-B y contrastados con DAPI. Las barras de escala representan 1µm. A y B presentan la misma magnificación. Tomado de Chaparro-Olaya *et al.*, 2005.

usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), a partir del cual se estableció que entre estas 20 secuencias había dos que no habían sido identificadas anteriormente como miosinas de *P. falciparum*. Estas dos nuevas secuencias fueron denominadas PFMYO-E (2153 aa) y PFMYO-F (1600 aa). La presencia de dominios característicos de miosinas, sumada a la homología general con las miosinas de apicomplexa, permitió proponer a PFMYO-E y PFMYO-F como verdaderas miosinas. Por medio de ensayos de RT-PCR se estableció que *Pfmyo-E* y *Pfmyo-F* son transcritos a mRNA durante el ciclo intraeritrocítico del parásito. La Figura 5 muestra la abundancia de los transcritos para cada estadio de desarrollo y es evidente que la señal más fuerte, y por tanto el nivel de transcripción máximo, se encuentra en esquizontes para *Pfmyo-E* y en trofozoítos y esquizontes para *Pfmyo-F*.

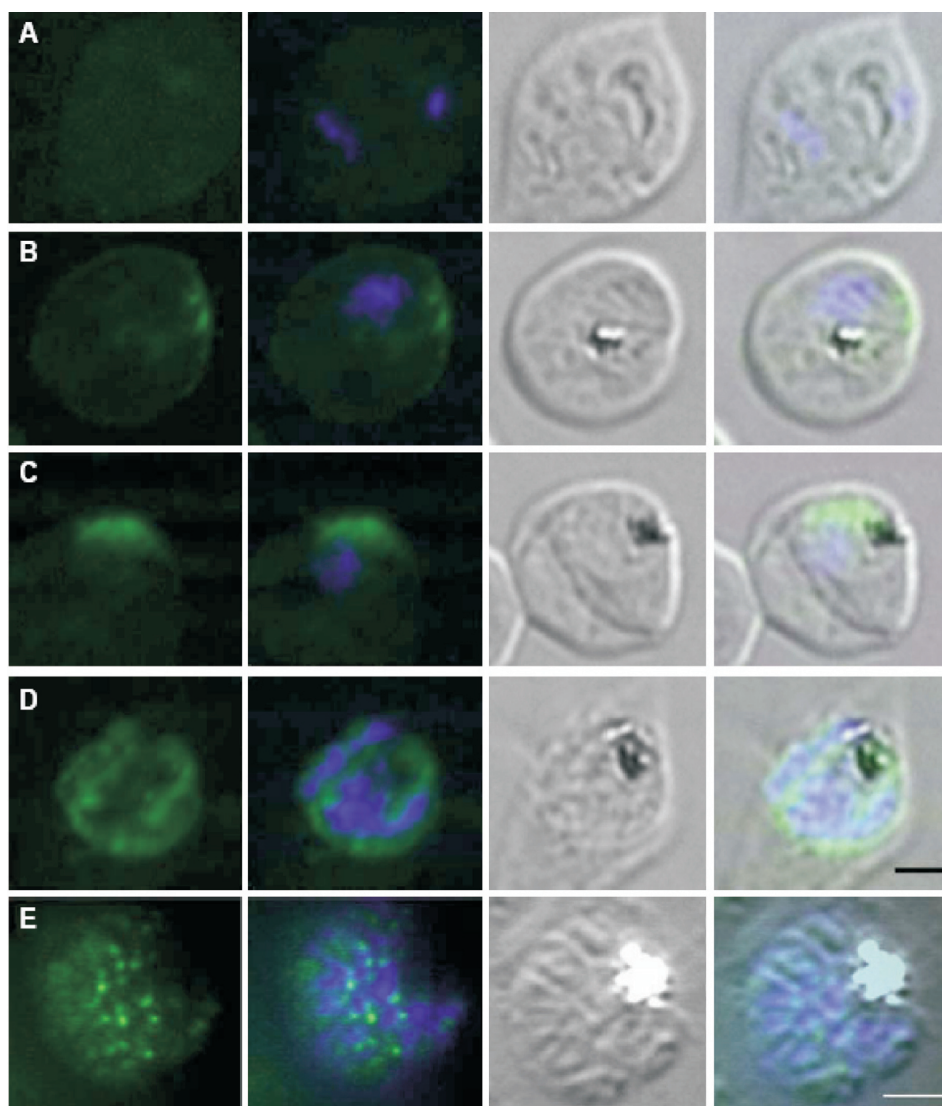


Figura 4. Microscopía de inmunofluorescencia sobre células rojas infectadas con *Plasmodium falciparum* usando anti-Pfmyo-D.

A-D. Parásitos de *Plasmodium falciparum* en diferentes estadios de desarrollo, usados para inmunofluorescencia confocal. E. Parásitos usados para microscopía de epifluorescencia estándar. Las imágenes muestran anillos (A), trofozoitos (B) y (C) y esquizontes (D) y (E). Los parásitos de los paneles (A- D) fueron fijados con metanol y los parásitos del panel (E) con acetona fría. Se hizo inmunomarcaje con Pfmyo-D y los parásitos fueron contrastados con DAPI. Las imágenes DIC son también mostradas (tercer y cuarto paneles de izquierda a derecha). Las barras de escala representan 1µm. Tomado de Chaparro *et al.*, 2005.

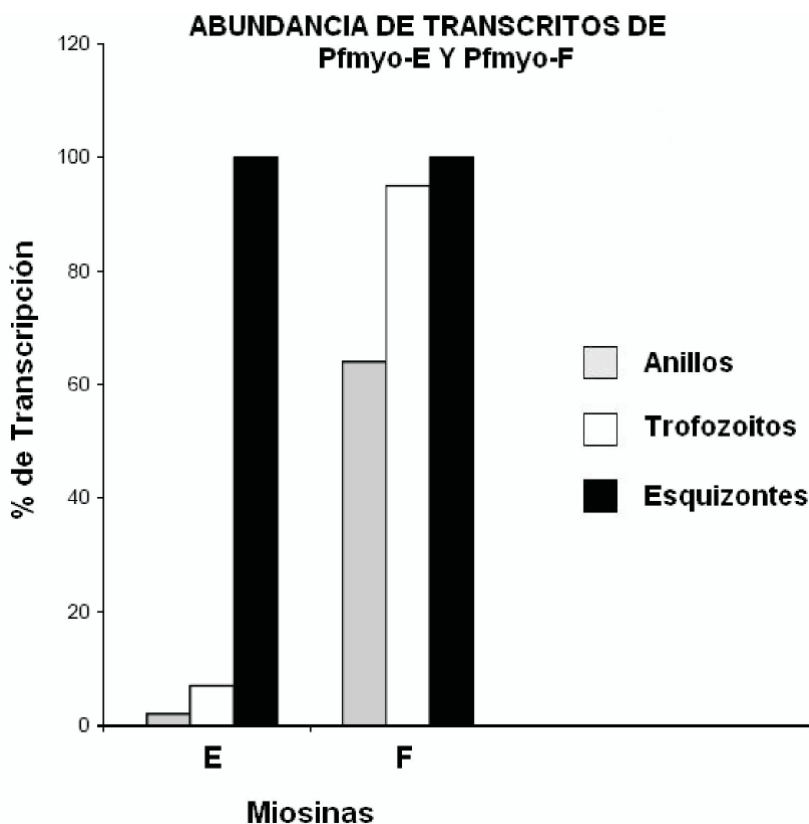


Figura 5. Abundancia de los transcritos de Pfmyo-A, Pfmyo-B, Pfmyo-C y Pfmyo-D en estadios intraeritrocíticos de *Plasmodium falciparum*.

La cuantificación de la abundancia de los transcritos para cada una de las miosinas en cada uno de los tres estadios de desarrollo, se hizo por medio de imágenes digitales. La intensidad de las bandas obtenidas, cada gen en estadio de anillos, trofozoitos o esquizontes fue medida, y a la banda más intensa se le asignó un porcentaje de transcripción del 100%. Luego, la intensidad de las señales obtenidas para los otros dos estadios fue expresada como porcentaje relativo al 100%.

Se obtuvieron proteínas recombinantes para PFMYO-E y PFMYO-F y con ellas se produjeron anticuerpos policlonales que se usaron en ensayos de inmunoblot e inmunofluorescencia. En los ensayos de Western blot se detectó a PFMYO-E mayoritariamente en esquizontes y a PFMYO-F en anillos, trofozoitos y esquizontes. En los ensayos de inmunofluorescencia, usando el anti-PfmyoE, se observaron señales débiles en merozoitos y en anillos, y más fuertes en trofozoitos y esquizontes. El anticuerpo produjo una señal leve y difusa a nivel de todo el citoplasma pero también una señal limitada a zonas específicas del citoplasma que no coincidieron con

los núcleos o el pigmento malárico. Usando anti-Pfmyo-F se observó marcación débil cercana a los núcleos de parásitos en estadio de anillos y marcación a nivel citoplasmático en estadios de trofozoítos y esquizontes. Los resultados de localización y búsqueda de motivos indican que PFMYO-E puede estar directamente involucrada en el proceso de invasión y se ha propuesto que interactúa con precursores de la proteína de superficie del merozoito. Por su parte, PFMYO-F posiblemente tiene un papel en el transporte a nivel citoplasmático en trofozoítos y en el ensamble de merozoítos durante la esquizogonia.

Construcción del gen *Pfmyo-A* por PCR

Al hacer mediciones sobre un gran número de moléculas, la acción discreta de cada motor es enmascarada por la actividad de todos los motores trabajando de forma asincrónica. Por eso, como una estrategia paralela, se planteó un estudio estructural y funcional de PFMYO-A por medio de ensayos de “trampa óptica” y cristalografía, para lo que era necesario obtener proteína pura. Aunque el acercamiento experimental más directo era clonar el gen completo y expresar la proteína en un sistema procariote o eucariote, el tamaño del gen (2457pb) y su contenido A+T (68, 7%) hacía difícil pensar en una amplificación eficiente y exacta por PCR (Romanos *et al.*, 1991; Hernan *et al.*, 1992; Hale & Thompson, 1998). Por tanto, se decidió sintetizar el gen *Pfmyo-A* usando el acercamiento metodológico descrito por Withers-Martínez *et al.* (1999), usando un sistema de expresión estandarizado en el laboratorio: *Drosophilla melanogaster*. Así, el gen *Pfmyo-A* se dividió en tres fragmentos y la secuencia de nucleótidos de cada uno de ellos fue traducida a aminoácidos, y esta secuencia fue traducida nuevamente a nucleótidos pero usando el “codon usage” de *D. melanogaster*. Entre los clones elegidos, la secuencia más fiel tenía ocho cambios (cinco delecciones puntuales y tres mutaciones puntuales) y aunque se había planeado usar un kit de mutación dirigida en caso de tener que corregir cambios producidos durante la amplificación, la cantidad de delecciones y mutaciones en los productos fue muy alta. Para tratar de evitar (o al menos disminuir al mínimo) las posibles mutaciones, se ensayaron muy diversos cambios en las condiciones de amplificación; sin embargo, la fidelidad de las secuencias no mejoró con ninguna de las modificaciones. Este acercamiento metodológico se hizo simultáneamente en tres laboratorios del Kings College London, cada uno amplificando uno de los fragmentos del gen, y ninguno obtuvo secuencias perfectas. Por todo lo anterior, se desistió de este acercamiento a la espera de alternativas experimentales que permitieran obtener el gen *Pfmyo-A* completo, expresarlo y obtener la proteína en cantidades suficientes para ensayos de cristalografía y “optical trap”.

Perspectivas

El interés particular en las miosinas de *Plasmodium* se deriva de los numerosos y esenciales tipos de movimiento que exhiben las diferentes formas del parásito y del papel protagónico que pueden tener en algunos o todos estos procesos. El trabajo que se adelanta actualmente en nuestros laboratorios comprende la búsqueda de miosinas adicionales en el genoma de *P. falciparum* usando herramientas bioinformáticas novedosas, experimentos de PCR en tiempo real para hacer un acercamiento cuantitativo a la transcripción de todos los genes ya descritos y de los recientemente hallados, experimentos de microscopia electrónica para establecer la localización ultracelular de las miosinas, análisis bioinformático de dominios y motivos para intentar inferir función de estas proteínas y experimentos de RNA de interferencia para observar el efecto del bloqueo de cada una de estas miosinas durante la liberación y la invasión.

Esta línea de investigación propone hacer un estudio sobre las miosinas de *P. falciparum*, con el propósito de inferir función y establecer si pueden a futuro constituirse en potenciales blancos quimioterapéuticos. Aunque es un proceso complejo transformar estos blancos (identificados por análisis molecular) en fármacos seguros y efectivos, conocer las diferencias entre el hospedero y el parásito debe facilitar en gran manera el desarrollo de tratamientos eficaces contra la malaria. Adicionalmente se pretende contribuir al análisis del Genoma, Transcriptoma y Proteoma del parásito, ya que el reto ahora es generar conocimiento biológico y bioquímico de elementos cuya existencia sólo ha sido reportada a través de análisis computacional

Agradecimientos

Universidad Nacional de Colombia, Instituto Nacional de Salud, Universidad el Bosque, King's College London. Estos resultados han sido obtenidos gracias a la financiación de Colciencias (Proyecto 1308-343-19109), Banco de la República (Proyecto 2.155), UNESCO y The Wellcome Trust.

Referencias

- Bannister LH, Mitchell G. 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. *TRENDS in Parasitology* 19: 209-213.
- Bement WM, Hasson T, Wirth JA, Cheney RE, Mooseker MS. 1994. Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11767.

- Ben Mamoun C, Gluzman IY, Hott C, MacMillan SK, Amarakone AS, Anderson DL, Carlton JM, Dame JB, Chakrabarti D, Martin RK, et al. 2001. Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed by microarray analysis. *Mol Microbiol* 39: 26-36.
- Berg JS, Powell BC, Cheney RE. 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794.
- Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA, Duncan KL, Korn ED. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 269: 14869-14871.
- Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM. 2000. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem* 275: 5163-5170.
- Calvo E, Rubiano C, Vargas A, Wasserman M. 2002. Expression of housekeeping genes during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 88: 267-271.
- Carmona-Fonseca J. 2003. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *IATREIA* 16: 299-318.
- Chaparro-Olaya J, Margos G, Coles DJ, Dluzewski AR, Mitchell GH, Wasserman MM, Pinder JC. 2005. *Plasmodium falciparum* myosins: transcription and translation during asexual parasite development. *Cell Motil Cytoskeleton*. 60: 200-213.
- Chaparro-Olaya J, Dluzewski A, Margos G, Wasserman M, Mitchell G, Bannister L, Pinder J. 2003. The smallest malarial myosin, *Plasmodium falciparum* myosin-B (Pfmyo-B) is expressed in mature schizonts and merozoites. *European Journal of Protistology* 39: 423-427.
- Cope MJ, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J. 1996. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* 4: 969-987.
- Dame JB, Arnot DE, Bourke PF, Chakrabarti D, Christodoulou Z, Coppel RL, Cowman AF, Craig AG, Fischer K, Foster J, et al. 1996. Current status of the *Plasmodium falciparum* genome project. *Mol Biochem Parasitol* 79: 1-12.
- Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. 1997. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 26: 163-173.

- Dobrowolski JM, Niesman IR, Sibley LD. 1997. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* 37: 253-262.
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. 1998. Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28: 1007-1013.
- Egelman EH. 2001. Molecular evolution: actin's long lost relative found. *Curr Biol* 11: R1022-1024.
- Endow SA, Higuchi H. 2000. A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* 406: 913-916.
- Fath KR & Burgess DR. 1993. Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J Cell Biol* 120: 117-27.
- Fichera ME, Roos DS. 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390: 407-409.
- Field SJ, Pinder JC, Clough B, Dluzewski AR, Wilson RJ, Gratzer WB. 1993. Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 25: 43-48.
- Hale RS, Thompson G. 1998. Codon optimization of the gene encoding a domain from human type 1 neurofibromin protein results in a threefold improvement in expression level in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 12: 185-188.
- Heintzelman MB, Schwartzman JD. 1999. Characterization of myosin-A and myosin-C: two class XIV unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Cell Motil Cytoskeleton* 44: 58-67.
- Hernan RA, Hui HL, Andracki ME, Noble RW, Sligar SG, Walder JA, Walder RY. 1992. Human hemoglobin expression in *Escherichia coli*: importance of optimal codon usage. *Biochemistry* 31: 8619-8628.
- Hettmann C, Herm A, Geiter A, Frank B, Schwarz E, Soldati T, Soldati D. 2000. A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol Biol Cell* 11: 1385-1400.
- King CA. 1988. Cell motility of Sporozoan protozoa. *Parasitol Today* 4: 315-319.
- Korn ED. 2000. Coevolution of head, neck, and tail domains of myosin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12559-12564.
- Krendel M, Mooseker MS. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20: 239-251.

- Li JF, Nebenführ A. 2007. Organelle targeting of myosin XI is mediated by two globular tail subdomains with separate cargo binding sites. *J Biol Chem.* 282(28): 20593-20602.
- Miller LH, Aikawa M, Johnson JG, Shiroishi T. 1979. Interaction between Cytochalasin B treated malarial parasites and the erythrocyte. *J Exp Med* 149: 172-184.
- Mizuno Y, Makioka A, Kawazu S, Kano S, Kawai S, Akaki M, Aikawa M, Ohtomo H. 2002. Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 88: 844-848.
- Pinder JC, Fowler RE, Dluzewski AR, Bannister LH, Lavin FM, Mitchell GH, Wilson RJ, Gratzer WB. 1998. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci* 111: 1831-1839.
- Preston TM, King CA. 1996. Strategies for cell-substratum dependent motility among Protozoa. *Acta protozoologica* 35: 3-12.
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261: 50-58.
- Romanos MA, Makoff AJ, Fairweather NF, Beesley KM, Slater DE, Rayment FB, Payne MM, Clare JJ. 1991. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res* 19: 1461-1467.
- Russell DG. 1983. Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasite's contractile system? *Parasitology* 87: 199-209.
- Schmitz S, Grainger M, Howell S, Calder LJ, Gaeb M, Pinder JC, Holder AA, Veigel C. 2005. Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol* 349: 113-125.
- Sellers JR. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496: 3-22.
- Shaw MK, Tilney LG. 1999. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9095-9099.
- Smith CA, Rayment I. 1996. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys J* 70: 1590-1602.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple

sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

Wetzel DM, Hakansson S, Hu K, Roos D, Sibley LD. 2003. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell* 14: 396-406.

World Health Organization (WHO). 2005. WHO Report on Infectious Diseases. www.who.int/infectious-disease-report/

World Health Organization WHO. 2005. World malaria report. Informe Roll back. Prepared by: Roll Back Malaria, World Health Organization, UNICEF. ISBN 92 806 3880 7 UNICEF, WHO/HTM/MAL/2005.1102

COMENTARIOS AL TRABAJO DE LA PROFESORA CHAPARRO

La malaria, una enfermedad causada por parásitos del género Plasmodium, es una de las infecciones parasitarias más importantes en el mundo y es uno de los retos más grandes que en salud pública enfrentan los países del tercer mundo. Hay cuatro especies de Plasmodium que infectan seres humanos, pero casi todas las muertes y gran proporción de la morbilidad son causadas por P. falciparum.

Los parásitos que causan la malaria pertenecen al Phylum Apicomplexa, el cual agrupa miles de especies de patógenos de considerable importancia médica y veterinaria; todos ellos son parásitos obligados, y por eso su supervivencia y proliferación depende de su habilidad para invadir a las células de sus hospederos. Para que el proceso de invasión ocurra, los apicomplexa penetran activamente a sus células hospederas exhibiendo un sistema de locomoción, único en eucariotes, denominado “gliding”. Considerando que las enfermedades causadas por estos parásitos tienen tremendo impacto médico y económico, nuestro punto de partida en esta línea de investigación fue plantear que si los apicomplexa tienen una estrategia única de invasión, esto quizá puede representar también una estrategia única de control.

A final de los años noventa se sabía que la invasión de los apicomplexa dependía de un motor actina-miosina, se había identificado una única secuencia de miosina en P. falciparum y otras tres secuencias habían sido asignadas como miosinas putativas a través de trabajo computacional. Hoy día, nuestro trabajo bioinformático y experimental ha permitido saber que hay al menos seis secuencias de miosina en el genoma de P. falciparum, que todas se transcriben y expresan durante el ciclo intraeritrocítico del parásito, y que al menos dos parecen estar directamente involucradas en los procesos de invasión.

A pesar de los avances, aun quedan muchas preguntas sin resolver acerca de la movilidad y la invasión de los parásitos apicomplexa. Sin embargo, es indudable que el “gliding” es una de las estrategias que han contribuido al gran éxito de los apicomplexa a través de la evolución, y por eso su estudio puede proporcionar herramientas que permitan bloquear uno de los procesos centrales de la enfermedad: la invasión.

El interés particular en las miosinas de Plasmodium se deriva por supuesto de su participación en el “gliding”, pero también en otros numerosos y esenciales tipos de movimiento que exhiben las diferentes formas del parásito. Por eso, esta línea de investigación propone hacer un estudio sobre las miosinas de P. falciparum, con el propósito de establecer si pueden a futuro constituirse en potenciales blancos quimioterapéuticos. Adicionalmente, se pretende contribuir al análisis del Genoma, Transcriptoma y Proteoma del parásito, ya que el reto ahora es generar conocimiento biológico y bioquímico de elementos cuya existencia sólo ha sido reportada a través de análisis computacional.

Organización y mantenimiento de los telómeros de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*

María Mercedes Galindo¹, Noelia Lander¹, Evelyn Rodríguez¹, Katherine Figarella¹, María Gabriela Rojas¹, José Luis Ramírez^{1*}, Néstor Añez², Miguel Angel Chiurillo³, José Franco Da Silveira⁴ y Roberto Do Campo⁵

Resumen

En este trabajo presentamos los avances de nuestro Grupo en la elucidación de la estructura y mantenimiento de los telómeros en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. En el primer organismo hemos logrado demostrar una importante actividad de telomerasa, lo que contradice publicaciones anteriores en la materia. La actividad es aumentada por el uso de un oligonucleótido terminado en G, y es activada también por tratamiento térmico. En el caso de *T. cruzi* nuestros estudios se han centrado en la proteína DGF-1, la cual tiene presencia en los telómeros de este parásito. Nuestros hallazgos señalan que la proteína está presente dentro de una aparente nueva organela, y su expresión ocurre fundamentalmente en el estadio amastigote.

Palabras clave: telómeros, fuerte actividad de telomerasa en *L. major*, activación por calor, proteína DGF-1 en *T. cruzi*, ubicación y expresión.

Abstract

Hereby we discuss our work on *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* telomeric structure and maintenance. Contradicting previous publications

¹ Centro de Biotecnología Instituto de Estudios Avanzados MppCT, Caracas.

² Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Venezuela.

³ Escuela de Medicina, Universidad Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.

⁴ Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, Brasil.

⁵ University of Georgia, Athens, USA.

* Autor de correspondencia, correo electrónico: ramjoseluis@gmail.com; teléfono 58-212-962.16.05; fax. 58-212-903.5086.

we have found that *L. major* telomerase has a very important activity, but several conditions have to be adjusted to be able to register it, such as an oligonucleotide ending in a G-rich sequence, and heat activation.

In *T. cruzi*, our efforts have been directed to study the cell localization and function of DGF-1 protein, an enigmatic protein always associated to the parasite telomeres. DGF-1 seemed to be localized in a novel organelle, and is mainly expressed in amastigotes forms.

Key words: telomeres, high activity of *L. major* telomerase, heat activation, *T. cruzi* protein DGF-1, location and expression.

Las regiones terminales de los cromosomas eucarióticos son los telómeros, los cuales juegan un importantísimo papel en la preservación de la integridad cromosomal. De no existir la estructura telomérica y la maquinaria de mantenimiento asociada a ellos, la información genética de un organismo podría verse comprometida, bien sea por pérdida de genes esenciales durante el proceso replicativo, o por asociaciones aberrantes durante los procesos de recombinación genética (Cortez-Gonzalez y Zanetti, 2007).

En células somáticas existe un estrecho control entre el número de divisiones celulares y la longitud de telómero de forma tal que una función telomérica alterada que elongue los telómeros de manera continua, podría llevar al escape del control celular dando lugar a células cancerosas.

En el caso de organismos eucarióticos unicelulares tales como las levaduras, trypanosomatidos, giardia, plasmodio y otros, los telómeros y sus regiones adyacentes (subtelómeros) pueden jugar otros importantes papeles (Figura 1). En el caso de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* los genes que determinan su sexualidad se ubican en posición telomérica, y los cambios en sexualidad se dan por mecanismos de transposición unidireccional de los genes silentes de ubicación telomérica al sitio de expresión. En *Plasmodium falciparum* algunos genes que intervienen en la variación antigénica (*Var*) ocupan una posición subtelomérica. El caso más conocido de control telomérico y variación antigénica lo encontramos en el agente etiológico de la enfermedad del sueño *Trypanosoma brucei*, en este microorganismo una copia del gen de la proteína inmunodominante de cada ciclo de parasitemia se expresa desde un punto único en el telómero (Joost *et al.*, 1991). En resúmenes podemos asegurar que en estos organismos unicelulares la región telomérica y la subtelomérica, además de resguardar la integridad cromosomal, cumplen con otros papeles relacionados con la supervivencia de estos organismos.

En los trypanosomátidos *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* no se ha documentado la existencia de variación antigénica, y a pesar de ser organismos pertenecientes a la misma familia taxonómica de *T. brucei*, la estructura de sus telómeros no guarda ninguna similitud con la de este organismo (Figura 1); este hecho nos habla de que durante el proceso evolutivo de cada uno de ellos las estructuras de sus telómeros se han ajustado a los desafíos impuestos por la condición parasítica en el hospedador vertebrado, y el paso por los vectores invertebrados.

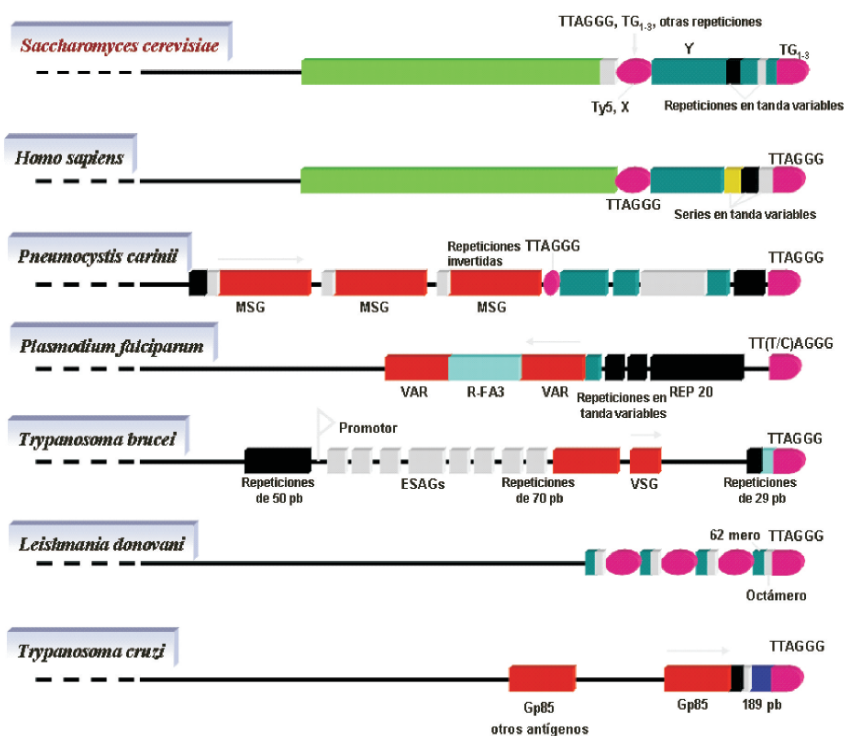


Figura 1. Esquema comparativo de la organización del telómero y sub-telómero de varios organismos unicelulares. Las distancias relativas entre genes no están a una escala exacta.

En los trypanosomatidos en general las secuencias teloméricas tienen una unidad repetitiva hexamérica rica en G+C similar a la de los humanos, aunque difieren en las permutaciones de las mismas bases. En el género *Trypanosoma* la unidad repetitiva es TTAGGG-OH3' (Chiurillo y Ramírez, 1999), mientras que en *Leishmania* esta es TAGGGT-OH3' (Chiurillo *et al.*, 2000). En todos los tripanosomátidos esta unidad hexamérica puede repetirse cientos de veces en el telómero, pero en las regiones subtelméricas o vecinales al telómero *stricto sensu*, comienzan

grandes variaciones. En el género *Leishmania* existen secuencias asociadas a telómeros que se repiten varias veces antes de llegar a la corrida de hexámeros del extremo. Esta peculiar estructura por lo general consiste de una secuencia de alrededor de 62 pb, seguida por un octámero, y luego varias unidades con la misma secuencia hexamérica del extremo (Fu y Barker, 1998; Chiurillo *et al.*, 2000) (Figura 2). Tal organización telomérica, sumada a la poca actividad telomerasa (enzima elongadora del telómero que añade repetidos hexaméricos) registrada en estos parásitos ha llevado a algunos autores a postular la existencia de mecanismos alternativos para la elongación del telómero tales como el de “patinado y elongación” (Fu y Barker, 1998) en donde estas secuencias subteloméricas jugarían un papel importante (Figura 3). Sin embargo, cuando pensamos que los organismos unicelulares como *Leishmania* necesitan para su subsistencia poblacional el estar continuamente dividiéndose, es difícil imaginarse que no tengan una fuerte actividad de telomerasa, o al menos una combinación de varios mecanismos de reposición del telómero.

La enzima telomerasa tiene una actividad retrotranscriptasa muy especial que añade de manera pausada (de seis en seis nucleótidos) los nucleótidos que constituyen el hexámero, usando como molde un molde de ARN de la sub-unidad de ARN de la telomerasa. En varios organismos estudiados, incluyendo humanos y el ciliado *Tetrahymena*, la telomerasa está altamente regulada por una serie de proteínas que activan o reprimen su actividad, y ayudan a resguardar la cadena sencilla del telómero de la acción de nucleasas.

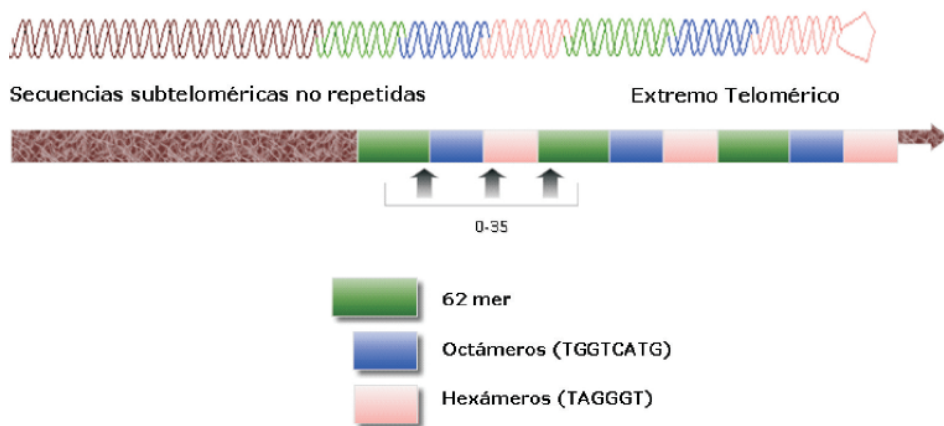


Figura 2. Representación esquemática del telómero y sub-telómero de *Leishmania*. Los bloques de las distintas secuencias del sub-telómero se repiten hasta 35 veces por extremo cromosomal, y de ahí en adelante pueden ocurrir hasta 100 repeticiones hexaméricas algunas de las cuales al final del telómero están en cadena sencilla.

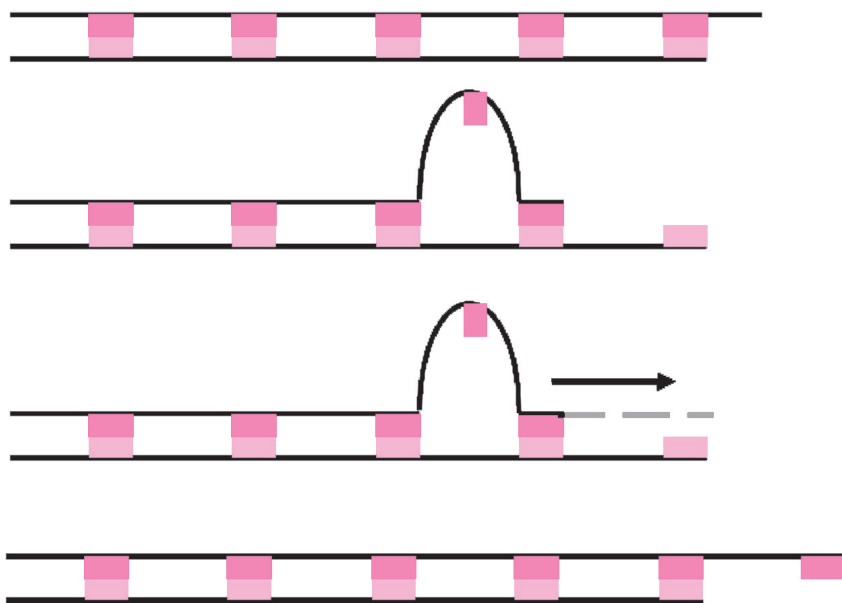


Figura 3. Mecanismo hipotético de extensión del telómero de *Leishmania* propuesto por Fu y Barker (1998). En un primer paso ocurre un resbalamiento sobre módulos repetidos, lo que deja una región cadena sencilla con un extremo OH-3' sobre ella que brinda un molde perfecto para que la ADN polimerasa lo extienda. En el paso final se resuelve el resbalamiento inicial, produciéndose así la extensión del telómero.

En nuestras investigaciones decidimos averiguar la razón para la baja actividad de telomerasa detectada en *L. major* cepa Friedlin, el organismo modelo del Proyecto Genoma de *Leishmania*. En primer lugar descubrimos que la actividad de telomerasa se veía afectada por la concentración del extracto nuclear, lo cual atribuimos a la existencia de alguna sustancia inhibidora que al diluir el extracto nuclear disminuía su efecto. Posteriormente encontramos que la secuencia del oligonucleótido que se usaba en el ensayo de detección tenía un papel importante en la actividad, siendo el oligonucleótido terminado en la permutación para tripanosomas (y no el de *Leishmania*) el más eficiente de todos (Figura 4). Por último encontramos que la actividad telomerasa era no solo activada por calor sino que era resistente a la desnaturalización aún después de ser incubada por media hora a 95°C (Figura 5). Estos cambios de temperatura podrán estar asociados con la transición promastigotes-amastigotes en donde el parásito se ve expuesto. También estos hallazgos sugieren que esta enzima puede ser un potencial blanco quimioterapéutico en el tratamiento de la leishmaniasis.

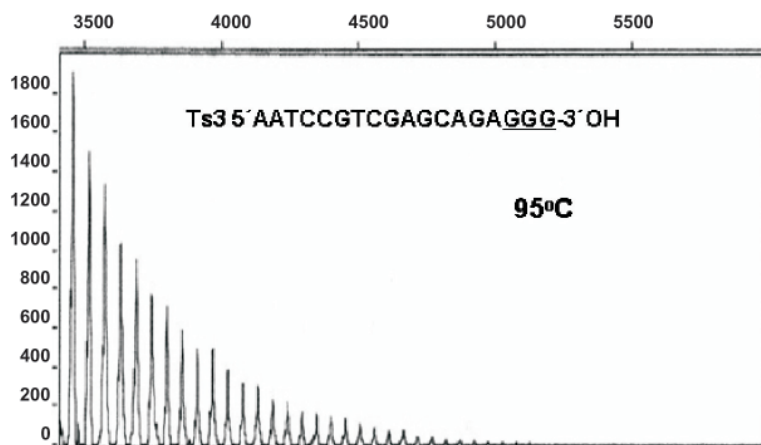


Figura 4. Actividad telomerasa de *L. major* ensayada con un kit fluorescente TRAP-TRAPEZE de la casa Chemicon, y detectada por fluorescencia en un secuenciador de ADN por capilaridad ABI-310. Los picos representan a los productos de distintos tamaños que se resuelven en una escalera de múltiplos de seis nucleótidos típicos de la actividad telomerasa. El ensayo ha sido hecho con 0, 15 µg de un extracto nuclear de *L. major* calentado durante 30 minutos a 95°C antes de hacer la reacción. Se usó en el ensayo el oligonucleótido de extensión mostrado en la figura.

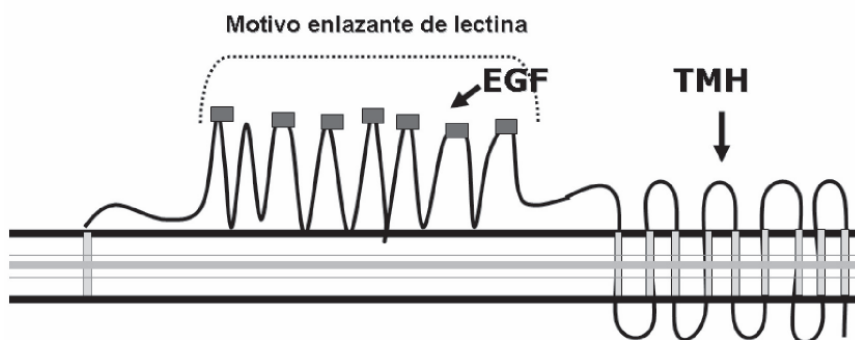


Figura 5. Esquema de la proteína DGF-1 insertada en una membrana a través de sus regiones de hélice hidrofóbicas (TMH), se indican también los motivos parecidos al factor de crecimiento epitelial (EGF). También se muestra enmarcada la región enlazante de lectina. La representación no está a escala.

En el caso de *T. cruzi*, estudios publicados por Muñoz y Collins (2004) revelan una actividad de telomerasa bastante reducida en este organismo; sin embargo, como en el caso de *Leishmania*, resultados preliminares de nuestro laboratorio revelan que *T. cruzi* también tiene gran actividad telomerasa pero esta ha sido inadecuadamente ensayada. No obstante, la

mayoría de nuestros estudios en *T. cruzi* se han orientado más a entender la dinámica de genes que han sido encontrados asociados a los telómeros, tales como las proteínas de la superfamilia de las transialidasas, y la enigmática DGF-1 (Disperse Gene Family 1). En este ensayo reportaremos nuestros avances en tratar de determinar la localización y función de la proteína DGF-1.

Esta proteína putativa tiene aproximadamente 3.000 aminoácidos equivalente a 10.000 nucleótidos (Wincker *et al.*, 1992). En su estructura presenta diez dominios de hélice transmembrana, y varios motivos similares a EGF (epidermal growth factor) (Figura 6). Aunque originalmente a esta putativa proteína se le ha sugerido una ubicación de superficie, estudios recientes sobre la proteómica de este parásito revelan que no está ubicada en la membrana celular, sino más bien una fracción particulada del citosol (Altwood *et al.*, 2006).

Usando anticuerpos policlonales contra un segmento de la región hidrofílica de esta proteína en transferencias Western de extractos de epimastigotes, amastigotes y trypomastigotes, la señal más fuerte se observa para los amastigotes. Estos resultados fueron confirmados en experimentos de inmunolocalización por inmunofluorescencia, observándose en amastigotes que la proteína se asocia en partículas u organelas situadas alrededor de la parte interna de la superficie celular. En nuestros intentos por asociar esta fluorescencia a alguna de las organelas de *T. cruzi* previamente descritas (acidocalcisoma, reservosoma, mitocondria, cuerpos lipídicos, glicosoma o vesículas picnocíticas para Con A) no resultaron en ninguna coincidencia. Por esta razón pensamos que estamos en presencia de una nueva organela de función desconocida.

Dada la regulación presentada por esta proteína y su presencia exclusiva en *T. cruzi*, nos hace presumir que esta juega un papel muy importante en la interacción parásito-hospedador vertebrado.

Referencias

- Altwood JA, Minning T, Ludolf F, Nuccio A, Wetherly DB, Alvarez-Manilla G, Tarleton R, Orlando R. 2006. Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *J Proteome Res* 5: 3376-3384.
- Chiurillo MA, Cano I, Da Silveira JF, Ramirez JL. 1999. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 100: 173-183.

- Chiurillo MA, Beck AE, Devos T, Myler PJ, Stuart K, Ramirez JL. 2000. Cloning and characterization of *Leishmania donovani* telomeres. *Exp Parasitol* 4: 248-258.
- Cortez-Gonzalez X, Zanetti M. 2007. Telomerase immunity from bench to bedside: round one. *J Transl Med* 5: 12.
- Joost CBM, Zomerdijs Kieft R, Duyndam M, Shiels PG, Borst P. 1991. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: a telomeric expression site for variant-specific surface glycoprotein genes with novel features. *Nucleic Acids Res* 19: 1359-1368.
- Muñoz DP, Collins K. 2004. Biochemical properties of *Trypanosoma cruzi* telomerase *Nucleic Acids Res* 32: 5214-5222.

Impacto del secuenciamiento del genoma de tres especies de *Leishmania* en la investigación básica y aplicada en Colombia

Andrés Flórez¹, Allan Kuchinsky², Daeui Park³, Jairo Espinosa⁴,
Willington Vega⁴, Jorge Zuluaga⁵, Carlos Muskus^{*1}

Resumen

La leishmaniasis es un enfermedad causada por varias especies del género *Leishmania*, la cual se puede presentar bajo tres formas clínicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Para el tratamiento de la enfermedad no se dispone de muchas opciones terapéuticas y las pocas que existen tienen inconvenientes de toxicidad, costos moderados o elevados y están perdiendo efectividad debido a la presencia de cepas resistentes, lo que justifica la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas o de blancos moleculares a través de varias estrategias.

El análisis comparativo del genoma de tres especies de *Leishmania* secuenciadas ha mostrado que estos son muy similares en contenido y organización génica; sin embargo, el genoma de *Leishmania braziliensis* ha mostrado características distintivas respecto a las otras dos. La secuencia disponible de los genomas y de datos experimentales de muchos microorganismos, está siendo utilizada por grupos de investigación y la industria farmacéutica en la búsqueda de blancos de medicamentos y de antígenos candidatos a vacunas. En el PECET y en asocio con grupos de investigación de otras universidades y con la

* Correo electrónico: carmusk@yahoo.com

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Calle 62 No. 52-59, Lab. 632, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín. Tel: 219-6507, Fax: 219-6511.

² Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA.

³ Korean BioInformatic Center (KOBIC), KRIBB, Daejeon-Corea.

⁴ Grupo de Automática, Universidad Nacional, Sede Medellín.

⁵ Grupo de Física y Astrofísica Computacional.

colaboración de investigadores en EUA y Corea, hemos generado redes proteicas de las tres especies secuenciadas. Mediante esta aproximación, hemos encontrado diez enzimas con criterios de esencialidad altos, que no parecen tener contraparte en el genoma humano y las cuales están relacionadas funcionalmente y que podrían ser evaluadas como blancos de medicamentos.

Adicionalmente, hemos realizado búsqueda de genes que hayan sufrido eventos de fusión génica, como probablemente ocurrió con los genes que codifican por las proteínas dihidrofolato reductasa y timidilato sintetasa (dhfr-ts) que codifican una proteína bifuncional en los tripanosomatidos. Estas proteínas bifuncionales muy probablemente tendrían una estructura tridimensional diferente a la de sus genes componentes individuales, lo que las hace susceptibles de inhibición por medicamentos de manera específica o de monitoreo por docking frente a diferentes compuestos con potencialidad inhibitoria. Finalmente hemos elaborado el interactoma y el modelo matemático del proceso de edición del RNA del kinetoplasto de *Leishmania*, con el fin de predecir puntos críticos de regulación en este proceso.

Palabras clave: bioinformática, *Leishmania*, genomas, red proteica, fusión génica.

Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by several species of the genus *Leishmania*. The parasites is involved in pathologies that range from cutaneous to visceral forms depending on the species of *Leishmania* and the host immune response. There are not many therapeutic options to treat the disease and the available ones are associated with severe side effects, expensive and depending on the area, low drug efficacy due to resistance occur. All these inconvenient, justify the search of new therapeutic options or drug target by means of several approaches.

Comparative analysis of the three *Leishmania* species sequenced up to date, have shown a high similarities both, in gene content and genomic organization. However, the *Leishmania braziliensis* genome has shown distinctive or unique characteristic. The available genome sequences along with experimental data of many microorganisms is being used by research groups and the pharmaceutical industry in searching drug targets or vaccine candidates. The PECET, along with researchers from other universities and collaborators in USA and Korea, have generated the protein networks of the three annotated *Leishmania* genomes. By mean of this approach, we selected the first 10 proteins showing higher essentiality criteria and without counterpart in the human proteome. Interestingly, these 10 proteins are functionally related and might be evaluated as drug target candidates.

Additionally, we have searched new gene fusion events in the *Leishmania* genome as occurred with the bifunctional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (dhfr-ts) in trypanosomatids. The new fused proteins should have a different or modified structure as compare with each single or individual protein which render them as drug target in a specific manner or monitoring them by docking with different compound with potential inhibitory activity. Finally, we have constructed the interactome and the mathematical model of the RNA editing, an important process in the production of functional transcript in the *Leishmania* kinetoplasts, aimed to figure out or predict critical points in the regulation of the RNA editing.

Key words: bioinformatic, *Leishmania*, genomes, protein network, gene fusion.

Generalidades sobre leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad causada por varias especies del género *Leishmania* la cual se puede presentar bajo tres formas clínicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Lynn & McMaster, 2008). Es transmitida al humano o a los reservorios por la picadura de insectos hembras del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. El género *Leishmania* se encuentra dividido en dos subgéneros, uno denominado a su vez subgénero *Leishmania* y en el cual se encuentran clasificadas las especies presentes en el Viejo Mundo y las especies del complejo mexicana en el Nuevo Mundo y *Leishmania infantum*, la cual se encuentra tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo. En el subgénero *Viannia*, se encuentran clasificadas únicamente especies del Nuevo Mundo (Lainson & Shaw, 1987). Aunque se conoce que el estado inmune y la raza del hospedero pueden jugar algún papel en el tipo de presentación clínica, parece que la especie del parásito es la que más influencia la forma clínica de la enfermedad. Mientras la leishmaniasis visceral se asocia más con especies del complejo donovani, la forma mucocutánea se asocia más con el complejo braziliensis. Para el tratamiento de la enfermedad no se dispone de muchas opciones terapéuticas y las pocas que existen tienen inconvenientes de toxicidad, costos moderados o elevados y están perdiendo efectividad debido a la presencia de cepas resistentes, lo que justifica la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas o de blancos moleculares a través de varias estrategias.

Características particulares de los tres genomas de *Leishmania* secuenciados

Actualmente se tiene la secuencia completa y anotada de tres especies de *Leishmania*: dos especies del subgénero *Leishmania*, como *L. major* y *L. infantum*,

causantes de leishmaniasis cutánea y visceral, respectivamente, y una del subgénero *Viannia*, como *L. braziliensis*, la principal causante de leishmaniasis cutánea pero también de la forma mucocutánea en Latinoamérica (Peacock, *et al.*, 2007). Además de estas tres especies secuenciadas, actualmente se está realizando el secuenciamiento de *Leishmania mexicana*.

El análisis comparativo de los genomas secuenciados de las tres especies de *Leishmania* ha mostrado que estos son muy similares en contenido y organización génica (Smith, *et al.*, 2007); sin embargo, el genoma de *Leishmania braziliensis* ha mostrado características distintivas respecto a las otras dos. Mientras que *Leishmania infantum* y *Leishmania major* tienen los genes distribuidos en 36 cromosomas, *Leishmania braziliensis* presenta 35 cromosomas quizás producto de la fusión del cromosoma 20 y 34 (Figura 1).

Interesantemente en el genoma de *Leishmania braziliensis* se encontraron algunos elementos ausentes en el genoma de *L. major* como retrotransposones (Bringaud *et al.*, 2006), y genes componentes de una vía putativa de RNA de interferencia (RNAi), (Peacock *et al.*, 2007) lo que posibilitaría la evaluación funcional de genes en esta especie en particular mediante este protocolo. Se cree que este mecanismo podría haber permanecido en especies de *Leishmania Viannia*, como un mecanismo de defensa antiviral dado que estas *Leishmania* se han encontrado infectadas por virus (Widmer, *et al.*, 1989; 1990). Adicionalmente, el número de genes inactivos o pseudogenes es

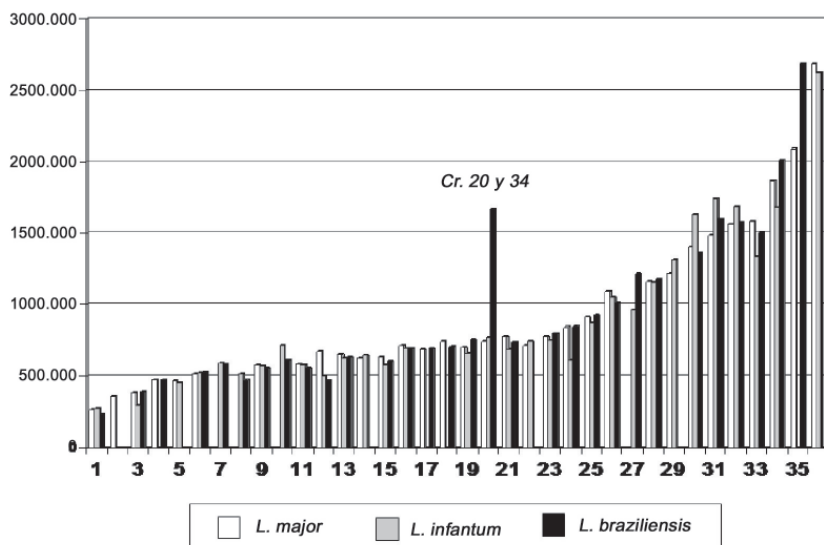


Figura 1. Tamaño en pares de bases de cada uno de los cromosomas de las tres especies de *Leishmania* secuenciadas. *Leishmania braziliensis* presenta un cromosoma menos que las otras dos especies, producto de la fusión de los cromosoma 20 y 34.

significativamente mayor en *Leishmania braziliensis* (161 frente a 97 en *L. major* y 161 frente a 41 en *L. infantum*), (Peacock *et al.*, 2007) sugiriendo incluso que quizás las diferencias biológicas entre *Leishmania braziliensis* y las otras dos no estarían dadas por el número diferente de genes activos, sino por el número de genes inactivos o pseudogenes.

Existen unos 200 genes, de los casi 8300 que se estima que tiene el genoma de *Leishmania*, que son específicos de especies (Smith *et al.*, 2007). Es quizás en estos 200 genes donde reside la diferencia observada no solo en el comportamiento virulento, sino en la capacidad de infectar diferentes vectores y que permitirían distinguir una especie de otra. Por otra parte, el análisis de la expresión diferencial de genes entre amastigotes y promastigotes de *Leishmania major* evidenció un bajo nivel de genes estadio-específicos, por lo que se sugiere que la expresión es prácticamente constitutiva, con solo una variación estimada entre 0, 2 y 5% (Leifso *et al.*, 2007; Cohen-Freue, *et al.*, 2007).

Investigación *in silico* en Latinoamérica

La secuencia disponible de estos genomas y de datos experimentales ha sido y está siendo utilizada por grupos de investigación en muchos países, en la búsqueda de blancos de medicamentos y de antígenos candidatos a vacunas. La búsqueda de artículos publicados por países de América, Europa y Asia, y cruzándolos con palabras claves como Bioinformatics, Computational Biology, Genomes y System Biology, como un reflejo de la investigación *in silico* muestra la poca tendencia en Latinoamérica de realizar investigación a partir de los genomas secuenciados y de información disponible en un sinnúmero creciente de bases de datos. Mientras que investigadores de Estados Unidos lideran este tipo de investigación a nivel mundial, seguido por Canadá en América, en Latinoamérica solo se destacan países como México, Brasil y en menor proporción Argentina, pero muy distantes de EUA y Canadá en América y de algunos países en Europa como Alemania, Francia, España, Italia y de China e India en Asia.

La explotación de la información de los genomas de *Leishmania* o bases de datos relacionadas requiere de aproximaciones multidisciplinarias que incluyan análisis de estructura de proteínas y análisis funcional, además de métodos de tamizaje masivo de librerías químicas (Handman *et al.*, 2008), seguidas de evaluación experimental *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, finalizando con evaluaciones en humanos.

Esta amplia cantidad de información nueva hace posible una más comprensible y aguda identificación usando aproximaciones computacionales,

incluyendo identificación de moléculas metabólicas cruciales y/o búsqueda de ortólogos, los cuales sean blancos reconocidos de medicamentos (Handman *et al.*, 2008). En Colombia, la utilización no solo de los genomas publicados de las tres especies de *Leishmania*, y de otros organismos en la realización de investigación básica y aplicada, se puede considerar nula o muy incipiente en grupos de investigación en algunas universidades o centros. La causa de esto, aunque no se conoce exactamente, podría deberse a la escasez de recurso humano capacitado en manejo de herramientas computacionales aplicadas a sistemas biológicos, además de la falta de recursos computacionales adecuados para el manejo y uso masivo de la abundante información disponible.

En el PECET y en asocio con grupos de Ingenieros y matemáticos de la Universidad de Antioquia y de la Universidad Nacional Sede Medellín, y con la colaboración de investigadores en EUA y Corea, estamos empleando la información disponible de los genomas de estas tres especies en:

- i. La búsqueda de blancos moleculares y/o candidatos a vacunas a través de la generación de redes proteicas a partir de las secuencias de proteínas anotadas (Figura 2) y que tengan una confiabilidad de interacción mayor del 60%, seguido de la selección de las proteínas



Figura 2. Construcción de la red proteica de las tres especies de *Leishmania* secuenciadas y disponibles en la base de datos del geneDB. Las tres redes fueron construidas con aquellas proteínas que mostraron una probabilidad de interacción mayor del 60%.

que podrían ser importantes en la robustez del interactoma empleando métricas de esencialidad (Figura 3). Interesantemente, las diez primeras proteínas con criterios de esencialidad más altos, y que no parecen tener contraparte en el genoma humano, son enzimas relacionadas funcionalmente.

- ii. Búsqueda de genes producto de eventos de fusión génica (Figura 4), que codifiquen proteínas bifuncionales, como probablemente ocurrió con los genes que codifican por la proteína dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (dhfr-ts) en los tripanosomatidos. Estas proteínas bifuncionales muy probablemente tendrían una estructura tridimensional diferente a la de sus genes componentes individuales, lo que las hace susceptibles de inhibición por medicamentos de manera específica o de monitoreo por docking frente a diferentes compuestos con potencialidad inhibitoria.
- iii. Adicionalmente hemos elaborado el interactoma y estamos estableciendo el modelo matemático del proceso de edición del RNA, un proceso importante en la generación transcritos funcionales en el kinetoplasto de los parásitos de *Leishmania* (datos no mostrados).

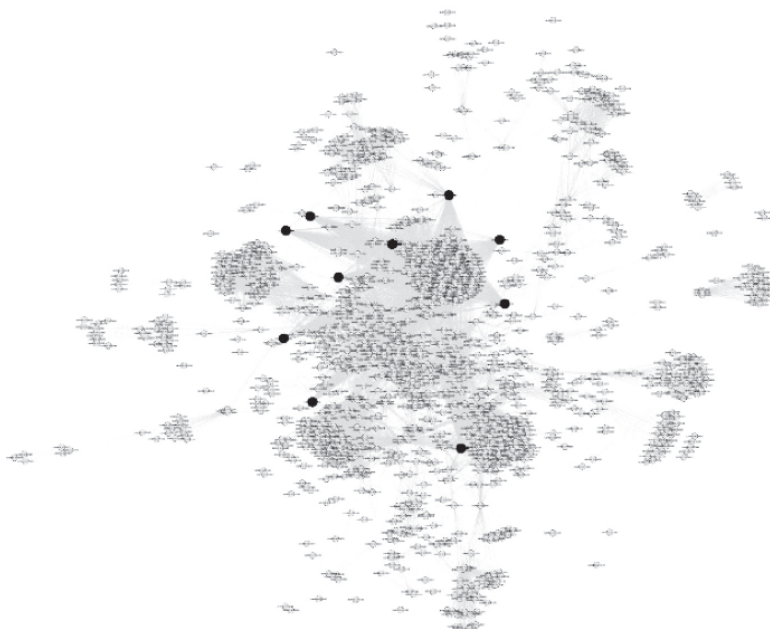


Figura 3. Identificación de las proteínas con los valores más altos de esencialidad en el interactoma de *Leishmania braziliensis*. Los nodos resaltados en negro corresponden a las proteínas con altos valores de esencialidad y que no presentan contraparte en el proteoma humano.

Referencias

- Bringaud F, Ghedin E, Blandin G, Bartholomeu DC, Caler E, Levin MJ, Baltz T, El-Sayed NM. 2006. Evolution of non-LTR retrotransposons in the trypanosomatid genomes: *Leishmania major* has lost the active elements. *Mol Biochem Parasitol* 145: 158-170.
- Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. 2007. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37(10): 1077-1086.
- Handman E, Kedzierski L, Uboldi AD, Goding JW. 2008. Fishing for anti-*Leishmania* drugs: principles and problems. *Adv Exp Med Biol* 625: 48-60. Review.
- Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution, in *The Leishmaniases in Biology and Epidemiology* Vol. 1 (Peters, W. and Killick-Kendrick, R., eds), pp 1-120, Academic Press.
- Lynn MA, McMaster WR. 2008. *Leishmania*: conserved evolution—diverse diseases. *Trends Parasitol* 24(3): 103-105.
- Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. 2007. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152(1): 35-46.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39(7): 839-847.
- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. 2007. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases. *Int J Parasitol* 37(11): 1173-1186. Review.
- Widmer G., Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. 1989. Characterization of an RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5979-5982.
- Widmer G., Keenan, MC, Patterson JL. 1990. RNA polymerase is associated with viral particles isolated from *Leishmania braziliensis* subsp. *guyanensis*. *J Virol* 64: 3712-3715.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR MUSKUS

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida a través de la picadura de insectos vectores del género Lutzomyia en el Nuevo Mundo y Phlebotomous en el Viejo Mundo y se presenta bajo tres formas clínicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Esta enfermedad, incluida en la lista de enfermedades olvidadas, tiene un gran impacto tanto en la magnitud de la morbilidad como de la mortalidad y además por su amplia distribución mundial. La leishmaniasis es prevalente en países tropicales y subtropicales y con algunas excepciones, estos países son en su mayoría catalogados como economías de bajos ingresos, siendo los habitantes más afectados aquellos que residen en zonas deprimidas y de escasos recursos, con otras enfermedades asociadas y con problemas de desnutrición, sobre todo en la población infantil, por lo cual se le ha asociado a condiciones de pobreza. La leishmaniasis visceral, justamente la forma más severa de la enfermedad, se presenta en un alto porcentaje en población infantil, la cual si no es tratada a tiempo puede ocasionarles la muerte.

Debido a la ausencia de una vacuna efectiva para la leishmaniasis, las principales medidas de control se han concentrado en la administración de tratamiento, sobre todo en regiones donde se ha demostrado la participación del hombre como reservorio del parásito (transmisión antroponótica), y adicionalmente en el control de vectores y educación a la comunidad. Sin embargo, estas medidas no han incidido de manera significativa en el control de la enfermedad dado que el número de casos por año va en aumento. Además, existen reportes de fallas terapéuticas debido a cepas resistentes a los antimoniales, que aún son el medicamento de elección en la mayoría de las zonas endémicas (Grögl et al., 1992; Ibrahim et al., 1994), con algunas excepciones donde utilizan medicamentos diferentes a los antimoniales como la miltefosina. La situación se complica aún más teniendo en cuenta los severos efectos adversos que presentan algunos pacientes, con consecuencias fatales en algunos casos y que estos antimoniales están contraindicados en algunas personas. Por todas estas razones, la búsqueda de nuevos medicamentos, más eficaces, seguros, de moderado costo o de una vacuna, es una necesidad urgente en esta enfermedad.

En el área de desarrollo de medicamentos y/o vacunas contra una determinada entidad, el empleo de herramientas bioinformáticas se ha convertido en una alternativa promisorio debido a la gran cantidad de información disponible tanto de genes como de genomas, lo cual hace posible una búsqueda e identificación de blancos moleculares más comprensible mediante el empleo de nuevas aproximaciones computacionales, como, por ejemplo, en la identificación de metabolitos que actúen en puntos regulatorios, búsqueda de genes ortólogos de blancos de drogas conocidos y/o la identificación de proteínas de microorganismos que podrían interactuar con drogas conocidas, etc.

En general el desarrollo de un nuevo medicamento efectivo o una vacuna, manufacturada a bajo costo, tendría de hecho un impacto o repercusión social ya que las poblaciones más afectadas son aquellas que viven en condiciones de pobreza, y en el caso de la leishmaniasis se podría evitar la muerte ocasionada por una enfermedad curable sobre todo en población infantil. Adicionalmente, se podrían evitar situaciones tan dramáticas como ocurre en países como Afganistán donde las personas son aisladas de la comunidad, a los niños con leishmaniasis no se les permite jugar con otros niños y las mujeres con lesiones en el rostro tienen dificultades para encontrar esposos.

ARN nucleolares pequeños de tripanosomátidos: un ejemplo de la importancia de los ARN no traducidos

Concepción J. Puerta¹

Resumen

Estudios recientes han revelado la importancia que poseen los ARN no traducidos en el funcionamiento de la célula. Los ARN pequeños nucleolares (snoRNA, por su sigla en inglés) hacen parte de estas moléculas, siendo los encargados de modificar y procesar a otros ARN, en especial el ARN ribosomal (ARNr). Existen dos grandes familias de snoRNA: los C/D y los H/ACA. Los primeros se encargan, junto con la enzima metilasa, de mediar la metilación de la molécula ARN blanco, mientras que los segundos, en conjunto con la enzima pseudouridina sintasa, guían la pseudouridinilación. En tripanosomátidos, los H/ACA snoRNA además participan en procesos como el “trans-splicing” del ARN mensajero (ARNm), siendo por ende de vital importancia para el parásito. En este trabajo, además de revisar el estado del arte de estos ARN, se presenta la caracterización de la agrupación génica C1 del parásito *Trypanosoma rangeli* (codificante para seis snoRNA, tres pertenecientes a cada una de las familias), su comparación con la de otros tripanosomátidos y las perspectivas del estudio de estos ARN en tripanosomátidos.

Palabras clave: ARN, ARNr, snoRNA, C/D snoRNA, H/ACA snoRNA, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*.

Con el rápido desarrollo de los proyectos genomas y transcriptomas así como de las herramientas bioinformáticas, se ha puesto de manifiesto la importancia que poseen los ARN no traducidos en diferentes comparti-

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 43-82, Edificio 50, Laboratorio 113, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: cpuerta@javeriana.edu.co

mientos y estadios de desarrollo de las células. Por ejemplo, en el nucleolo existe una compleja población de ARN pequeños llamados ARN nucleolares pequeños (snoRNA, por su sigla en inglés) encargados de modificar y procesar a otros ARN, en especial el ARN ribosomal (ARNr) (Bachellerie *et al.*, 1995; Bachellerie & Cavaillé, 1997).

En todos los eucariotes, los genes que codifican para el ARNr se transcriben en el nucleolo como transcritos precursores de gran tamaño, los cuales deben ser procesados y modificados para producir las moléculas de ARNr maduras. Por ejemplo, en levaduras el procesamiento da lugar a las moléculas de ARNr denominadas 18 S, 5, 8 S y 25 S (Eichler y Craig, 1994). En tripanosomátidos, por su parte, la molécula de 28 S sufre procesamiento adicionales dando lugar a seis ARNr conocidos como 28 S?? 28 S?, sr1, sr2, sr4 y sr6 (Hasan *et al.*, 1984). En cuanto a las modificaciones del ARNr, éstas básicamente consisten en la metilación del esqueleto de la ribosa en la posición 2'-OH (Samarsky *et al.*, 1998) y la conversión de los residuos de uridina a pseudouridina (Balakin *et al.*, 1996). Algunos de los snoRNA asisten el procesamiento del precursor del ARNr, mientras que la mayoría guían los procesos de metilación y pseudouridinilación, ubicando el sitio exacto de modificación gracias a la complementariedad entre sus bases y el ARN por modificarse (Filipowicz *et al.*, 1999; Venema & Tollervey, 1999).

Existen dos grandes familias o clases estructurales de snoRNA: los C/D y los H/ACA (ver Figura 1). Los primeros se encargan, junto con la enzima metilasa (fibrillarina), de mediar la metilación, mientras que los segundos, en conjunto con la enzima pseudouridina sintasa (CBF5p), guían la pseudouridinilación (Decatur y Fournier, 2003; Filipowicz y Pogacic, 2002; Kiss, 2002). Ambos tipos de snoRNA se asocian con sus enzimas respectivas y proteínas adicionales para formar ribonucleo-proteínas (snoRNP, por su sigla en inglés) (Weinstein y Steitz, 1999).

Los C/D snoRNA se caracterizan por poseer elementos cortos conservados denominados cajas C (5'-PuUGAUGA-3') y D (5'-CUGA-3'), y secuencias menos conservadas, denominadas cajas C' y D'. Estas secuencias constituyen el punto de interacción con la fibrillarina y se sitúan muy próximas a la molécula de ARN, formando una estructura tridimensional característica (ver Figura 1a). Adicionalmente, entre ellas (cajas C y D' y/o cajas C' y D) se encuentra un segmento de complementariedad con el sitio por modificarse en el ARNr, formando así una dúplex de 10 a 21 nucleótidos (nts), la cual guía la localización de la modificación (Maxwell y Fournier, 1995). Los C/D snoRNA forman un complejo estable con las proteínas fibrillarina o Nop1p, Nop56p, Nop58p y 15, 5K/Snu13p, conformando así el núcleo o centro de la ribonucleoproteína (Aittaleb *et al.*, 2003; Lafontaine & Tollervey, 1998).

Los C/D snoRNA descritos en tripanosomátidos como *Leptomonas collosoma* (Levitan *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001), *Trypanosoma brucei* (Barth *et al.*, 2008; Dunbar *et al.*, 2000a; 2000b; Roberts *et al.*, 1998), *Leishmania tarentolae* y *Trypanosoma cruzi* (Roberts *et al.*, 1998), entre otras especies, presentan la estructura general de los mismos, así como también siguen la regla de +5, según la cual el nt a metilarse se localiza 5 nts corriente arriba de la caja D o D' (Kiss-László *et al.*, 1996). Además, en el genoma de *T. brucei* se han encontrado los genes ortólogos de todas las proteínas de eucariotes superiores que conforman la snoRNP (Barth *et al.*, 2008; Uliel *et al.*, 2004).

La metilación del ARNr es un proceso que ocurre a lo largo de la escala evolutiva, presentándose en *Archea*, levaduras y mamíferos (Omer *et al.*, 2000). En tripanosomátidos se estima la existencia de 131 metilaciones (Barth *et al.*, 2008). En *T. brucei*, por ejemplo se han identificado 57 C/D snoRNA, con un potencial de realizar 84 metilaciones, 40% de las cuales son especie-específicas (Liang *et al.*, 2005). Aunque la metilación es una modificación que afecta sustancialmente la estructura terciaria de la molécula de ARNr, su función precisa se desconoce. Llama la atención la presencia de un gran número de metilaciones en organismos sometidos a cambios bruscos de temperatura, tales como *Archea*, plantas y tripanosomátidos. Por tanto, es posible que esta hipermodificación se relacione con la necesidad de preservar la actividad ribosomal bajo condiciones adversas. De forma importante, se ha encontrado que el nivel de las metilaciones en el ARNr difiere entre las formas procíclicas y tripomastigotes del parásito, siendo más abundantes en este último estadio, resultado que apoya la anterior hipótesis (Barth *et al.*, 2008).

Evidenciando la importancia de los C/D snoRNP, el silenciamiento de la proteína fibrillarina de *T. brucei* mediante ARN de interferencia ocasiona defectos severos tanto en el procesamiento como en la modificación del ARNr que conllevan a la muerte del parásito (Barth *et al.*, 2008).

Los H/ACA snoRNA están conformados por dos horquillas unidas entre sí por una región de cadena sencilla, denominada dominio H (ANANNA), y la presencia de la tripleta ACA en el extremo 3' de la molécula (ver Figura 1b). El lazo de cada horquilla presenta una región de complementariedad con el ARNr de 4 a 10 nts, dando lugar al bolsillo de pseudouridinilación (Ganot *et al.*, 1997). El residuo de uridina que va a modificarse siempre se localiza de 14 a 16 nts corriente arriba de las cajas H o ACA (Tollervey & Kiss, 1997). En levaduras y mamíferos, las dos horquillas son necesarias para la modificación del ARNr, aun cuando el snoRNA sólo guíe una modificación (Bortolin *et al.*, 1999). Asociadas a estos ARN se han encontrado cuatro proteínas: Gar1P, Cbf5p/diskarina, Nhp2p y Nop10p (Das *et al.*, 1996).

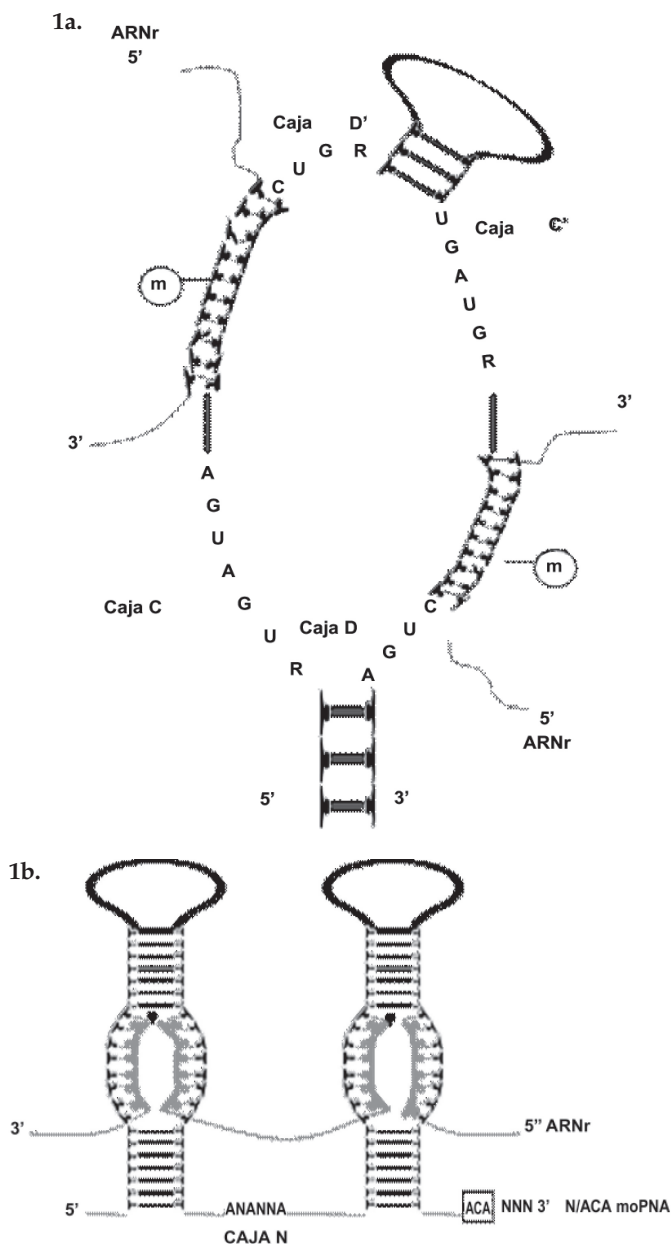


Figura 1. Representación de la estructura secundaria de los snoRNA.

(a) C/D snoRNA, su interacción con el ARNr y la regla +5 de metilación del ARNr. Las secuencias conservadas del snoRNA, cajas C, C', D y D', se indican en la figura, al igual que la distancia entre las cajas D/D' y el sitio de metilación (m) en el ARNr blanco. (b) H/ACA snoRNA y su interacción con el ARNr. La uridina del ARNr que va a modificarse se representa por el símbolo Ø. Se denotan las cajas H y ACA en el H/ACA snoRNA (Díez H. Laboratorio de Parasitología Molecular, PUJ).

Sorprendentemente, la mayoría de los H/ACA snoRNA descritos hasta el momento en tripanosomátidos forman una sola horquilla y en lugar de la tripleta ACA en su extremo 3', contienen la secuencia AGA (Barth *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2001; 2002; 2004). Esta misma estructura ha sido descrita en los snoRNA de *Archea* (Tang *et al.*, 2002) y *Euglena* (Russell *et al.*, 2004).

Debido a que las secuencias conservadas en los H/ACA snoRNA son tan cortas, la búsqueda de estos snoRNA por métodos bioinformáticos no es tan sencilla como el caso de los C/D snoRNA. Por lo anterior, se estima que la identificación de estas moléculas en los diferentes genomas representa tan solo una porción de las existentes. Es así como, por ejemplo, en *T. brucei* se han identificado tan sólo 34 de los 100 H/ACA snoRNA esperados (Barth *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005).

La función de las pseudouridinas en el ARNr parece correlacionarse también con su estructura terciaria, de manera que esta modificación tiene un efecto de apilamiento sobre las bases, aumentando la rigidez de la molécula, manteniendo así su estructura tridimensional (Uliel *et al.*, 2004). Estudios recientes indican cómo el silenciamiento en *T. brucei* de la enzima pseudouridina sintasa o CBF5, enzima encargada de la conversión de uridinas a pseudouridinas que a su vez hace parte de las proteínas asociadas a los H/ACA snoRNA, no sólo desestabiliza todos los snoRNA de la familia H/ACA, sino que genera defectos en el procesamiento del ARNr que impiden su correcta maduración, constituyendo así un gen esencial para la viabilidad del parásito (Barth *et al.*, 2005). En levaduras se ha observado que la depleción del gen Cbf5 afecta la traducción de las proteínas (King *et al.*, 2003). Adicionalmente, en tripanosomátidos la falta de la actividad de la enzima CBF5 afecta el "trans-splicing", evento mediante el cual los ARN mensajeros (ARNm) de los tripanosomátidos adquieren una secuencia líder denominada mini-exón como parte del procesamiento de las unidades policistrónicas a monocistrones en la maduración de todas las moléculas de ARNm (Agabian, 1990).

En concreto, se ha visto que, aparte de inhibir o disminuir la isomerización de las uridinas de los ARN nucleares pequeños (snRNA, por su sigla en inglés) que intervienen en el "trans-splicing", SLA1, un H/ACA snoRNA único de tripanosomátidos está involucrado en la modificación de las uridinas del ARN del gen mini-exón (SL-RNA, por su sigla en inglés) o molécula de ARN intermediaria en el proceso de "trans-splicing" y además posee actividad chaperona de acompañamiento del SL-RNA durante las fases tempranas de su biogénesis (Barth *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2001; 2002).

Recientemente, en *T. brucei* se han identificado los primeros snoRNA que intervienen en el procesamiento del ARNr en tripanosomátidos. Se

trata del ortólogo del snR30 en levaduras y U17 en mamíferos (Barth *et al.*, 2005) y del “mitochondrial RNA-processing RNA” (MRP-RNA, por su sigla en inglés) (Barth *et al.*, 2008). El primero es un H/ACA snoRNA de 270 nts, que a diferencia de los otros H/ACA snoRNA de tripanosomátidos posee –a semejanza de sus ortólogos en vertebrados y levaduras– dos horquillas y el motivo ACA en su extremo 3' (Barth *et al.*, 2005). El segundo es un ARN de 521 nts que al igual que el ortólogo de snR30, se encuentra codificado en las agrupaciones que codifican para los snoRNA (Barth *et al.*, 2008).

Agrupación génica C1 de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*

Siendo *Trypanosoma rangeli*, un protozoo parásito de especial importancia por su relación con *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, se ha venido trabajando con una agrupación génica codificante para varios C/D y H/ACA snoRNA, en estas especies, denominada C1. Esta agrupación se encuentra en el genoma de estos parásitos como una unidad de repetición de 800 pb, organizada en tándem y localizada en un cromosoma de 1 Mb en *T. rangeli* y de 1, 8 Mb en *T. cruzi* (Morales *et al.*, 2002). Organización similar a la presentada por la mayoría de los snoRNA de plantas y tripanosomátidos, en los cuales diferentes snoRNA forman una agrupación que se transcribe de forma policistrónica dependiente de la ARN polimerasa II (Dunbar *et al.*, 2000a; Uliel *et al.*, 2004). De forma contraria, en vertebrados y humanos la mayoría de los snoRNA que guían las modificaciones se localiza en intrones de genes que codifican para proteínas involucradas en la biogénesis de los ribosomas, y muy pocos se transcriben de forma independiente (Kiss, 2001; 2002).

El análisis *in silico* de la agrupación génica mostró la existencia de un total de seis snoRNA, tres de ellos codificantes para cada una de las familias C/D (C11, C12 y C14) y H/ACA (C13, C15 y C16), los cuales se alternan con distancias intergénicas de 11 a 72 nts, las cuales según Liang y colaboradores (2005) son suficientes para el correcto procesamiento de los snoRNA (ver Figura 2).



Figura 2. Representación esquemática de la agrupación génica C1 de *T. rangeli*. Las cajas representan la región codificante para cada uno de los snoRNA. Los números representan la posición de los nucleótidos en la agrupación (Puerta, 2005).

Llamativamente, genes ortólogos codificantes para estos snoRNA han sido encontrados en el cromosoma 11 de *T. brucei*, en donde se hallan conformando una agrupación de 32 snoRNA que se repite 3, 5 veces y se encuentra limitada en el extremo 5' por dos proteínas ESAG (proteínas de genes asociados a los sitios de expresión) hipotéticas y en el 3' por una isoaleril CoA deshidrogenasa hipotética. La expresión de estos snoRNA, así como también la detección de las modificaciones realizadas por los mismos, han sido evidenciadas en *T. brucei* (Tabla 1) (Barth *et al.*, 2008).

Análisis basados en las secuencias reportadas en los diferentes proyectos genomas de *T. cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*, demuestran la presencia de estos snoRNA en estos parásitos. Sin embargo, es de resaltar, que los snoRNA ortólogos de CI3 y CI5 no se encuentran anotados a la fecha en el genoma de *T. cruzi*. En *L. collosoma* también se han identificado los genes ortólogos para estos snoRNA (Liang *et al.*, 2005). En tripanosomátidos, los snoRNA comparten las secuencias conservadas, presentando elevados niveles de identidad entre sí, por lo cual es de esperarse que las modificaciones realizadas por los snoRNA de *T. brucei* también sean llevadas a cabo por sus ortólogos en los otros tripanosomátidos. Cabe resaltar que algunos de estos snoRNA tienen el potencial de guiar dos modificaciones ya sea en lugares próximos en la misma molécula de ARNr como CI1 y CI2, o distantes, como CI5.

Al menos una de las modificaciones del ARNr realizadas por cada uno de los C/D snoRNA estudiados se encuentra también en plantas, las realizadas por TB11Cs4C1 y TB11Cs4C2 son ubicuas también en levaduras y humanos y la metilación llevada a cabo por TB11Cs4C2 en la adenina 1091, también ha sido descrita en el ARNr del protozoo *Giardia lamblia* (Yang *et al.*, 2005); sugiriendo que estas modificaciones son conservadas en el dominio *Eukarya*.

Por su parte, la isomerización de la uridina realizada por los H/ACA snoRNA TB11Cs4H1, TB11Cs4H2 y TB11Cs4H3, al parecer es única de tripanosomátidos. Sin embargo, es posible que dada la dificultad en identificar estos snoRNA, no todos los snoRNA de levaduras, plantas y humanos hayan sido identificados.

Llama la atención que si bien existe una elevada conservación tanto en la estructura primaria como secundaria de los snoRNA en tripanosomátidos, el orden de éstos dentro de la agrupación génica difiere entre géneros así como también la longitud de los espacios intergénicos entre ellos y los genes que limitan dicha agrupación. Es así como mientras en las diferentes especies de tripanosomas estos snoRNA mantienen el mismo orden de CI1 a CI6, en *Leishmania* los snoRNA CI1, CI3 y CI6 de una parte, y los snoRNA

Tabla 1. Comparación de los snoRNA de la agrupación CI en tripanosomátidos.

<i>T. rangeli</i> snoRNA	Ortólogos en tripanosomátidos			
	Nombre	Especie	Longitud (pb)	Identidad (%)
CI2	TC11C4C2	<i>T. cruzi</i>	87	88,8
88	TB11C4C2	<i>T. brucei</i>	97	85,4
	Lm27C1C2	<i>L. major</i>	84	72,3
	L. inf_CI2	<i>L. infantum</i>	84	72,3
	L. bra_CI2	<i>L. braziliensis</i>	84	68,3
	TS1	<i>L. collosoma</i>	84	78,8
CI3	TrH14-CI3	<i>T. rangeli H14</i>	75	100
75	TC11C4H1	<i>T. cruzi</i>	73	84,9
	TB11C4H1	<i>T. brucei</i>	73	72,9
	Lm27C1H1	<i>L. major</i>	66	77,3
	L. inf_CI3	<i>L. infantum</i>	66	77,3
	L. bra_CI3	<i>L. braziliensis</i>	70	79,2
CI4	TrC23-CI4	<i>T. rangeli H14</i>	99	99
99	TC11C4C3	<i>T. cruzi</i>	90	83,8
	TB11Cs4C3	<i>T. brucei</i>	101	61,6
	Lm27C1C3	<i>L. major</i>	87	71,3
	L. inf_CI4	<i>L. infantum</i>	85	71,3
	L. bra_CI4	<i>L. braziliensis</i>	91	72,2
	TS2	<i>L. collosoma</i>	90	72,3
CI5	TrH14-CI5	<i>T. rangeli H14</i>	71	98,6
71	TC11Cs4H2	<i>T. cruzi</i>	69	81,2
	TB11Cs4H2	<i>T. brucei</i>	66	76,2
	Lm27C1H3	<i>L. major</i>	69	74,2
	L. inf_CI5	<i>L. infantum</i>	69	71,2
	L. bra_CI5	<i>L. braziliensis</i>	69	74,6
CI6	TrH14-CI6	<i>T. rangeli H14</i>	77	100
77	Tc11C4H3	<i>T. cruzi</i>	72	85,7
	Tb11Cs4H3	<i>T. brucei</i>	78	74,3
	Lm27C1H2	<i>L. major</i>	66	64,8
	L. inf_CI6	<i>L. infantum</i>	66	58,4
	L. bra_CI6	<i>L. braziliensis</i>	66	66,7
	H6	<i>L. collosoma</i>	70	62,5
CI1	Tr H14-CI1	<i>T. rangeli H14</i>	86	96,5
86	Tc11C4C1	<i>T. cruzi</i>	97	81
	Tb11C4C1	<i>T. brucei</i>	90	74,4
	Lm27C1C1	<i>L. major</i>	88	70,6
	L.inf_CI1	<i>L. infantum</i>	87	71,6
	L. bra_CI1	<i>L. braziliensis</i>	86	74,6
	G2	<i>L. collosoma</i>	84	78,8

Adaptado de Puerta (2005)

Cl1, Cl2, Cl4 y Cl5 de otra, forman subgrupos que se repiten varias veces en el cromosoma 27 del parásito. En *L. collosoma*, por su parte, los snoRNAs identificados, Cl1, Cl4 y Cl6, se agrupan con otros snoRNA diferentes (Liang *et al.*, 2004).

Por otra parte, el hecho de que las secuencias de los snoRNA en *T. rangeli* presentan una mayor identidad con sus ortólogos en *T. cruzi* que en *T. brucei*, hecho que coincide con los resultados obtenidos con los genes codificantes para las proteínas KMP-11 (Díez *et al.*, 2005), histona H2A (Puerta *et al.*, 2000) y HSP70 (Cuervo *et al.*, 2004), sustentan una mayor cercanía evolutiva de *T. rangeli* con *T. cruzi* y no con *T. brucei*, a pesar de que tanto *T. rangeli* como *T. brucei* se transmiten a través de la saliva del insecto vector (sección Salivaria), a diferencia de *T. cruzi*, que se transmite a través de las heces (sección Stercoraria). Estos resultados ilustran la utilidad de *T. rangeli* como modelo de estudio de *T. cruzi*.

Dados los hallazgos recientes de la división de *T. rangeli* en al menos dos grupos epidemiológicamente importantes, las cepas KP1(-) asociadas con la línea evolutiva Pallescens del insecto vector, y las cepas KP1(+) transmitidas por la saliva de los triatomíneos de la línea evolutiva Prolixus (Urrea *et al.*, 2005), se realizó la comparación de la agrupación Cl en cepas KP1(+) y KP1(-) del parásito. Es así como la agrupación Cl en las cepas Tre KP1 (-) y H14 KP1(+) presentan una identidad del 96, 5%, al menos en los 623 nts estudiados (Gómez *et al.*, 2007). Esta elevada conservación puede obedecer a que tanto las regiones codificantes como las espaciadoras intergénicas están sometidas a presión evolutiva para conservar tanto su secuencia como su longitud, de forma que ocurra el correcto procesamiento de cada uno de los snoRNA (Gómez *et al.*, 2007).

Perspectivas

La dilucidación y caracterización de genes de *T. rangeli* en conjunto con los avances del proyecto transcriptoma de este parásito (Snoeijer *et al.*, 2004), los proyectos genomas de otros tripanosomátidos (El-Sayed *et al.*, 2005a), la genómica comparativa (El-Sayed *et al.*, 2005b), y el desarrollo de técnicas como el ARN de interferencia (Liang *et al.*, 2003), permitirán no sólo conocer y ahondar en el papel individual de cada uno de los ARN nucleolares pequeños, sino en la importancia y el papel biológico desarrollado por las modificaciones del ARNr. De forma que dada la elevada conservación de estas moléculas de ARN tanto en su organización como en su secuencia y estructura a nivel de tripanosomátidos, la presencia de snoRNA específicos de tripanosomátidos, y la participación de los mismos en procesos característicos de estos parásitos como el “trans-

Tabla 2. Modificaciones del ARNr realizadas por los snoRNA de la agrupación CI de *Trypanosoma brucei* y su comparación con otros organismos.

ARNr	<i>T. brucei</i>		Levaduras		Plantas		Humanos	
	snoRNA	Sitio	snoRNA	Sitio	snoRNA	Sitio	snoRNA	Sitio
LSU	TB11Cs4C1	Am1326			AtsnoR18	Am2924		
		Am1338	SnR71	Am2943	AtU29	Am2936	U29	Am4493
		Um1080						
	TB11Cs4C2	Am1091	SnR39/59	Am805	AtU51	Am814	U51/U32a	Am1511
		Um611			AtsnoR53	Um2400		
	TB11Cs4H1	Ψ1357						
SSU	TB11Cs4H2	Ψ566						
		Ψ61						
		Ψ 1907						

Adaptado de Liang y colaboradores (2005).

LSU: Subunidad grande ARNr

SSU: Subunidad pequeña ARNr

splicing”, pueden constituir blancos para el diseño de nuevos fármacos contra estos parásitos de importancia en salud humana, animal y fitopatología. Desde ya, llaman la atención las patentes que se han generado basadas en las características de los snoRNA de localización específica celular, participación en la funcionalidad del ribosoma y expresión anormal en enfermedades como el cáncer, las cuales tienen diversas aplicaciones a nivel biotecnológico (Puerta, 2008).

Referencias

- Agabian N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.
- Aittaleb M, Rashid R, Chen Q, Palmer JR, Daniels CJ, Li H. 2003. Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nature Structural Biology* 10: 256-263.
- Bachellerie JP, Cavaille J. 1997. Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends in Biochemical Science* 22: 257-261.
- Bachellerie JP, Michot B, Nicoloso M, Balakin A, Ni J, Fournier MJ. 1995. Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *Trends in Biochemical Science* 20: 261-264.
- Balakin AG, Smith L, Fournier MJ. 1996. The RNA world of the nucleolus: two major families of small nucleolar RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 86: 823-834.
- Barth S, Hury A, Liang XH, Michaeli S. 2005. Elucidating the role of H/ACA-like RNAs in trans-splicing and rRNA processing via RNA

- interference silencing of the *Trypanosoma brucei* CBF5 pseudouridine synthase. *Journal of Biological Chemistry* 280: 34558-34568.
- Barth S, Shalem B, Hury A, Tkacz ID, Liang XH, Uliel S, Myslyuk I, Doniger T, Salmon-Divon M, Unger R, Michaeli S. 2008. Elucidating the role of C/D snoRNA in rRNA processing and modification in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* 7: 86-101.
- Bortolin ML, Ganot P, Kiss T. 1999. Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. *The EMBO Journal* 18: 457-469.
- Cuervo CL, Mayorga DC, Pavía P, López MC, Puerta C. 2004. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio* 8: 268-278.
- Das A, Peterson GC, Kanner SB, Frevert U, Parsons M. 1996. A major tyrosine-phosphorylated protein of *Trypanosoma brucei* is a nucleolar RNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15675-15681.
- Decatur WA, Fournier MJ. 2003. RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *Journal of Biological Chemistry* 278: 695-698.
- Díez H, Thomas MC, Urueña CP, Santander SP, Cuervo CL, López MC, Puerta CJ. 2005. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 130: 643-651.
- Dunbar DA, Chen AA, Wormsley S, Baserga SJ. 2000a. The genes for small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* are organized in clusters and are transcribed as a polycistronic RNA. *Nucleic Acids Research* 28: 2855-2861.
- Dunbar D, Wormsley S, Lowe TM, Baserga SJ. 2000b. Fibrillarin-associated box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2'-O-ribose methylation of rRNA. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14767-14776.
- Eichler DC, Craig N. 1994. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 49: 197-239.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, et al. 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.
- Filipowicz W, Pelczar P, Pogacic V, Dragon F. 1999. Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. *Acta Biochimica Polonica* 46: 377-389.

- Filipowicz W, Pogacic V. 2002. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 319-327.
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T. 1997. Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89: 799-809.
- Gómez MC, Nocua PA, Cuervo, CL, Puerta CJ. 2007. Amplificación y clonación de una agrupación génica codificante para ARN nucleolares pequeños en una cepa KP1(+) de *Trypanosoma rangeli*. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Hasan G, Turner MJ, Cordingley JS. 1984. Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. *Gene* 27: 75-86.
- King TH, Liu B, McCully RR, Fournier MJ. 2003. Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center. *Molecular and Cellular Biology* 11: 425-435.
- Kiss T. 2001. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal* 20: 3617-3622.
- Kiss T. 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109: 145-148.
- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. 1996. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077-1088.
- Lafontaine DL, Tollervey D. 1998. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends in Biochemical Science* 23: 383-388.
- Levitan A, Xu Y, Ben-Dov C, Ben-Shlomo H, Zhang Y, Michaeli S. 1998. Characterization of a novel trypanosomatid small nucleolar RNA. *Nucleic Acids Research* 26: 1775-1783.
- Liang XH, Liu L, Michaeli S. 2001. Identification of the first trypanosome H/ACA RNA that guides pseudouridine formation on rRNA. *Journal of Biological Chemistry* 276: 40313-40318.
- Liang XH, Liu Q, Michaeli S. 2003. Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proceedings of the National Academic of Science, USA* 100: 7521-7526.
- Liang XH, Ochaion A, Xu YX, Liu Q, Michaeli S. 2004. Small nucleolar RNA clusters in trypanosomatid *Leptomonas collosoma*. Genome organization, expression studies, and the potential role of sequences present upstream from the first repeated cluster. *Journal of Biological Chemistry* 279: 5100-5109.

- Liang XH, Uliel S, Hury A, Barth S, Doniger T, Unger R, Michaeli S. 2005. A genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei* reveals a trypanosome-specific pattern of rRNA modification. *RNA* 11: 619-645.
- Liang XH, Xu YX, Michaeli S. 2002. The spliced leader-associated RNA is a trypanosome-specific sn(o) RNA that has the potential to guide pseudouridine formation on the SL RNA. *RNA* 8: 237-246.
- Maxwell ES, Fournier MJ. 1995. The small nucleolar RNAs. *Annual Review of Biochemistry* 64: 897-934.
- Morales L, Romero I, Diez H, Del Portillo P, Montilla M, Nicholls S, Puerta C. 2002. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Experimental Parasitology* 102: 72-80.
- Omer AD, Lowe TM, Russell AG, Ebhardt H, Eddy SR, Dennis PP. 2000. Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science* 288: 517-522.
- Puerta CJ. 2008. Implications of small nucleolar RNA-protein complexes discoveries. *Recent patents on DNA & Gene Sequences* 2: 1-5.
- Puerta CJ. 2005. Identificación de una agrupación génica que codifica para ARN pequeños de nucleolo en *Trypanosoma rangeli*. *Infectio* 9: 171-179.
- Puerta C, Cuervo P, Thomas MC, Lopez MC. 2000. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology Research* 86: 916-922.
- Roberts TG, Sturm NR, Yee BK, Yu MC, Hartshorne T, Agabian N, Campbell DA. 1998. Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. *Molecular and Cellular Biology* 18: 4409-4417.
- Russell AG, Schnare MN, Gray MW. 2004. Pseudouridine-guide RNAs and other Cbf5p-associated RNAs in *Euglena gracilis*. *RNA* 10: 1034-1046.
- Samarsky DA, Fournier MJ, Singer RH, Bertrand E. 1998. The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization. *The EMBO Journal* 17: 3747-3757.
- Snoeijer CQ, Picchi GF, Dambros BP, Steindel M, Goldenberg S, Fragoso SP, Lorenzini DM, Grisard EC. 2004. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. *Kinetoplastid Biology Disease* 3: 1.
- Tang TH, Bachellerie JP, Rozhdestvensky T, Bortolin ML, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Huttenhofer A. 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon

- Archaeoglobus fulgidus. Proceedings of the National Academic of Science, USA 99: 7536-7541.
- Tollervey D, Kiss, T. 1997. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. Current Opinion in Cellular Biology 9: 337-342.
- Uziel S, Liang X, Unger R, Michaeli S. 2004. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organization, and unique functions. International Journal for Parasitology 34: 445-454.
- Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Goncalves R, Guhl F, Schofield CJ, Triana GA, Vallejo GA. 2005. Molecular characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. Infection Genetics and Evolution 5: 123-129.
- Venema J, Tollervey D. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Annual Review of Genetics 33: 261-311.
- Weinstein LB, Steitz JA. 1999. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. Current Opinion in Cell Biology 11: 378-384.
- Xu Y, Liu L, Lopez-Estraño C, Michaeli S. 2001. Expression studies on clustered trypanosomatid box C/D small nucleolar RNAs. Journal of Biological Chemistry 276: 14289-14298.
- Yang CY, Zhou H, Luo J, Qu LH. 2005. Identification of 20 snoRNA-like RNAs from the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Biochemical and biophysical research communications 328: 1224-1231.

COMENTARIO AL TRABAJO DE LA PROFESORA PUERTA

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que mil millones de personas padecen de una o más de las 14 enfermedades tropicales desatendidas o huérfanas (ETD, por sus sigla en inglés); enfermedades llamadas así por su ocurrencia exclusiva en las poblaciones más pobres y marginadas del planeta que afectan especialmente a la población infantil y que han sido erradicadas de los países desarrollados. Las 14 ETD, úlcera de Buruli, enfermedad de Chagas, cólera/enfermedad diarreica epidémica, dengue, dracunculosis (gusano de Guinea), tripanosomiasis humana africana (enfermedad del sueño), leishmaniasis, lepra, filarisis linfática, oncocercosis, esquistosomiasis, helmintiasis transmitidas por el suelo (ascariasis, aquilostomiasis y tricocéfaliasis) y tracoma, afectan profundamente la economía de los países implicados por cuanto no solo se reduce la mano de obra laboral y se generan elevados costos para los sistemas de salud gubernamentales, sino que muchas regiones productivas se ven abandonadas. En Colombia, unas de las ETD de mayor impacto son la enfermedad de Chagas, con un 7% de la población afectada y un 23% en riesgo y las leishmaniasis, con 18.097 casos reportados en el territorio nacional en el año 2005, correspondiendo el 99, 4% a leishmaniasis cutánea, el 0, 3% a leishmaniasis mucocutánea y el 0, 3% restante a la forma visceral, representando en conjunto un incremento de casos del 21, 9% con respecto al número de casos reportados el año anterior.

El Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, conocedor de esta problemática de salud e interesado en colaborar con el desarrollo del país, desde hace doce años viene trabajando en torno a la enfermedad de Chagas y más recientemente, de las leishmaniasis, enmarcando sus trabajos en las líneas de investigación “Biología molecular básica y aplicada de tripanosomátidos y sus vectores” y “Respuesta inmune a la infección por Trypanosoma cruzi”.

En el anterior contexto, el estudio de los ARN nucleolares pequeños, entre ellos los contenidos en la agrupación Cl, y su comparación en tripanosomátidos, permite no sólo avanzar en el conocimiento básico de la biología molecular de estos parásitos, sino que es útil para la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento, teniendo en cuenta la elevada conservación de estas moléculas de ARN tanto en su organización como en su secuencia y estructura a nivel de tripanosomátidos, la presencia de snoRNA específicos de tripanosomátidos ausentes del genoma de eucariotes superiores y la participación de los mismos en procesamiento característicos de vital importancia para estos parásitos como el “trans-splicing”.

Retrotransposones: ¿parásitos de genomas o motores de evolución?

Manuel Carlos López¹, M. Carmen Thomas¹

Resumen

Los elementos LINE (long interspersed nucleotide elements) y SINE short interspersed nucleotide elements) representan la clase más abundante de secuencias móviles de DNA, de tipo retrotransposon no-LTR, que están presentes en el genoma de la mayoría de eucariotas. Estos elementos genéticos móviles y ubicuos, se movilizan por vía de transcripción reversa de su RNA intermediario de forma autónoma o usando en *trans* la maquinaria enzimática aportada por los elementos LINE.

L1Tc es el elemento móvil no-LTR más abundante del genoma de *T. cruzi* y el único que codifica todas las proteínas que componen la maquinaria enzimática necesaria para su retrotransposición. Se ha descrito que, al menos, existen 15 copias activas de L1Tc en el genoma de *Trypanosoma cruzi*. A pesar de que la transcripción génica en tripanosomátidos es policistrónica y los mensajeros son procesados en 5' mediante la adición de una secuencia común denominada *spliced leader* (SL), el carácter autónomo de los elementos LINE requiere la existencia de un promotor interno localizado en el extremo 5' de los mismos. Recientemente, hemos demostrado que los primeros 77 nucleótidos presentes en L1Tc (Pr77) activan la transcripción dependiente de RNA polimerasa II, de genes heterólogos situados corriente abajo de Pr77, y generan RNA mensajeros traducibles que no poseen SL.

Frecuentemente las secuencias LINE y SINE se han correlacionado con la generación de inserciones en el genoma, que son responsables de

¹ Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", CSIC. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain. Tel: +34 958 181 662. Fax: +34 958 181 632. Correo electrónico: mclopez@ipb.csic.es and mcthomas@ipb.csic.es

la aparición de enfermedades en humanos. En todo caso, se consideran elementos evolutiva y funcionalmente relevantes. En *T. cruzi* estos elementos juegan un importante papel biológico al estar implicados en la plasticidad observada en su genoma, así como en fenómenos de reordenamiento génico. Estos elementos participan en el control de la expresión de genes que, se postula, repercuten en la patogenicidad y supervivencia del parásito.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, organización genómica, elementos móviles, evolución, promotor.

Abstract

Long Interspersed Nucleotide Elements (LINE) and Short Interspersed Nucleotide Elements (SINE) are the most abundant mobile DNA sequences of non-LTR retrotransposon type. These elements are present in a large number of eukaryotic organisms. These ubiquitous mobile genetic elements transpose through an RNA intermediate either in an autonomous fashion or using, in *trans*, the enzymatic machinery of LINE.

L1Tc constitutes the most abundant non-LTR mobile element of the *Trypanosoma cruzi* genome and is the only element that codes for all the proteins that compose the enzymatic machinery for the element autonomous retrotransposicion. 15 potentially active L1Tc copies have been identified in the *T. cruzi* genome. In spite of gene transcription in trypanosomatids is polycistronic and mature messengers are formed by the addition at the 5' ends of the spliced leader sequence, the autonomous character of LINEs requires the existence of an internal promoter located at the element 5' end. It has been recently described that the first 77 nucleotides of L1Tc (Pr77) are able to activate transcription of heterologous genes by RNA polymerase II and to produce unspliced and translated transcripts.

The LINE and SINE elements have been usually correlated with the generation of genomic insertions responsible for the production of human diseases. They are, however, elements of evolutionary and functional importance. It has been postulated that these elements play an important biological role in *T. cruzi* since they are responsible for the degree of genome plasticity that this genome has. These elements are involved in DNA and gene rearrangements and in the control of the expression of specific crucial genes implicated in the parasite' pathogenicity and survival.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, genomic organization, mobile elements, evolution, promoter.

Retrotransposones sin LTR (elementos LINE y SINE) en la organización genómica de *Trypanosoma cruzi*

La primera evidencia de la existencia de secuencias móviles de DNA fue hecha por Bárbara McClintock en los años cincuenta, quien las denominó elementos controladores (McClintock, 1956). Desde entonces, han sido descritos numerosos elementos de DNA móvil en una gran variedad de organismos, incluyendo protozoos parásitos, anfibios, moluscos, reptiles, insectos, plantas, mamíferos, etc. y, a pesar de que en muchos casos sus implicaciones funcionales no son bien conocidas, se postula que deben tener un papel universal y biológicamente crítico.

La clase más abundante de estas secuencias génicas de tipo retrotransposon sin-LTR la representan los elementos LINE "*long interspersed nucleotide elements*" y SINE "*short interspersed nucleotide elements*" (ver esquema en Figura 1). Estos elementos están presentes en los genomas de la mayoría de eucariotas y se insertan en nuevas localizaciones genómicas vía reverso transcripción de su RNA intermediario por lo que se denominan retrotransposones. Se postula que los elementos LINE son potentes modeladores de los genomas que los contienen, participando activamente en la reorganización del genoma y cromosomas de su hospedador a través de diferentes mecanismos (revisado en Babushok & Kazazian, 2007). Los elementos LINE con un tamaño aproximado de 5 kb están repetidos entre 10^3 y 10^4 veces por genoma y contienen repeticiones directas flanqueantes de 5 a 12 nucleótidos. Son elementos activamente transcritos

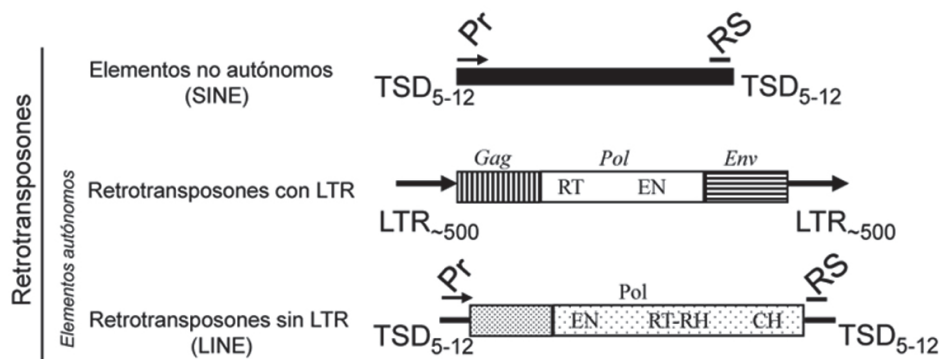


Figura 1. Esquema de los elementos autónomos y no autónomos de tipo retrotransposón LTR y no-LTR. Los marcos abiertos de lectura están representados por rectángulos, las regiones no traducidas por líneas horizontales, el lugar de inicio de la transcripción (P_r) así como la dirección de la misma se representa con flecha corta. Las abreviaturas indican: RS, sitio de reconocimiento de la RT; LTR, terminaciones largas repetidas representadas con flecha larga; RT, transcriptasa inversa; RH, RNasa H; EN, endonucleasa; CH, motivo cisteína-histidina; TSD, secuencias de duplicación directa.

y presentados como RNA maduros poliadenilados. Estos elementos han venido replicándose e integrándose en distintos puntos del genoma hospedador desde hace 100 millones de años y constituyen un alto porcentaje del genoma de mamíferos. Así, el 40% del genoma humano está constituido por secuencias repetidas de DNA móvil, de las cuales el mayor porcentaje es de retrotransposones de tipo LINE y SINE. En algunos tripanosomátidos estas secuencias de DNA repetido constituyen un elevado porcentaje de su genoma (revisado en Brangaud *et al.*, 2008). Debido a que estos parásitos se encuentran sometidos durante su ciclo de vida a drásticos cambios medio-ambientales, se postula que la flexibilidad genómica proporcionada por estas secuencias supone una ventaja evolutiva.

Entre la familia *Trypanosomatidae*, perteneciente al orden *Kinetoplastida*, destacan una serie de parásitos que son los causantes de diversas patologías graves en humanos como la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, Leishmaniasis, causada por diferentes especies de *Leishmania* y, la enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*. Tras la secuenciación del genoma completo de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*, así como de otras especies de *Leishmania*, ha sido posible realizar el análisis de la organización génica y grado de conservación existente en el orden de los genes, así como determinar para una amplia variedad de genes la similitud, a nivel de secuencia, existente entre estos parásitos. Análisis comparativos han revelado que los genomas de estos tres parásitos, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, comparten 6158 *clusters* ortólogos de genes codificantes de proteínas y muchos dominios de proteínas funcionales. Además, estos genes forman grandes bloques sinténicos que contienen el 80% de los genes de *T. brucei* y el 93% en el caso de *Leishmania*. Esto supone un alto grado de conservación en estos organismos, considerando el tiempo en que los mismos divergieron, así como las acusadas diferencias que muestran en cuanto a su ciclo de vida, características infectivas en el hospedador vertebrado y de evasión del sistema inmune (Ghedini *et al.*, 2004; Kissinger, 2006). El número de genes específicos de especie está claramente aumentado en el caso de *T. cruzi* (3736) respecto a *T. brucei* (1392) y *L. major* (910). Gran cantidad de genes en cada uno de estos parásitos están codificados en una sola cadena de DNA que está precedida por una región de 1-13 kilobases (kb) que se conoce como *strand switch region* (STS). En el otro extremo de la región STS se inicia la disposición de una segunda agrupación de genes codificados en la cadena de DNA contraria. Por tanto, las organizaciones génicas policistrónicas se extienden bidireccionalmente desde la región STS. El hecho de que el grado de sintenia entre *T. cruzi* y *T. brucei* sea mayor entre sí que el de ellos con *L. major*, sugiere la existencia de fuerzas selectivas responsables del mantenimiento del orden génico.

Basándose en diversos estudios de evolución, se postula que estos tres parásitos divergieron, a partir de un ancestro común, hace 400-600 millones de años. Sin embargo, solo aquellos del género *Trypanosoma* se caracterizan por presentar un alto contenido de secuencias de DNA repetido en su genoma ya que el de *Leishmania* es relativamente pobre en este tipo de secuencias. Por tanto, se ha postulado que los elementos transponibles han sido retenidos en el género *Trypanosoma* y que se perdieron en la línea evolutiva de *L. major* (Bringaude *et al.*, 2006a). Así, los retrotransposones sin-LTR son abundantes en *T. brucei* y *T. cruzi* pero están ausentes en el genoma de *Leishmania* ya que en esta tan solo han sido identificados remanentes de elementos sin-LTR degenerados de tamaño largo o DIREs (*degeretaded ingi/L1Tc-related elements*) y de corta longitud o SIDERs (*short interspersed degenerated retrotransposon*) (Bringaude *et al.*, 2007).

En tripanosomátidos los genes codificantes de proteínas están organizados en tándem formando *clusters* en una misma dirección de transcripción y son transcritos policistricamente (revisado en Donelson *et al.*, 1999). Posteriormente y mediante un mecanismo de procesamiento denominado de *trans-splicing*, una secuencia denominada *spliced leader* (SL) es añadida en *trans* al extremo 5' de cada mRNA lo cual, conjuntamente a la adición de una cola de poliadeninas al extremo 3' del mensajero, genera transcritos monocistricos maduros. Así, el extremo 5' de los mensajeros de estos parásitos está determinado por el sitio de *splicing* y no por el sitio de inicio de la transcripción, estando la expresión génica regulada a nivel postranscripcional. Al contrario que los genes codificantes de proteínas, los mensajeros correspondientes al SL (SLRNAs) se transcriben monocistricamente desde un sitio de inicio de la transcripción concreto. Recientemente se ha identificado un factor de transcripción (TFIIB-like), el cual se une específicamente al promotor de los SLRNAs, interacciona con la RNA polimerasa II (RNA *polII*) y es totalmente requerido para la transcripción del SLRNA (Schimanski *et al.*, 2006).

El mantenimiento de los mensajeros policistricos podría existir para permitir que la replicación y la transcripción sea co-direccional. Análisis de transcripción del cromosoma 1 completo de *L. major* (LmjF chr19) muestran que el nivel de transcripción de la cadena codificante específica de la RNA *polII* que se iniciaba en la región STS localizada entre dos *clusters* de genes policistricos era, al menos, 10 veces mayor que cualquier transcripción no específica que pudiera haberse iniciado al azar a lo largo de cualquier posición del cromosoma (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Análisis similares, realizados con el cromosoma 3 de *L. major*, evidencian que la transcripción de la cadena codificante era ocho veces superior a la de la cadena no codificante y que la transcripción mediada por la RNA *polII* se inicia en la región STS. Además ensayos de *run-on* evidenciaron que la

transcripción mediada por la RNA *pol*III de los dos *clusters* policistrónicos terminaba en las *strand switch regions*, allí donde convergen los *clusters*, al lado de donde se inicia y termina la transcripción mediada por la RNA polimerasa III (RNA *pol*III) del gen tRNA. Ensayos de transfección transitoria y de protección con RNasa corroboran que la región del gen codificante del tRNA marca la terminación de la transcripción del policistrón (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Por tanto, y puesto que en tripanosomátidos la secuenciación de los genomas ha evidenciado que los genes están organizados en grandes *clusters*, el número de regiones donde se inicia la transcripción en estos organismos es pequeño comparado a lo que ocurre en otros eucariotas. Interesantemente, en las regiones en las que en estos tres parásitos existen diferencias, como interrupción del orden génico y reorganizaciones (STS) se encuentran presentes retrotransposones o secuencias parecidas a retroelementos o miembros de familias génicas que han mostrado contener secuencias denominadas “puntos calientes” (*hot spots*) para la inserción de retrotransposones LINE y SINE.

Dado que el genoma de *T. cruzi* contiene un alto porcentaje de secuencias de DNA repetido, retrotransposones LINE y SINE (revisado en Bringaud *et al.*, 2008), se ha postulado que estas secuencias son esenciales para la biología del parásito al proporcionarle gran plasticidad a su genoma y participar en la regulación de la expresión génica de relevantes familias de genes del parásito (Requena *et al.*, 1996; Donelson, 1996; El-Sayed *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de este alto porcentaje de secuencias de DNA repetido existentes en *T. cruzi* y de su papel en la variabilidad y posiblemente en la patogenicidad y virulencia del parásito, son escasos los aspectos funcionales que con precisión se conocen de ellas. Así, se ha descrito que el elemento no autónomo del genoma de *T. cruzi*, denominado SIRE, que se localiza principalmente en regiones intergénicas asociadas a fases abiertas de lectura (Vázquez *et al.*, 2000), está insertado en la región 5'UTR del gen ribosomal P2b donde destruye la original secuencia aceptora de *trans-splicing* y genera un nuevo sitio aceptor de *splicing*. Esta inserción determina la generación de un mensajero que presenta una nueva región de 38 nucleótidos, procedentes de SIRE, que da lugar a una disminución en la cantidad del correspondiente transcrito, pero incrementa la eficiencia de traducción del mismo (Ben-Dov *et al.*, 2005). Asimismo, la inserción de un fragmento de DNA del elemento E13 (Requena *et al.*, 1992) en algunas copias del gen *H2A* daba lugar, al introducir una nueva señal de poliadenilación, a mensajeros de mayor tamaño que están más eficientemente regulados (Marañón *et al.*, 1998; Marañón *et al.*, 2000). Así, el locus génico que contiene los genes codificantes para la proteína H2A de *T. cruzi* muestra tener una elevada plasticidad entre cepas del parásito, la cual afecta a su organización genómica y tasa de transcritos maduros (Thomas *et al.*, 2000). La secuencia

de DNA repetido E12 se ha identificado insertada en las regiones intergénicas de ciertos genes de la familia de las neuroaminidasas proporcionando nuevos sitios de poliadenilación (Requena *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 2000). Asimismo, varias copias de CZAR, retrotransposón sin-LTR específico de sitio de inserción (Villanueva *et al.*, 1991), y SLACS (Aksoy *et al.*, 1987) están interrumpiendo los genes del *mini-exon* de *T. cruzi* y *T. brucei*, respectivamente. Además, los elementos SIDER, recientemente descritos en *L. major*, han mostrado tener un papel funcional en cuanto a la regulación de la expresión génica, ya que intervienen en la estabilidad de los mensajeros que los portan en su región 3' no traducida (Bringaud *et al.*, 2007).

Los retrotransposones sin-LTR más abundantes en tripanosomátidos son los elementos L1Tc, dispersos en el genoma de *T. cruzi* (Martin *et al.*, 1995) y los elementos *ingi* y RIME, en el de *T. brucei* (Hasan *et al.*, 1984; Kimmel *et al.*, 1987). El elemento autónomo *ingi* de 4, 75 kb está flanqueado por unidades del elemento no autónomo RIME. El elemento L1Tc tiene un tamaño de aproximadamente 5 kb y se encuentra flanqueado por secuencias cortas de duplicación directa (TSD) (ver esquema en Figura 2). L1Tc es activamente transcrito en las tres formas del parásito y su mRNA está poliadenilado (Figuras 3A y 3B). Este elemento se localiza distribuido de forma dispersa, prácticamente en la totalidad de cromosomas del parásito (Figura 3C) y organizado, tanto de forma aislada como en copias repetidas en *tandem*, existiendo unas 1000 copias en el genoma de *T. cruzi* (Martin *et al.*, 1995; Olivares *et al.*, 2000). Por otra parte, diversos estudios han mostrado la existencia de una asociación entre los elementos dispersos descritos en *T. cruzi*. Así, el elemento SIRE presenta una homología del 95% con las primeras 122bp del elemento E13 (Vazquez *et al.*, 1994) y el elemento E12 se encuentra formando parte del extremo 3' no traducida de elementos L1Tc (Requena *et al.*, 1994). El elemento disperso VIPER, el cual codifica para una transcriptasa reversa con homología con los retrotransposones LTR y no con los retrotransposones sin-LTR, carece de las secuencias LTR y está flanqueado por fragmentos del



Figura 2. Esquema del elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi*. El elemento L1Tc contiene un único marco abierto de lectura (ORF) representado por un rectángulo sombreado. La línea horizontal que se encuentra en el extremo 5' del elemento representa región no traducida y la flecha indica el lugar de inicio de la transcripción. La abreviatura TSD indica secuencias de duplicación directa.

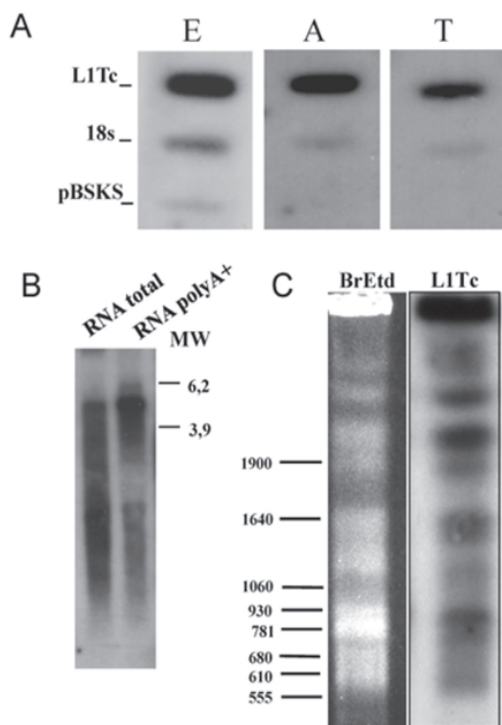


Figura 3. Transcripción y localización del elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi*. **A)** Transcripción del elemento L1Tc en las distintas formas del ciclo de vida de *T. cruzi*. Ensayos de *run-on* utilizando como sonda. L1Tc, plásmido pSPFM55 que contiene la secuencia completa del elemento L1Tc; 18s, plásmido pBSKS18s que contiene la secuencia del gen 18s (control positivo); PBSKS, plásmido vacío control negativo. E, epimastigote; A, amastigote; T, tripomastigote. **B)** Northern blot de RNA total RNA total y RNA poliadenilado (RNA PolyA+) de formas epimastigotes de *T. cruzi*, hibridado con la secuencia completa de L1Tc. MW, marcador de peso molecular expresado en kb. **C)** Localización cromosómica del elemento L1Tc en la cepa CL de *T. cruzi*. El primer carril (BrEtd) corresponde a los cromosomas de la cepa CL de *T. cruzi* sometidos a electroforesis en campo pulsante y teñidos con bromuro de etidio. Tras la transferencia de los cromosomas a soporte sólido se llevó a cabo la hibridación con un fragmento central de 1, 8 kb de L1Tc.

elemento SIRE (Vazquez *et al.*, 2000). Recientemente se ha descrito que TcTREZO, retrotransposón de 1, 6 kb, parece haber sido ensamblado por la inserción de distintas secuencias en el interior de un elemento progenitor (Souza *et al.*, 2007). Este elemento está localizado en específicas zonas no-sinténicas del genoma de *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2007).

Interesantemente, el elemento L1Tc se localiza frecuentemente asociado a secuencias de DNA repetidas de tipo retrotransposón no autónomas. Así, L1Tc está asociado al elemento SINE NARTc (Olivares *et al.*, 2000; Bringaud *et al.*, 2002). Ambos elementos se encuentran flanqueados por similares secuencias cortas de duplicación directa (TSD) y su región 5' es idéntica (Figura 4). NARTc está además asociado a pseudogenes derivados de L1Tc, a otros retroelementos no-autónomos y a genes de la familia RHS, los cuales contienen "sitios calientes" para la entrada de elementos móviles (El-Sayed *et al.*, 2005). NARTc se ha identificado localizado en zonas subteloméricas de la mayoría de los cromosomas del parásito. Igualmente, se ha observado la asociación de L1Tc con elementos móviles degenerados, tales como los denominados DIRE1 y DIRE2 (Bringaud *et al.*, 2006b). Por otra parte, L1Tc se ha descrito asociado a los genes ABC (Torres *et al.*, 1999),

así como en regiones subtelomérica y teloméricas de distintos cromosomas del parásito (Chiurillo *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2005), regiones enriquecidas en diversas secuencias repetidas, para las que se postula que pudiera haber sido los sitios para la generación de nuevas variantes de la glicoproteína *gp85*, molécula implicada en la invasión de *T. cruzi* en células de mamíferos (Kim *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia completa del genoma nuclear de *T. cruzi* ha confirmado que L1Tc está altamente representado, existiendo al menos 15 elementos teóricamente retrocompetentes y se postula juega un relevante papel en la movilidad génica (El-Sayed *et al.*, 2005).

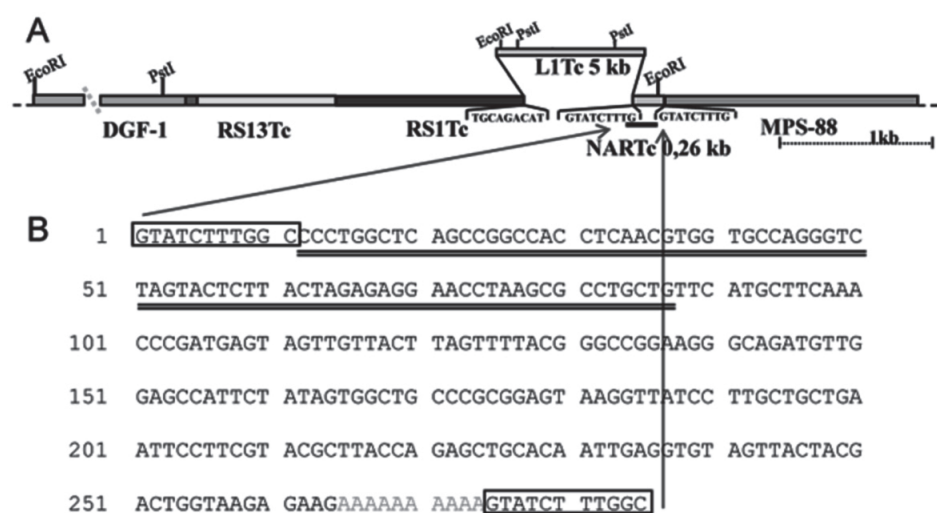


Figura 4. Esquema de la organización del elemento L1Tc y de su asociación al elemento NARTc y a otras secuencias repetidas en el genoma de *Trypanosoma cruzi*. **A)** En rectángulos de distinto color se representan las secuencias localizadas corriente arriba y abajo del elemento L1Tc, en el clon genómico pBAC52 de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (Olivares *et al.*, 2000). El nombre de cada secuencia o elemento móvil se indica en negrita, incluyendo a los elementos L1Tc y NARTc. Se señalan los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI*. DGF1 se corresponde con el gen codificante para la proteína de superficie DGF1, para la cual, según se ha descrito, existen en *T. cruzi* unas 220 copias por genoma haploide (Wincker *et al.*, 1992; RS13Tc y RS1Tc se corresponden con distintas secuencias de DNA repetido números de acceso, AF208538 y AR208540, respectivamente, caracterizadas por Olivares *et al.* (2000). MPS-88 se corresponde con un fragmento génico que muestra tener un 88% de homología de secuencia con el gen que codifica para una proteína perteneciente a la familia de las sialidasas (Takle *et al.*, 1992). Las secuencias de repetición directa nueve primeros nucleótidos que flanquean a L1Tc y NARTc están escritas bajo el signo }. **B)** Secuencia de nucleótidos correspondiente al retrotransposón no autónomo de *T. cruzi* NARTc. En cajas se indican las secuencias de repetición directa de 11 nucleótidos que lo flanquean en la presente localización. Subrayado con doble línea se indica la región del elemento NARTc que es idéntica al extremo 5' del elemento L1Tc. En rojo se indica la cola de poli-adeninas situada en el extremo 3' del elemento NARTc.

Retrotransposición de los elementos LINE y SINE. Maquinaria enzimática codificada por el elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi*

Los elementos transponibles se propagan por inserción en nuevos sitios del genoma que habitan. De esta forma pueden insertarse en genes o en elementos reguladores de genes, alterando de este modo su función, o pueden conducir a reordenamientos génicos (Nekrutenko & Wen-Hsiung Li, 2001). Aunque la mayoría de las nuevas inserciones son neutrales, y no suponen un daño para el hospedador, las evidencias más claras de la movilidad de los elementos LINE se relacionan con la identificación de nuevas inserciones que son responsables de la producción de enfermedades en humanos, especialmente involucrando procesos tumorales (Schwahn *et al.*, 1998; Ostertag & Kazazian 2001; Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, a estas secuencias LINE se les considera elementos evolutiva y funcionalmente relevantes por generar variabilidad en la estructura cromosomal, plasticidad genómica y estar implicados en los procesos de regulación de la expresión génica (Moran & Gilbert, 2002; Kazazian *et al.*, 2004; Biémont & Vieira, 2006).

Los elementos LINE, además de tener capacidad para generar una copia de sí mismos e insertarse en una nueva localización, son capaces de movilizar los elementos SINE y generar pseudogenes procesados empleando su maquinaria enzimática en *trans*; es decir, empleando como molde el RNA codificado por un elemento SINE o un mRNA celular (Kajikawa & Okada 2002; Dewannieux *et al.*, 2003; Dewannieux & Heidmann, 2005). La movilización de estos elementos puede dar lugar a la formación de nuevos transcritos, al aportar promotores y señales de poliadenilación (Roy-Engel *et al.*, 2005). Asimismo, promueven inversiones y deleciones de DNA cromosómico tanto como resultado directo de transposición intramolecular, como por aportar regiones de homología que puedan ser reconocidas por la maquinaria de recombinación de DNA del hospedador. Además, los elementos LINE suelen presentar señales débiles de poliadenilación, que son sobreeséidas por la maquinaria de poliadenilación, por lo que las secuencias que flanquean el extremo 3' del elemento pueden ser arrastradas en un evento de retrotransposición (Moran *et al.*, 1999). De este modo, los elementos LINE retrocompetentes proporcionan un vehículo para movilizar secuencias no relacionadas con el elemento a nuevas localizaciones genómicas. Este proceso, sin duda, representa un mecanismo relevante para la creación y modificación de genes. Por otra parte, diversos estudios han permitido poner en evidencia que los mRNA maduros que contienen elementos transponibles corresponden principalmente a transcritos involucrados en inmunidad (inmunoglobulinas, MHC o en algunos dominios de citocinas). En cambio, aquellos mensajeros implicados en funciones esenciales del metabolismo, desarrollo o genes estructurales tienen una menor prevalencia de elementos transponibles en sus mRNA (Anderson *et*

al., 1998; Nekrutenko & Wen-Hsiung Li, 2001). Resulta de especial interés el hecho de que el elemento L1 humano, además de retrotransponerse en células germinales y tumorales, tiene capacidad para retrotransponerse en células somáticas. Así, su inserción dentro de regiones reguladoras de ciertos genes neuronales en el ratón altera su expresión, dando lugar a poblaciones distintas de células neuronales (Muotri *et al.*, 2005). Babushok & Kazazian (2007) postulan que el diferente contenido del elemento L1 en el genoma humano y de su total potencial retrotransposición contribuye a la variación interindividual existente en la expresión génica y tasa mutagénica.

El mecanismo de retrotransposición de los elementos LINE, denominado TPRT (*Target primed reverse transcription*) (Chambeyron *et al.*, 2002; Cost *et al.*, 2002; Christensen & Eickbush, 2005), determina que el DNA cromosomal, en el sitio de inserción del elemento, es digerido por una endonucleasa codificada por él mismo que genera un extremo 3' OH el cual se asocia con el extremo 3' del mRNA intermediario del elemento y es reverso transcrito por la actividad RT que igualmente el elemento codifica. De esta manera, el cDNA quedaría insertado en el cromosoma acompañado de la duplicación de la secuencia, de 10 a 20 nucleótidos, que se encuentra próxima al sitio de inserción y que se denomina sitios de duplicación directa (TSD). La mayoría de los elementos LINE descritos contienen dos marcos abiertos de lectura (ORF) con una organización genómica similar a retrovirus y elementos LTR. El primer ORF tiene homología con proteínas de unión a ácidos nucleicos y el segundo presenta homología con los genes *pol* de retrovirus. El elemento L1Tc de *T. cruzi* presenta una estructura similar a esta, aunque contiene un único marco abierto de lectura (Olivares *et al.*, 2000).

L1Tc codifica, en los 1574 aminoácidos en los que se traduce, para una serie de proteínas que representan la maquinaria enzimática necesaria para su retrotransposición autónoma por un mecanismo compatible con el anteriormente descrito TPRT (ver esquema en Figura 5). La región central de L1Tc contiene conservados los nueve dominios presentes en las enzimas con actividad transcriptasa inversa así como el dominio catalítico Y/FXDD. La correspondiente proteína recombinante, denominada RTL1Tc, muestra tener dicha actividad transcriptasa inversa actuando tanto sobre sustratos homólogos como heterólogos (García-Pérez *et al.*, 2003). Asimismo, la proteína RTL1Tc muestra tener actividad polimerasa dependiente de DNA, actividad que permitiría sintetizar la copia de la cadena complementaria del cDNA inicialmente reversotranscrito. Previos estudios permitieron evidenciar la existencia en *T. cruzi* de una actividad enzimática compatible con la transcriptasa inversa, la cual era inhibida por rifamicina y AZT (Glaxo-Wellcome[®]) (González *et al.*, 1997). Interesantemente, la proteína RTL1Tc tiene, además, la capacidad de sintetizar *in vitro* moléculas híbridas de cDNA al realizar consecutivos "switching" del RNA molde (García-Pérez *et al.*, 2003).

Mecanismo de retrotransposición de L1Tc

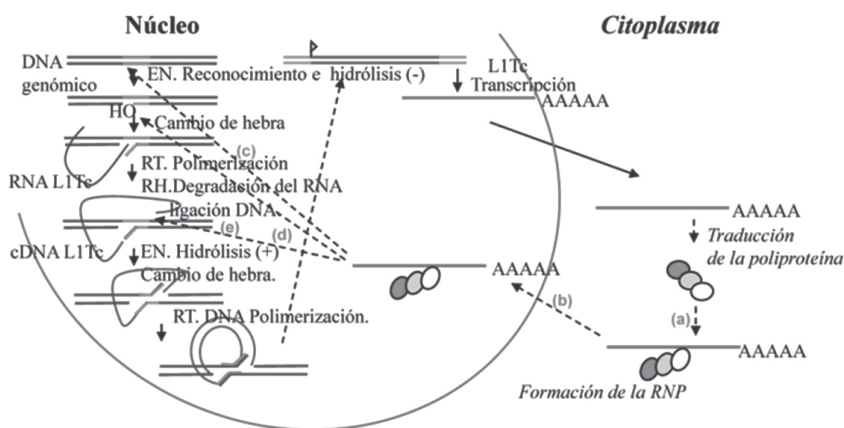


Figura 5. Esquema del mecanismo de movilización del elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi*. Posible papel del dominio C2-L1Tc en la retrotransposición del elemento L1Tc. Con flechas discontinuas se indican los pasos donde la proteína C2-L1Tc podría estar involucrada: formación de ribonucleopartículas (a), en su transporte al núcleo (b), en el reconocimiento y/o unión a la secuencia de inserción (c), en los intercambios de cadena, favoreciendo la eficiencia de la polimerización por la transcriptasa inversa (d), y en el reconocimiento y/o unión al sitio de corte de la segunda cadena. Las abreviaturas usadas indican: EN, endonucleasa; RT, transcriptasa inversa; RH, RNasa H; RNP, ribonucleopartícula.

Corriente abajo y en fase con los dominios codificantes para la RT, L1Tc codifica para una proteína que posee actividad RNasaH la cual utiliza, con alta eficiencia, tanto substratos homólogos como heterólogos (Olivares *et al.*, 2002). Esta es la única descripción, realizada hasta la fecha, de una actividad RNasaH asociada a una proteína codificada por un elemento móvil tipo LINE. Se ha sugerido que la presencia de esta actividad enzimática RNasaH asociada a un elemento LINE tendría, además de proporcionarles una mayor autonomía, otras adicionales implicaciones relevantes para la biología del organismo hospedador (Malik, 2005).

La proteína codificada por la región situada hacia el extremo 3' del elemento L1Tc, denominada C2L1Tc, presenta actividad chaperona de ácidos nucleicos (NAC) facilitando el intercambio de hebras de DNA para favorecer que los ácidos nucleicos adquieran su conformación más estable. C2-L1Tc contiene dos dominios *zinc-finger*-C2H2, similares a los presentes en factores de transcripción del tipo TFIIIA, y presenta una carga positiva neta característica de proteínas de unión a ácidos nucleicos. Así, C2-L1Tc une ácidos nucleicos mostrando tener una significativa mayor afinidad por la molécula de RNA que por ssDNA o dsDNA (Heras *et al.*, 2005). La

proteína C2L1Tc porta además dos dominios altamente básicos igualmente comprometidos en la unión a ácidos nucleicos y una secuencia de localización nuclear, lo cual sugiere que esta proteína estaría directamente implicada en la unión al mRNA intermediario del elemento y en su transporte al núcleo para llevar a cabo la inserción de la nueva copia del mismo (Heras *et al.*, 2005). La proteína de unión a ácidos nucleicos codificada por el ORF1 del elemento LINE-L1 humano se une a la molécula del mRNA traducida formando una ribonucleoproteína la cual sería necesaria, aunque no suficiente, para que ocurra la retrotransposición del elemento (Kulpa & Moran, 2005). Estos autores sugieren que la mencionada proteína, con actividad chaperona de ácidos nucleicos (Martin & Bushman, 2001), estaría además involucrada en otras importantes funciones ejercidas en pasos posteriores al transporte del mRNA intermediario al núcleo. Sin embargo, hasta el momento, se desconocen tales funciones y son escasos los datos existentes acerca de la formación y funcionalidad de la partícula de ribonucleoproteína.

Corriente arriba del dominio RT, se localiza una secuencia que codifica una proteína con actividad endonucleasa de tipo AP, NL1Tc (Olivares *et al.*, 1997), actividad enzimática que digiere el DNA cromosomal, en el sitio de inserción el elemento, y genera grupos 3'-OH que serían utilizados por la RT como *primer* para iniciar la reversotranscripción. Interesantemente, demostramos que la presencia de estos dominios era extensiva a todos los elementos LINE descritos (Martín *et al.*, 1995). Estos estudios representaron la primera descripción de una actividad endonucleasa en una proteína codificada por un elemento LINE. Además, permitieron explicar, de forma genérica, el primer paso del mecanismo de integración de los retrotransposones sin-LTR en el genoma, sin necesidad de requerir la existencia, en el DNA cromosomal, de roturas previas creadas al azar, tal como se venía postulando hasta ese momento. NL1Tc tiene asociada otras actividades enzimáticas, tales como actividad 3'-fosfatasa y 3'-fosfodiesterasa (Olivares *et al.*, 1999) que le permitirán liberar en el DNA grupos 3'-fosfato o 3'-fosfogluconato bloqueados y generar grupos 3' OH los cuales, igualmente, podrían ser también sitios de inserción del elemento.

El análisis de secuencia de 220 elementos completos de L1Tc ha mostrado que, al igual que ocurre para el elemento LINE-L1 humano, un amplio número de ellos están precedidos por una secuencia que mantiene un patrón de nucleótidos conservado. Estos datos sugieren que las inserciones no ocurren al azar, sino con una relativa especificidad, probablemente motivada por el hecho de que la endonucleasa que codifican reconozca específicas estructuras conformacionales (Bringaud *et al.*, 2006a). Así, es probable que este comportamiento sea un hecho común para el resto de los elementos LINE no específicos de sitio. Previos estudios del laboratorio permitieron determinar que la endonucleasa codificada por L1Tc, así como aquellas

codificadas por otros elementos LINE tal como el elemento L1 humano, posee conservados los dominios catalíticos de las DNasa I (Martin *et al.*, 1996). Ello soportaría que estos elementos LINE puedan reconocer variaciones estructurales dependientes de secuencia y, de forma similar a aquellas reconocidas por las DNasa I, generar los extremos 3'-OH necesarios para la transposición. Por otra parte, y dado que similares estructuras nucleotídicas preceden a las secuencias TSD que flanquean al retrotransposon NARTc, muy posiblemente este elemento no-autónomo se movilice empleando la maquinaria de L1Tc.

A los retrotransposones se les ha implicado también en procesos de reparación del DNA cromosómico. De hecho, en *Saccharomyces cerevisiae* se produce la activación del retrotransposón Ty1 en respuesta a la erosión de los télómeros, lo que sugiere que el incremento en la síntesis de Ty1 y en su retrotransposición son parte de la respuesta celular al daño genómico Scholes *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que el elemento L1 humano repara roturas de doble cadena en el DNA insertándose en el genoma por un mecanismo independiente de la endonucleasa que codifica (. Además, Farkash *et al.* (2006) observaron que la exposición de células de mamífero a radiación gamma induce un incremento en el nivel de retrotransposición del elemento L1. Sin embargo, estos autores muestran que este incremento en la retrotransposición parece ser dependiente de endonucleasa. Es decir, la retrotransposición del elemento L1 ocurre a través del corte de la endonucleasa en el lugar de inserción (Farkash *et al.*, 2006), si bien en este estudio las células empleadas contienen intacta la maquinaria celular de reparación del DNA. Estos datos en conjunto sugieren que la reparación mediada por la inserción del elemento L1 en roturas de DNA de doble cadena preexistentes podría estar favorecida por la persistencia de dichas roturas en células con una maquinaria de reparación del DNA dañada, mientras que en células intactas el incremento de la retrotransposición contribuye a la inestabilidad genómica.

En el caso del elemento L1Tc la sobreexpresión, en transformantes estables de *T. cruzi*, de la endonucleasa que codifica (NL1Tc), protege a los parásitos del efecto negativo que el tratamiento con daunorubicina o radiación gamma tiene sobre su tasa de crecimiento (Olivares *et al.*, 2003). Además, esta proteína NL1Tc ha mostrado estar implicada en el proceso de reparación de las roturas del DNA causadas por el tratamiento con dauomicina. Curiosamente, la completa secuenciación de los genomas de los parásitos *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* ha mostrado que todos ellos contienen conservados la mayoría de los componentes de la ruta de reparación por escisión de bases; sin embargo, los genes implicados en los mecanismos que previenen los efectos del estrés oxidativo no han sido detectados en estos tripanosomátidos (El-Sayed *et al.*, 2005). En conjunto, estos resulta-

dos indican una importante relación entre retrotransposición y reparación en eucariotas, evidenciando nuevos mecanismos de relevancia biológica para la reparación cromosómica en células que contienen estos elementos.

Secuencias reguladoras presentes en el elemento LINE-L1Tc de *Trypanosoma cruzi*

Para garantizar la autonomía de los elementos LINE se ha postulado que los mismos posean un promotor interno que medie su transcripción y que se mantenga intacto en la copia de nueva inserción. Interesantemente, los 77 nucleótidos del extremo 5' de L1Tc y NARTc son 100% idénticos mientras que el resto de la secuencia de ambos elementos mantiene un 54% de homología (Bringaud *et al.*, 2002). Debido a la localización de esta secuencia en el extremo 5' de los retroelementos sin-LTR y a su alto grado de conservación, se ensayó la capacidad de la misma de activar la transcripción de un gen reportero tras clonarla corriente arriba del gen codificante de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y transfectar establemente epimastigotes de *T. cruzi*. Así, se demostró que esta secuencia de 77pb, denominada Pr77, es capaz de mediar la transcripción de CAT y que la tasa de transcripción de la misma es de 10 a 14 veces superior a la mediada por secuencias que se encuentran localizadas corriente arriba del *cluster* génico de KMP11 o de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GADPH) (Heras *et al.*, 2007). Diversos experimentos mostraron también que los transcritos derivados de Pr77, tanto aquellos correspondientes al gen reportero como los correspondientes a los transcritos de L1Tc en *T. cruzi*, carecen de *spliced leader* (Figura 6) y posiblemente debido a ello, poseen una vida media significativa corta una hora) (Heras *et al.*, 2007). Curiosamente, los transcritos derivados de los retroelementos RIME e *ingi* de *T. brucei*, así como del retroelemento TcTREZO, tampoco son procesados por *trans-splicing* por lo que también carecen de la secuencia del *spliced leader* en su extremo 5' (Vasella *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2007). Por lo tanto, la no adición del SL al extremo 5' de los transcritos parece ser una característica general de los LINE de tripanosomátidos los cuales, probablemente, han evolucionado para mantener toda la longitud de sus transcritos y garantizar así el carácter autónomo de las copias de nueva inserción. Interesantemente, los transcritos CAT derivados de Pr77, al igual que los transcritos de L1Tc, se inician en el nucleótido 1 o cerca de él, tal como se deduce de ensayos de primer extensión (Heras *et al.*, 2007). Los transcritos derivados de Pr77 son traducibles aunque la abundancia de los productos traducidos es baja (Heras *et al.*, 2007), comparada con la mediada por otras secuencias activadoras de la transcripción, tal como la región anteriormente mencionada GADPH (Kelly *et al.*, 1992). La región 5' de los mencionados transcritos derivados de Pr77 muestra tener una estructura secundaria con diversos *stem loops* (Figura 7).

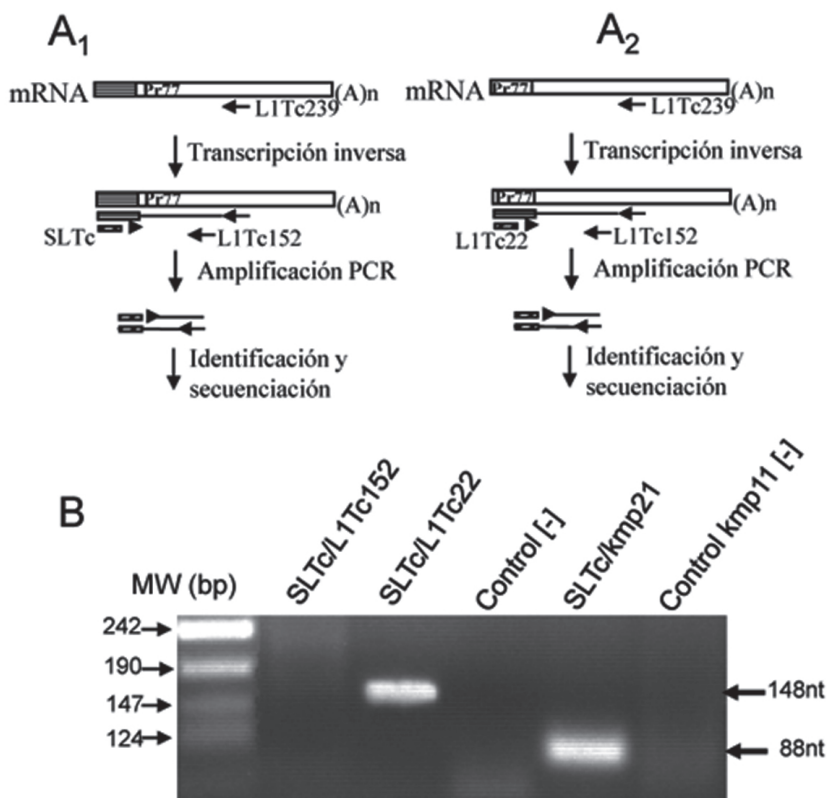


Figura 6. Análisis del extremo 5' de los transcritos correspondientes al elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi*. (A₁ y A₂) Esquema de las reacciones de RT-PCR diseñadas. (B) Tinción con bromuro de etidio de los productos de RT-PCR desarrollados en electroforesis de agarosa. Como molde para todas las reacciones se usa RNA citoplásmico aislado de formas epimastigotes de *T. cruzi* tratado con DNasa libre de RNasa. Para la detección de la secuencia situada en el extremo 5' del transcrito L1Tc realizamos una transcripción inversa usando como primer oligonucleótido complementario a L1Tc que mapea en las posiciones 221-239 de L1Tc (L1Tc239). Seguidamente llevamos a cabo una PCR usando el primer L1Tc152 (que mapea igualmente sobre L1Tc y corriente arriba de la posición en la que mapea L1Tc239) y el primer SLTc que se corresponde con un fragmento de la secuencia *spliced leader* de *T. cruzi* (carril, SLTc/L1Tc152 de figura B y esquema en A₁). Alternativamente, la PCR la realizamos sustituyendo el primer SLTc por el primer L1Tc22 que se corresponde con las posiciones 6-22 de L1Tc (carril, SLTc/L1Tc152 de figura B y esquema en A₂). Como control negativo se realiza una similar reacción sin añadir la enzima transcriptasa inversa (carril, Control [-]). Como control positivo llevamos a cabo la detección de la secuencia situada en el extremo 5' del transcrito KMP11, siguiendo para ello un diseño similar al esquema A₁, pero sustituyendo los oligonucleótidos L1Tc239 y L1Tc152 por aquellos complementarios a la secuencia del gen KMP11 en la posición 162 a 182 (kmp182) y posición 4-21 del codón de inicio del gen KMP11 (kmp21). Una reacción similar sin añadir transcriptasa inversa fue utilizada como control negativo (carril, Control kmp11 [-]). El tamaño de las bandas amplificadas se indica a la derecha de la figura.

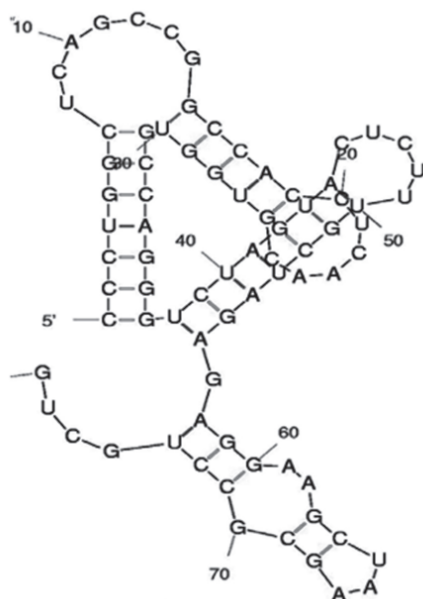


Figura 7. Análisis predictivo de la estructura secundaria del extremo 5' del mRNA del elemento L1Tc. Este análisis fue desarrollado empleando los primeros 77 nucleótidos previos al primer AUG del transcrito del elemento L1Tc (región denominada Pr77), usando para ello el programa Mfold versión 3.2 <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>. Se representa la estructura más estable entre las proporcionadas, la cual muestra tener una DG= -27.10.

La secuencia Pr77 no es exclusiva de L1Tc y NARTc sino que se encuentra también conservada en el extremo 5' de los elementos ingi/RIME de *T. brucei* con los que mantiene una identidad del 76,6%. Pero, a su vez, en *T. cruzi* y *T. brucei* existen elementos que han acumulado un alto número de mutaciones puntuales que implican la formación de múltiples fases de lectura abiertas y codones de parada y que, por haber mutado posiciones esenciales de los mismos, han perdido teóricamente su capacidad de movilizarse de manera autónoma. Estos elementos se llaman DIREs (*degenerated ingi/L1Tc related elements*) y también se localizan en las STS. En el genoma de *L. major* se han identificado recientemente una importante cantidad de elementos DIREs (Bringaud *et al.*, 2006b). Análisis filogenéticos intra-especies, empleando secuencias de aminoácidos que mapean sobre los dominios RT de los elementos *ingi* y L1Tc, muestran que los elementos DIREs identificados en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* son casi idénticos a los mencionados retrotransposones sin-LTR, lo que ha conducido a clasificarlos dentro del grupo que engloba a dichos elementos (Bringaud *et al.*, 2006b). Cuando el análisis se realiza con otros dominios conservados como el de la endonucleasa

o el correspondiente a las proteínas con actividad RnasaH, el resultado es el mismo. A pesar del alto número de mutaciones que los DIREs han acumulado y que, teóricamente, les imposibilitan su movilidad autónoma, no se puede eliminar la posibilidad de que estos elementos sean movilizados *en trans* por la maquinaria enzimática procedente de un elemento activo tal como ha sido sugerido para los retrotransposones no autónomos de tipo SINE (Weiner, 2002; Kajikawa & Okada, 2002; Dewannieux *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2008). Interesantemente, los primeros 72 nucleótidos de todos los elementos DIRE completos detectados *L. major* mantienen un 65% de identidad con los primeros 77 pb de L1Tc y NARTc y un 76,6% de identidad con la región homóloga de *ingi*/ RIME (Bringaud *et al.*, 2006a). Los elementos degenerados, denominados SIDERs, recientemente descritos en diferentes especies de *Leishmania* portan también, en su extremo 5', una secuencia con alta homología a la mencionada secuencia Pr77 (Bringaud *et al.*, 2007; Requena *et al.*, 2008). Curiosamente, esta es la única secuencia de nucleótidos conservada entre los diferentes retrotransposones descritos en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, estén o no relacionados entre sí, por lo que se la ha calificado como la huella o firma de retroelementos en tripanosomátidos. Por otra parte, Pr77 se ha encontrado asociado a secuencias no relacionadas con retroelementos en 24 localizaciones diferentes en el genoma de *T. cruzi* (Bringaud *et al.*, 2006b) y, al menos, en 12 regiones del genoma de *T. brucei* (Bringaud, comunicación personal) por lo que es posible que intervenga en la transcripción de genes no relacionados con retroelementos. El alto grado de conservación de Pr77 refuerza que esta sea funcional en todos los casos y que tenga un papel universal.

En el extremo amino del elemento y en fase con la poliproteína que L1Tc codifica se ha identificado una secuencia homóloga a la secuencia autocatalítica 2A descrita en picornavirus y otros organismos virales (ver esquema en Figura 8). Esta secuencia, denominada 2AL1Tc, se encuentra presente en todas las copias de L1Tc que posee *T. cruzi* localizada a 60 nucleótidos corriente abajo de Pr77. Las secuencias autocatalíticas 2A controlan la traducción *in situ* de tal modo que, cuando la secuencia 2A es traducida, ejerce autocatálisis escindiendo el polipéptido que codificaba la región que le precedía y permitiendo que el ribosoma continúe la traducción de aquella que se encuentra corriente abajo, incluso en ausencia de codón iniciador (Donnelly *et al.*, 2001a; Donnelly *et al.*, 2001b; Ryan *et al.*, 2002). La secuencia 2A de *T. cruzi* ha mostrado ser funcional *in vitro* e *in vivo* y la misma controla la abundancia de los productos de traducción del elemento L1Tc (Heras *et al.*, 2006), los cuales constituyen la maquinaria enzimática necesaria para la movilidad del mismo.

El 72,5% de las secuencias 2A presentes en los elementos L1Tc mantienen conservado el dominio consenso de las secuencias 2A, mientras que el

27,5% de las mismas contienen una mutación puntual en dicho consenso (Heras *et al.*, 2006). De entre estas últimas, hay una mutación (HxN en posición 17) que no está presente en ningún otro organismo y que está altamente representada 20% de los elementos) en las secuencias 2A de L1Tc (Figura 8), por lo que debe de haberse adquirido después de que divergieran *T. cruzi* y *T. brucei*. Cuando la secuencia autocatalítica 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) se muta en posición 17 y porta H en vez de N, pierde la

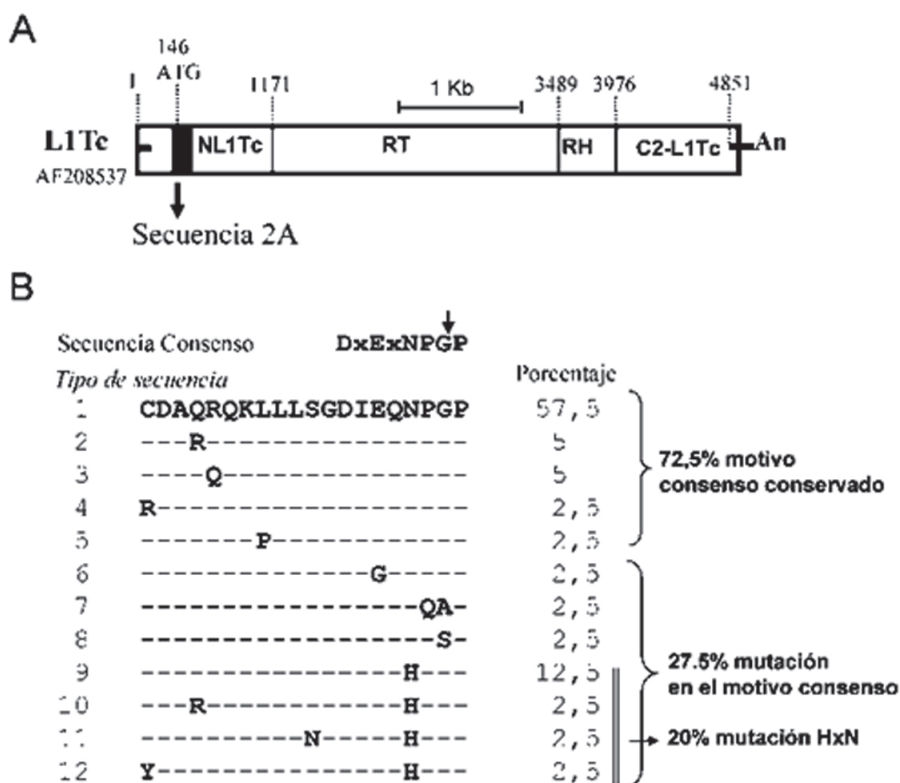


Figura 8. Esquema de la estructura del elemento L1Tc de *Trypanosoma cruzi* y de la secuencia 2A que porta **A**) Esquema del elemento L1Tc donde las regiones codificantes están representadas por rectángulos sobre los que se indican los dominios endonucleasa (NL1Tc), transcriptasa inversa (RT), RNasaH (RH) y proteína de unión a ácidos nucleicos y actividad chaperona de los mismos (C2-L1Tc) que posee. Los números situados sobre los rectángulos indican la posición en nucleótidos. Las líneas situadas en los extremos del elemento representan regiones no traducidas. El cuadro negro situado hacia el extremo 5' del elemento representa la secuencia que codifica para el motivo consenso característico de las secuencias víricas 2A, el cual aparece detallado en el panel B. An representa la cola de poliadeninas situada en el extremo 3' del elemento. **B**) Consenso de las secuencias autocatalíticas 2A descritas en virus. Relación de 12 tipos de secuencias 2A contenidas en los elementos L1Tc de *T. cruzi*, agrupadas considerando las mutaciones contenidas. La flecha indica el sitio de corte.

actividad autocatalítica. En *T. cruzi* la secuencia que porta H en posición 17 no es funcional en ensayos *in vitro* de transcripción-traducción siendo, en cambio, activa y generando autoprocesamiento *in vivo* en el parásito *T. cruzi* transfectado con apropiados vectores bicistrónicos que contienen la mencionada secuencia 2A de L1Tc (Heras *et al.*, 2006).

Interesantemente, estos resultados muestran un ejemplo de transmisión horizontal de información génica en la que un retroelemento aumenta su grado de complejidad, probablemente para mejorar el carácter autónomo que posee. El largo periodo de coexistencia de *T. cruzi* con sus hospedadores vertebrados e invertebrados, junto a las ventajas que la presencia de una secuencia autocatalítica pueda aportar al control de la traducción de su maquinaria enzimática, puede explicar el hecho de que una secuencia viral funcional forme parte de un retroelemento de un hospedador eucariota.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los investigadores, técnicos y estudiantes, que forman y han formado parte de los Grupos de investigación que dirigen, su esfuerzo y dedicación que ha permitido la obtención de gran parte de los resultados mostrados en el presente trabajo. Asimismo, los autores agradecen el apoyo recibido de las entidades públicas y privadas que han venido financiando los trabajos de investigación llevados a cabo por los Grupos que dirigen. Este artículo ha sido realizado en el contexto de los proyectos financiados por el Plan Nacional I+D+I (MICINN) Ref. BFU2007-64999/BMC y BFU2007-65095/BMC, Plan Andaluz de investigación Ref. P05-CVI-01227 (Junta de Andalucía) e ISCIII (MSC) Ref. RICET-RD06/0021-0014, España.

Referencias

- Aksoy S, Lalor TM, Martin J, Van der Ploeg, LH, Richards FF. 1987. Multiple copies of a retroposon interrupt spliced leader RNA genes in the African trypanosome, *Trypanosoma gambiense*. *Embo J* 6: 3819-3826.
- Andersson G, Svensson AC, Setterblad N, Rask L. 1998. Retroelements in the human MHC class II region. *Trends Genet* 14: 109-114.
- Babushok DV, Kazazian HH, Jr. 2007. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* 28: 527-539.
- Ben-Dov CP, Levin MJ, Vazquez MP. 2005. Analysis of the highly efficient pre-mRNA processing region HX1 of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 140: 97-105.

- Biemont C, Vieira C. 2006. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-524.
- Bringaud F, Bartholomeu DC, Blandin G, Delcher A, Baltz T, El-Sayed NM, Ghedin E. 2006a. The *Trypanosoma cruzi* L1Tc and NARTc non-LTR retrotransposons show relative site specificity for insertion. *Mol Biol Evol*, 23: 411-420.
- Bringaud F, Garcia-Perez JL, Heras SR, Ghedin E, El-Sayed NM, Andersson B, Baltz T, Lopez MC. 2002. Identification of non-autonomous non-LTR retrotransposons in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 124: 73-78.
- Bringaud F, Ghedin E, Blandin G, Bartholomeu DC, Caler E, Levin MJ, Baltz T, El-Sayed NM. 2006b. Evolution of non-LTR retrotransposons in the trypanosomatid genomes: *Leishmania major* has lost the active elements. *Mol Biochem Parasitol* 145: 158-170.
- Bringaud F, Ghedin E, El-Sayed NM, Papadopoulos B. 2008. Role of transposable elements in trypanosomatids. *Microbes Infect* 10: 575-581.
- Bringaud F, Muller M, Cerqueira GC, Smith M, Rochette A, El-Sayed NM, Papadopoulos B, Ghedin E. 2007. Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. *PLoS Pathog*, 3: 1291-1307.
- Chambeyron S, Bucheton A, Busseau I. 2002. Tandem UAA repeats at the 3'-end of the transcript are essential for the precise initiation of reverse transcription of the I factor in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 277: 17877-17882.
- Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Férec C. 2005. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum Genet* 117: 411-427.
- Chiurillo MA, Cano I, Da Silveira JF, Ramirez JL. 1999. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 100: 173-183.
- Christensen SM, Eickbush TH. 2005. R2 target-primed reverse transcription: ordered cleavage and polymerization steps by protein subunits asymmetrically bound to the target DNA. *Mol Cell Biol* 25: 6617-6628.
- Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD. 2002. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *Embo J* 21: 5899-5910.
- Dewannieux M, Heidmann T. 2005. L1-mediated retrotransposition of murine B1 and B2 SINEs recapitulated in cultured cells. *J Mol Biol* 349: 241-247.

- Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. 2003. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35: 41-48.
- Donelson JE. 1996. Genome research and evolution in trypanosomes. *Curr Opin Genet Dev* 6: 699-703.
- Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. 1999. More surprises from *Kinetoplastida*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2579-2581.
- Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, Ryan MD. 2001a. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* 82: 1027-1041.
- Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. 2001b. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol* 82: 1013-1025.
- El-Sayed NM, et al. 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET. 2006. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Res* 34: 1196-1204.
- Garcia-Perez JL, Gonzalez CI, Thomas MC, Olivares M, Lopez MC. 2003. Characterization of reverse transcriptase activity of the L1Tc retroelement from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Mol Life Sci* 60: 2692-2701.
- Ghedini E, et al. 2004. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 134: 183-191.
- Gilbert C, Pace JK 2nd, Waters PD. 2008. Target site analysis of RTE1_LA and its AfroSINE partner in the elephant genome. *Gene* PMID: 18796327.
- Gonzalez CI, Thomas MC, Martin F, Alcamí J, Alonso C, Lopez MC. 1997. Reverse transcriptase-like activity in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 63: 117-126.
- Hasan G, Turner MJ, Cordingley JS. 1984. Complete nucleotide sequence of an unusual mobile element from *Trypanosoma brucei*. *Cell* 37: 333-341.
- Heras SR, Lopez MC, Garcia-Perez JL, Martin SL, Thomas MC. 2005. The L1Tc C-terminal domain from *Trypanosoma cruzi* non-long terminal repeat retrotransposon codes for a protein that bears two C2H2 zinc finger motifs and is endowed with nucleic acid chaperone activity. *Mol Cell Biol* 25: 9209-9220.
- Heras SR, Lopez MC, Olivares M, Thomas MC. 2007. The L1Tc non-LTR retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* contains an internal RNA-pol II-

- dependent promoter that strongly activates gene transcription and generates unspliced transcripts. *Nucleic Acids Res* 35: 2199-2214.
- Heras SR, Thomas MC, Garcia-Canadas M, de Felipe P, Garcia-Perez JL, Ryan MD, Lopez MC. 2006. L1Tc non-LTR retrotransposons from *Trypanosoma cruzi* contain a functional viral-like self-cleaving 2A sequence in frame with the active proteins they encode. *Cell Mol Life Sci* 63: 1449-1460.
- Kajikawa M, Okada N. 2002. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell* 111: 433-444.
- Kazazian HH, Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20: 3963-3969.
- Kim D, Chiurillo MA, El-Sayed N, Jones K, Santos MR, Porcile PE, Andersson B, Myler P, da Silveira JF, Ramirez JL. 2005. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in pseudogenes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. *Gene* 346: 153-161.
- Kimmel BE, ole-MoiYoi OK, Young JR. 1987. Ingi, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian LINEs. *Mol Cell Biol* 7: 1465-1475.
- Kissinger JC. 2006. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends Parasitol* 22: 240-243.
- Kulpa DA, Moran JV. 2005. Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet* 14: 3237-3248.
- Malik HS. 2005. Ribonuclease H evolution in retrotransposable elements. *Cytogenet Genome Res* 110: 392-401.
- Maranon C, Puerta C, Alonso C, Lopez MC. 1998. Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 92: 313-324.
- Maranon C, Thomas MC, Puerta C, Alonso C, Lopez MC. 2000. The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1490: 1-10.
- Martin F, Maranon C, Olivares M, Alonso C, Lopez MC. 1995. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA

- L1Tc from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes. *J Mol Biol* 247: 49-59.
- Martin F, Olivares M, Lopez MC, Alonso C. 1996. Do non-long terminal repeat retrotransposons have nuclease activity? *Trends Biochem Sci* 21: 283-285.
- Martin SL, Bushman FD. 2001. Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Mol Cell Biol* 21: 467-475.
- Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. 2004. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3: 506-517.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11: 1291-1299.
- McClintock B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21: 197-216.
- Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283: 1530-1534.
- Moran Jv, N Gilbert. 2002. Mammalian LINE-1 retrotransposon and related elements. *mobile DNA II*. N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert and A. M. Lambowitz. Washington DC, ASM press, 836-869.
- Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, Taccioli GE, Sekiguchi J, Moran JV. 2007. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446: 208-212.
- Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV. 2002. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 31: 159-165.
- Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. 2005. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435: 903-910.
- Nekrutenko A, Li WH. 2001. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet* 17: 619-621.
- Olivares M, Alonso C, Lopez MC. 1997. The open reading frame 1 of the L1Tc retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with apurinic-apyrimidinic nuclease activity. *J Biol Chem* 272: 25224-25228.
- Olivares M, Thomas MC, Lopez-Barajas A, Requena JM, Garcia-Perez JL, Angel S, Alonso C, Lopez MC. 2000. Genomic clustering of the *Trypanosoma cruzi* nonlong terminal L1Tc retrotransposon with defined interspersed repeated DNA elements. *Electrophoresis* 21: 2973-2982.

- Olivares M, Garcia-Perez JL, Thomas MC, Heras SR, Lopez MC. 2002. The non-LTR long terminal repeat retrotransposon L1Tc from *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with RNase H activity. *J Biol Chem* 277: 28025-28030.
- Olivares M, Lopez MC, Garcia-Perez JL, Briones P, Pulgar M, Thomas MC. 2003. The endonuclease NL1Tc encoded by the LINE L1Tc from *Trypanosoma cruzi* protects parasites from daunorubicin DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1626: 25-32.
- Olivares M, Thomas MC, Alonso C, Lopez MC. 1999. The L1Tc, long interspersed nucleotide element from *Trypanosoma cruzi*, encodes a protein with 3'-phosphatase and 3'-phosphodiesterase enzymatic activities. *J Biol Chem* 274: 23883-23886.
- Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35: 501-538.
- Requena JM, Folgueira C, Lopez MC, Thomas MC. 2008. The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the *Leishmania* genomes, constitute subfamilies showing chromosomal proximity relationship. *BMC Genomics* 9: 263.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol* 51: 271-280.
- Requena JM, Lopez MC, Alonso C. 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12: 279-283.
- Requena JM, Martin F, Soto M, Lopez MC, Alonso C. 1994. Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'-end of a polyA+ transcript. *Gene* 146: 245-250.
- Roy-Engel AM, El-Sawy M, Farooq L, Odom GL, Perepelitsa-Belancio V, Bruch H, Oyeniran OO, Deininger PL. 2005. Human retroelements may introduce intragenic polyadenylation signals. *Cytogenet Genome Res* 110: 365-371.
- Ryan MD, Luke G, Hugues LE, Cowton VM, Dam ET, Li X, Donnelly ML, Mehrotra A, Gani D. 2002. The aphtho- And cardiovirus "primary" 2A/2B polyprotein "cleavage". In Semler, B. and Wimmer, E. eds., *Molecular biology of Picornavirus*. ASM Press, Washington, DC, pp. 213-223.
- Schimanski B, Brandenburg J, Nguyen TN, Caimano MJ, Gunzl A. 2006. A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 34: 1676-1684.

- Scholes DT, Kenny AE, Gamache ER, Mou Z, Curcio MJ. 2003. Activation of a LTR-retrotransposon by telomere erosion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15736-15741.
- Schwahn U. et al. 1998. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet* 19: 327-332.
- Souza RT, Santos MR, Lima FM, El-Sayed NM, Myler PJ, Ruiz JC, da Silveira JF. 2007. New *Trypanosoma cruzi* repeated element that shows site specificity for insertion. *Eukaryot Cell* 6: 1228-1238.
- Takle GB, O'Connor J, Young AJ, Young AJ, Cross G. 1992. Sequence homology and absence of mRNA defines a possible pseudogene member of the *Trypanosoma cruzi* gp85/sialidase multigene family. *Mol Biochem Parasitol* 56: 117-127.
- Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls S, López MC, Puerta C. 2000. Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 75: 203-210.
- Torres C, Barreiro L, Dallagiovanna B, Gamarro F, Castanys S. 1999. Characterization of a new ATP-binding cassette transporter in *Trypanosoma cruzi* associated to a L1Tc retrotransposon. *Biochim Biophys Acta* 1489: 428-432.
- Vassella E, Roditi I, Braun R. 1996. Heterogeneous transcripts of RIME/ingi retrotransposons in *Trypanosoma brucei* are unspliced. *Mol Biochem Parasitol* 82: 131-135.
- Vazquez M, Ben-Dov C, Lorenzi H, Moore T, Schijman A, Levin MJ. 2000. The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2128-2133.
- Vazquez MP, Schijman AG, Levin MJ. 1994. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 beta protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 64: 327-336.
- Villanueva MS, Williams SP, Beard CB, Richards FF, Aksoy S. 1991. A new member of a family of site-specific retrotransposons is present in the spliced leader RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* 11: 6139-6148.
- Weiner AM. 2002. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Curr Opin Cell Biol* 14: 343-350.
- Wincker P, Murto-Dovales AC, Goldenberg S. 1992. Nucleotide sequence of a representative member of a *Trypanosoma cruzi* dispersed gene family. *Mol Biochem Parasitol* 55: 217-220.

COMENTARIO AL ARTÍCULO DEL PROFESOR LÓPEZ

Los retrotransposones, originalmente descritos por McClintock al estudiar las causas de los diferentes colores en granos del maíz, se han convertido en un campo muy activo de estudio. En eucariotes se encuentran cadenas largas de DNA provenientes de RNAm que codifica para proteína ribosomal o RNAr, retrotranscrito a DNA e insertado en ciertos sitios de baja especificidad en el genoma. A estos insertos se les ha llamado LINE (Long interspersed nuclear elements) y en el caso del humano representan el 21% del genoma. Otros retrotransposones son secuencias más cortas, SINE (Short interseperesd nuclear elements) que representan un 13% del genoma humano. Se creía que estas secuencias eran DNA "basura", pero ahora parece que pueden estar involucradas en el desarrollo de neoplasias, en hemofilia y porfiria.

La inserción de LINE y SINE en el genoma puede ser silenciosa o puede causar mutaciones. De hecho, se piensa en la posibilidad de que la variabilidad en los elementos Ab de los anticuerpos puede ser precisamente debida a este tipo de elementos que se insertan en diferentes regiones de los genes que codifican por inmunoglobulina. En el caso de parásitos intracelulares, tales como los tripanosomátidos, estos elementos podrían explicar la alta tasa de mutación de sus proteínas de superficie, que ha sido un obstáculo para el desarrollo de vacunas.

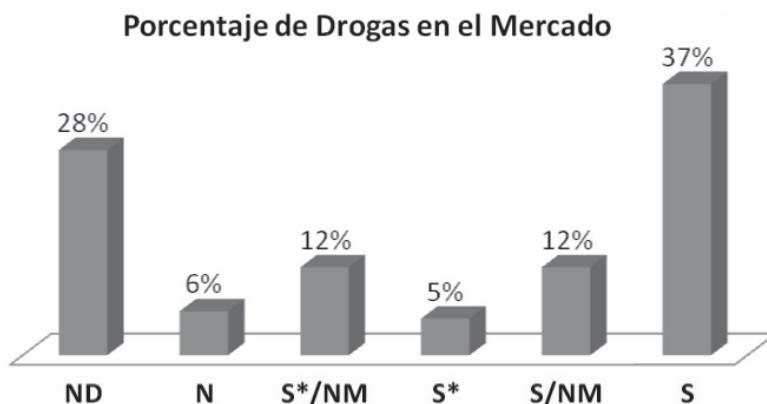
La tesis desarrollada por el profesor López en este trabajo va en esa dirección pero señala aún más, la posibilidad de que los retrotrasnposones puedan ser motores de la evolución ya que al insertarse de nuevo en el genoma conducen a varias posibilidades: 1) que el gen funcional afectado no pueda ser transcrito, con lo que la correspondiente proteína dejaría de producirse; 2) que la inserción cause un cambio menor en la secuencia, con el resultado de que se produzca una proteína mutada; 3) que se cambie de posición un determinado exon con el correspondiente cambio en la proteína transcrita después del splicing o 4) que se inserte en tal forma que se produzca una duplicación del gene. En este último caso, tendríamos un mecanismo que explicaría la evolución a través de la conservación de uno de los genes duplicados y la mutación del otro para dar una nueva proteína con una característica nueva.

PRODUCTOS NATURALES

Introducción

Las especies vegetales y animales han venido siendo utilizadas desde tiempos inmemoriales, en forma empírica, en la salud del género humano; sin embargo, solo hasta finales del siglo XIX los científicos empezaron a darse cuenta que utilizando ciertas metodologías de extracción se podían obtener los compuestos responsables de la actividad mostrada por el organismo fuente. No obstante, sólo fue hasta el siglo XX que la química de productos naturales vegetales (compuestos obtenidos de plantas terrestres) tuvo un gran auge y desarrollo hacia la identificación de los compuestos útiles que podrían ser usados como drogas, pero fue solo hacia los años cincuenta, después del descubrimiento de la aspirina, que esta ciencia empezó un desarrollo imparable, sorprendente. A finales del siglo XX y lo que va corrido del XXI no solo se utilizan las plantas como fuente de drogas sino también los animales y microorganismos terrestres y sobre todo los organismos marinos.

Los productos naturales y su papel como fuente de nuevas drogas puede deducirse de la Figura donde se han recopilado los datos sobre el total de medicamentos que han sido desarrollados y aprobados desde 1981 hasta el 2007. La gráfica muestra el porcentaje de compuestos de origen natural



(N) (marino y terrestre) que han sido convertidos en drogas, las cuales están siendo aplicadas para diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, según datos publicados en el año 2007 por Newman & Cragg (J Nat Prod 70: 461-477). También puede verse el origen y el porcentaje de otros compuestos que se han transformado en medicamentos, por ejemplo derivados de productos naturales (ND), derivados de compuestos sintéticos (S), derivados de compuestos sintéticos pero cuyo farmacóforo es de origen natural (S*), y derivados o imitaciones de un producto natural (ND).

Como se aprecia en la gráfica el 63% de compuestos que están en el mercado de la industria farmacéutica son de origen natural o tienen que ver directamente con compuestos naturales bioactivos.

La utilidad de los medicamentos de origen natural mencionados se puede medir según el tipo de enfermedad en la cual se vienen utilizando, por ejemplo como agentes antiinfecciosos, oncológicos, neurológicos, cardiovasculares, antiinflamatorios, analgésicos, anestésicos, anti-Alzheimer, anti-Parkinson, antivirales, ansiolíticos, diuréticos, antiepilépticos, antihipertensivos, en hepatitis, hemofilias, vasodilatadores, antidiabéticos, antifúngicos, antipsoriáticos, antiparasitarios, antialérgicos, antidepresivos, antieméticos, antiúlceras, broncodilatadores, diuréticos, hipnóticos y muchas otras aplicaciones que sería muy largo de enumerar en este escrito, pero que el lector puede encontrar casi todas las aplicaciones conocidas en Newman & Cragg, 2007 y en Butler, 2008 (Nat Prod Rep 25: 475-516).

Brevemente podemos citar como ejemplos particulares algunos de los medicamentos desarrollados a partir de los aproximadamente 300.000 compuestos aislados e identificados de plantas, animales y microorganismos terrestres; por ejemplo, como antibióticos vale la pena mencionar: las penicilinas, la eritromicina, la tetraciclina, la rifampicina, la kanamicina, el cloramfenicol, la anfotericina, la polimixina; como antivirales: los nucleósidos; como antiparasitarios: la emetina y la ivermectina; como antitumorales: la vinca, la canptotecina, el taxol, el etoposido, la daunorubicina; como antihipertensivos: la reserpina, el captopril, el enalapril; como antiinflamatorios: la aspirina, la colchicina; como analgésicos: la morfina, la epibatidina, los ergots, las conotoxinas; como antimaláricos: la artemisinina y la ivermectina. Adicionalmente, pueden mencionarse algunos otros productos comerciales desarrollados a partir de compuestos de origen natural terrestre, por ejemplo, como colorantes: carotenos, alizarina, antocianinas, azul jagua; edulcorantes/saborizantes/aditivos: eugenol, acetol, mentol, miristicina, esteviosido, capsaicina, papaina y

bromelina; lacas, resinas taninos, cosméticos; bothos, pigmentos, perfumes, geles, y ambreína y muchos otros.

Aunque las investigaciones en la química de productos naturales marinos son aún muy jóvenes (podría decirse que éstas empezaron en forma en 1970), ya hay entre los aproximadamente 15.000 compuestos aislados, numerosos productos que están en el mercado; por ejemplo: algunas drogas antivirales como Ara A, comercializada por Glaxo Smith Kline, y AraC comercializada por Pharmacia; drogas anticáncer como AraC y YondelisTM, producida y comercializada para Europa por Pharmamar (filial del grupo Zeltia) y comercializada en Estados Unidos por Johnson y Johnson; drogas contra el dolor como PrialTM, aprobada por la FDA y por La Comisión Europea, y comercializada en Europa por Eisai; aditivos (pseudopterosinas) en cremas cosméticas comercializadas por Estée Lauder; suplementos nutritivos (FormulaidTM); y reactivos en Biología Molecular.

Por la gran importancia que la química de productos naturales tiene en Colombia, mirada no solo desde el punto de vista de la explotación sustentable de nuestra biodiversidad biológica (especies vivas de fauna y flora tanto terrestre como marina), lo cual es considerado por muchos como uno de los grandes bastiones de la economía de los próximos años, sino también desde el tema de la salud, una meta buscada afanosamente por todos los colombianos, se decidió organizar un Seminario Internacional donde se abriera un espacio de discusión entre científicos y estudiantes colombianos con científicos de frontera de otros países como España, Canadá, México y Brasil y donde uno de los temas a tratar fueran los Productos Naturales.

Organización del Seminario Internacional Tendencias y Futuro de los Productos Naturales

El seminario en la parte temática de productos naturales se organizó en cuatro secciones, cada una de ellas con un sentido estratégico y filosófico importante. En la primera se dio el espacio para contrastar lo que se viene haciendo en investigación en productos naturales vegetales terrestres en Colombia con lo que se hace en el contexto latinoamericano. La segunda sección se dedicó a temas relevantes de poco desarrollo en Colombia pero de gran futuro en el contexto internacional, por ejemplo los productos naturales marinos y los microorganismos marinos. La tercera sección, atendiendo al hecho hoy en día crítico del suministro de la materia prima para lograr cualquier desarrollo comercial, se dedicó a explorar alternativas por síntesis química para obtener la biomasa suficiente de

compuestos bioactivos. La cuarta sección se dedicó a mostrar métodos biotecnológicos alternativos a la síntesis química, que nos permiten hoy en día obtener compuestos bioactivos en el orden de los multigramos con mayor facilidad y control y más baratos que por los métodos de síntesis.

SECCIÓN 1

Descubrimiento de sustancias de origen natural.

*Nuevos protocolos de separación y análisis
y tendencias de aprovechamiento*

Agro, farma y metabolitos secundarios: algo en común

José Hipólito Isaza Martínez¹

Resumen

Se presenta una visión acerca de “las tendencias y futuro de la investigación en productos naturales en Colombia”, presentando una comparación entre el desarrollo histórico de la farmacéutica y la agroquímica con relación a la especialidad en productos naturales o metabolitos secundarios, sin pretender ser una revisión exhaustiva. Se abordaron tangencialmente los tópicos: interacción entre los grupos interdisciplinarios, prioridades de investigación, fuentes de financiamiento y una agenda para los próximos cinco años, haciendo énfasis en la necesidad de ampliar el rango de fuentes de metabolitos secundarios de origen vegetal a todas las fuentes disponibles en los otros reinos y una mirada hacia las oportunidades que brindan las aplicaciones agroquímicas.

Palabras clave: productos naturales, metabolitos secundarios, farmacéuticos, agroquímicos, aleloquímicos.

Abstract

A vision is presented about “trends and future of research in natural products in Colombia”, showing a comparison between the historical development of the pharmaceuticals and agrochemicals with regard to the specialized area in natural products or secondary metabolites, without claiming to be a comprehensive review. Tangentially addressed the topics: interaction between interdisciplinary groups, research priorities, funding sources and an agenda for the next 5 years, emphasizing the need to broaden the range of sources of secondary metabolites from plant origin to all

¹ Grupo Polifenoles UTP-CENIVAM, Escuela de Química, Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, A.A. 097 Pereira. Correo electrónico: jhisaza@gmail.com

available sources in the other kingdoms and a look toward the opportunities offered by agrochemical applications.

Key words: natural products, secondary metabolites, pharmaceuticals, agrochemicals, allelochemicals.

Introducción

Es un honor atender la gentil invitación de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Asociación Colombiana de Facultades de Ciencias a participar en el Seminario Internacional de la Ciencia en la sección “tendencias y futuro de la investigación en productos naturales”. Con esta reflexión inspirada en la lectura del primer capítulo de cada uno de los textos “Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals¹” y “Biologically Active Natural Products: Agrochemicals²”, pretendo provocar sus reacciones en cuanto a la interacción entre los grupos interdisciplinarios, prioridades de investigación, fuentes de financiamiento y una agenda para los próximos cinco años.

Una corta historia

Sin cifras verificables, mi percepción acerca de la evolución de la investigación en productos naturales en Colombia ha estado sesgada hacia la fitoquímica, con un énfasis inicial hacia la búsqueda de nuevas estructuras de metabolitos secundarios de origen vegetal (Fitoquímica) y hacia la farmacognosia. La historia en la cultura occidental es similar. Desde los primeros días del conocimiento médico y farmacéutico organizado, toda la información relacionada con las drogas y su uso se denominó “materia médica”, con la mayor representación en el fármaco-botánico griego Pedanios Dioscórides³. En las culturas orientales, estos conocimientos se llamaron “medicina tradicional” china, ayurvédica o tailandesa⁴. La acumulación de conocimientos ha generado nuevos términos especializados como etnobotánica⁵, etnofarmacología⁴, etnoveterinaria⁶, farmacología y farmacognosia. En este desarrollo histórico se nota la interdisciplinariedad de la investigación en productos naturales. El conocimiento indígena en las Américas se ha ido perdiendo debido parcialmente a la falta de escritura en nuestras culturas. A propósito, esta dificultad parece reflejarse en la escasa difusión de las investigaciones, tanto en pregrado como en postgrado.

Como parte de la fitoquímica ecológica⁸, se han acuñado los términos alelopatía y aleloquímicos. La primera definida por la sociedad internacional de alelopatía (IAS) como “la ciencia que estudia cualquier proceso que

involucra, principalmente, metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos⁹. Este enfoque más reciente es el punto de encuentro con la agricultura y aumenta la interdisciplinariedad en la ciencia de los productos naturales, incluyendo profesionales de la agronomía y agroquímica.

Antes del advenimiento de la alquimia, las ayudas terapéuticas para el hombre y los animales consistían exclusivamente del uso de productos naturales en muchas diferentes formas¹⁰. A finales del siglo XIX comenzó la síntesis química para obtener agentes terapéuticos, dando origen a la química medicinal. A pesar del enorme desarrollo de la síntesis química, muchos continuaron trabajando con productos botánicos y adoptaron el término "química de productos naturales"³.

Las oportunidades para la investigación multidisciplinaria incluyen las fuerzas de la química de productos naturales, la biología celular y molecular, síntesis y química analítica, bioquímica, farmacología y la posibilidad de explotar la gran diversidad de estructuras químicas y actividades biológicas de productos naturales^{11, 12}. Nuevamente se nota de manera natural la tendencia interdisciplinaria en la ciencia de productos naturales.

Regresando a Colombia, la historia reciente muestra algunos cambios de tendencia en la investigación fitoquímica. Aunque se continúa realizando en los programas de química y farmacia en las universidades públicas, ha sido adoptada también en varias universidades privadas y en diversos programas como las licenciaturas y las tecnologías, tanto en las grandes universidades como en las de provincia. El auge de los postgrados nacionales en maestría y doctorado, junto con algunas mejoras instrumentales, ha facilitado el desarrollo de nuevos grupos de investigación interdisciplinaria, conjugando evaluación de actividades biológicas en busca de metabolitos secundarios promisorios como fármacos o cosméticos y en menor proporción como agroquímicos.

Los productos naturales se han utilizado por muchos miles de años para el beneficio de la humanidad, ya sea para alimentos, ropa, cosméticos, construcción de refugios y trampas, herramientas y armas, venenos para la caza y la pesca, como medicamentos o agentes de protección de los cultivos¹³. Cerca de la mitad de los productos farmacéuticos usados hoy son derivados de ellos. El fuerte interés en la investigación de los productos naturales se puede atribuir a varios factores, tales como necesidades terapéuticas insatisfechas, gran diversidad, tanto en estructuras químicas como en actividades biológicas de metabolitos secundarios, la utilidad de los productos naturales bioactivos como pruebas bioquímicas y moleculares, el desarrollo

de técnicas nuevas y sensibles para detectar productos naturales biológicamente activos, mejores técnicas para el aislamiento, purificación y caracterización estructural¹¹.

Una rápida búsqueda en Scopus con las palabras clave “agrochemicals” y “pharmaceuticals” desde 1980, muestra una clara dominancia de la investigación en farmacéutica (Figura 1). Esto se debe en gran parte a diferencias en precios de los productos finales. Mientras en farmacéutica se pagan altos precios por miligramos, en agroquímica se puede pagar el mismo precio o mucho menos por kilogramos.

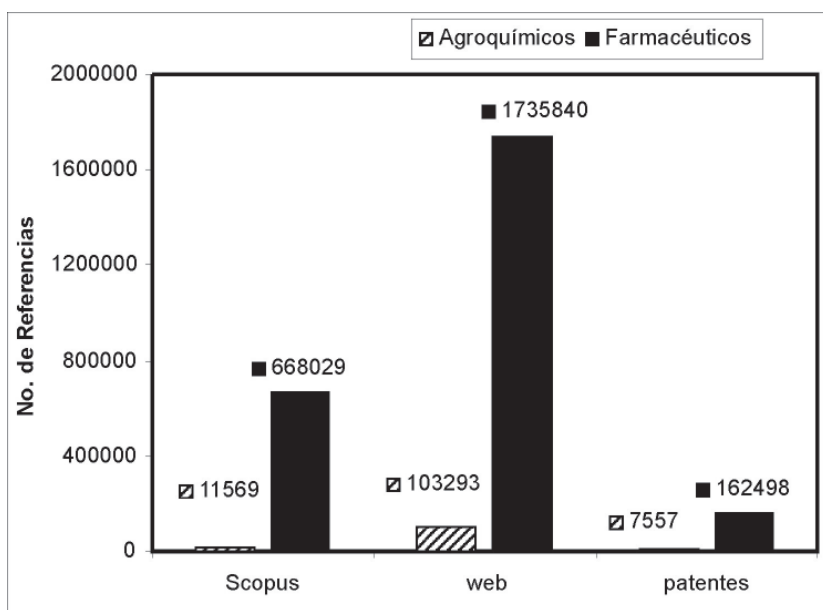


Figura 1. Resultados generales comparativos de la búsqueda en Scopus con las palabras clave “agrochemicals” y “pharmaceuticals” desde 1980.

La misma tendencia se encontró al combinar la búsqueda anterior con las palabras clave “secondary metabolites” (Figura 1-A) o “natural products” (Figura 1-B).

Tanto en agroquímicos como en farmacéuticos, el mayor número de referencias está representado en artículos de investigación. Sin embargo, difieren en las revistas de mayor publicación. Para los agroquímicos, las tres primeras publicaciones seriadas son Journal of Agricultural and Food Chemistry, Pest Management Science y Journal of Chromatography A; mientras para los farmacéuticos son Journal of Natural Products, Phytochemistry y Chemical and Pharmaceutical Bulletin.

Entre las tres primeras fuentes no referenciadas en Scopus, Drugs from Natural Products Pharmaceuticals and Agrochemicals es común tanto para agroquímicos como para farmacéuticos; Biologically Active Natural Products: Agrochemicals y Agrochemicals from Natural Products tratan de agroquímicos, mientras Biologically Active Natural Products Pharmaceuticals y Marine Biotechnology Pharmaceutical and Bioactive Natural Products son especializadas en farmacéuticos.

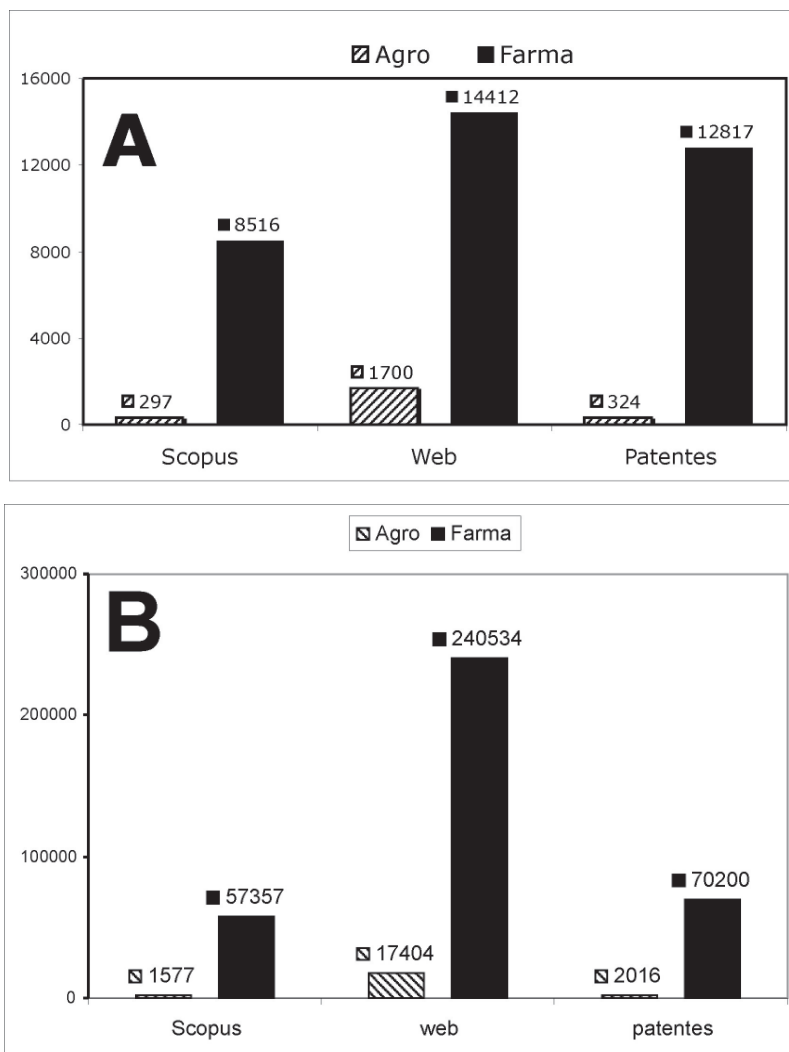


Figura 2. Resultados comparativos de la búsqueda en Scopus con las palabras clave "agrochemicals AND secondary metabolites" (A) y "pharmaceuticals AND natural products" (B) desde 1980.

Hasta aquí el predominio de la farmacéutica sobre la agroquímica tanto en el ámbito general como en el restringido a productos naturales o a metabolitos secundarios es claro. Estas dos áreas son, desde el punto de vista económico, dos de las metas posibles de la investigación en productos naturales. Aunque el mayor valor agregado favorece a la farmacéutica, las necesidades de la agricultura en cuanto a culturas ambientalmente favorables, muestran un camino promisorio hacia la segunda. Como se muestra en la figura 3, la especialidad en productos naturales apunta hacia el valor agregado a través de áreas aplicadas de la ciencia, mientras los descubrimientos de nuevos metabolitos secundarios o nuevas aplicaciones se soportan en la biología y la química de las fuentes naturales. Estas dos ciencias a su vez se soportan en los pilares de las ciencias, la matemática, la física y la filosofía.

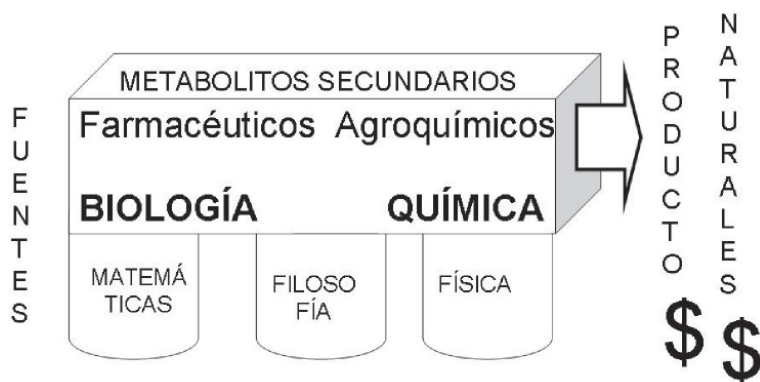


Figura 3. Relaciones interdisciplinarias de la especialidad en productos naturales desde las fuentes hasta los productos terminados con valor agregado.

Tipos de metabolitos secundarios

Los más de 200000¹⁴ metabolitos secundarios conocidos, se acostumbra agruparlos según su origen biosintético en isoprenoides (40.000 estructuras)¹⁵, acetogeninas, derivados de shikimato y compuestos de síntesis mixta. Desde el punto de vista estructural se cuentan los alcaloides (12.000 estructuras)¹⁶ y compuestos fenólicos y polifenólicos no bien contabilizados. En este respecto, la disciplina ha avanzado bastante en Colombia a pesar de las deficiencias instrumentales en la mayoría de los grupos de investigación. A este respecto propongo mayor inversión en instrumentación analítica de última tecnología con exención de impuestos. Considero preferible invertir en infraestructura para todos los programas de química y química farmacéutica en el país que en usar las pasantías de los doctorandos nacionales para el desarrollo de las tesis en otros países. La pregunta es ¿cómo conseguir la voluntad política y financiera para este propósito?

Fuentes de metabolitos secundarios

En Colombia, la principal fuente de metabolitos secundarios han sido las plantas; sin embargo, se han notado giros hacia otras fuentes como los microorganismos, los invertebrados marinos, la biotecnología o la manipulación genética.

La sistemática de los seres vivos ha evolucionado desde la organización de Aristóteles (siglo IV A.C.) en los dos reinos, animal y vegetal, a través de las agrupaciones de Linneo (1735) en los mismos reinos, Haeckel (1866) que incluye el reino protista, el sistema los cinco reinos de Whittaker (1969), hasta el sistema de dos imperios (Eukaryota y Prokaryota) y seis reinos, Animalia, Plantae, Fungi, Chromista, Protozoa y Bacteria. Igualmente, las fuentes de metabolitos secundarios se han ampliado de las plantas en los estudios fitoquímicos, hacia el aislamiento, elucidación estructural y actividad biológica de nuevos productos naturales bioactivos de todos los otros grupos de seres vivos.

Cada grupo biológico lo podemos ver al menos de dos maneras: como nuestros amigos o como nuestros enemigos. En el primer caso, pueden ser fuentes de sustancias bioactivas que nos sirvan para mejorar la calidad de vida en el ámbito de la salud (farmacéuticos) o para optimizar la producción agrícola (agroquímicos). En el segundo caso, utilizamos los metabolitos secundarios obtenidos de los primeros, para inhibir el crecimiento o aún matar a los segundos. Una utilidad adicional del segundo grupo es la búsqueda de mecanismos de acción a nivel bioquímico que nos permitan diseñar nuevos bioensayos para la búsqueda racional y de alto rendimiento de metabolitos secundarios bioactivos.

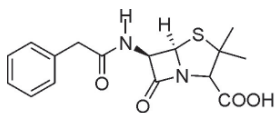
La quimiodiversidad está íntimamente relacionada con diversidad metabólica, especialmente en el metabolismo secundario. Entre más se aleja un metabolito secundario de las rutas primarias, más específico es, y por lo tanto puede ser utilizado como marcador quimiotaxonómico o como bioactivo selectivo. A la vez, el estudio de estas rutas metabólicas secundarias específicas servirá como mecanismo para el diseño de bioensayos selectivos en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas.

En Colombia y en los otros países de la comunidad andina, tenemos dificultades en la legislación (Decisión 391 del acuerdo de Cartagena, Pacto Andino). El acceso a recursos biológicos es extremadamente restringido para los investigadores nacionales. Los permisos requeridos para iniciar investigaciones que involucran colecta de material biológico, y peor si entran en la categoría de recursos genéticos, son extremadamente dispendiosos, si no imposibles de obtener. Este campo de la legislación

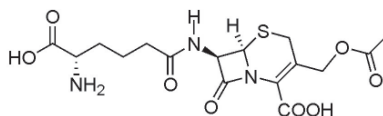
debe reevaluarse en aras de facilitar los trabajos iniciales en la investigación en productos naturales. Desafortunadamente, este trabajo tiene que hacerse en común acuerdo con los otros países del Pacto Andino.

El activo y diverso metabolismo secundario de los hongos filamentosos¹⁷ y levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, conocidos por el impacto sobre nuestras vidas como patógenos, involucrados en el deterioro de los alimentos o contaminación con toxinas y también por su amplio uso en biotecnología para la producción de bebidas, productos químicos, farmacéuticos y enzimas, les confiere gran quimiodiversidad. Esto hace de estos microorganismos una interesante fuente de materias primas (metabolitos secundarios) para las industrias, tanto farmacéuticas como agroquímicas y de alimentos¹⁸. Los microorganismos terrestres son una abundante fuente de sustancias bioactivas estructuralmente diversas, y han proporcionado importantes contribuciones al descubrimiento de agentes antibacterianos incluidos penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas y policétidos¹⁹.

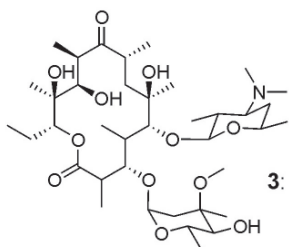
El descubrimiento por casualidad de la penicilina G (**1**) en cultivos de *Penicillium notatum* por Alexander Fleming en 1928 y su introducción en 1941/42 como un eficiente antibacterial revolucionó la química medicinal y la investigación farmacéutica. Los microorganismos no se conocían como fuentes de metabolitos secundarios con aplicación medicinal²⁰. La cefalosporina C (**2**) aislada por Brotzu en 1945 de *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*) dio origen a varias generaciones de derivados semisintéticos³. La eritromicina (**3**), un antibiótico macrólido, fue aislada en 1952 de *Streptomyces erythreus* (*Sacharopolyspora erythreus*) y se comercializó inicialmente como eritomicina A con pequeñas cantidades de eritomicinas B y C. El gran número de centros asimétricos dificulta, si no imposibilita, su producción por vía sintética. Otro grupo de antibióticos son las tetraciclinas, representadas por la oxitetraciclina (**4**), aislada en 1948 de *Streptomyces aureofaciens*.



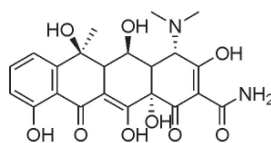
1: Penicilina G



2: Cefalosporin C

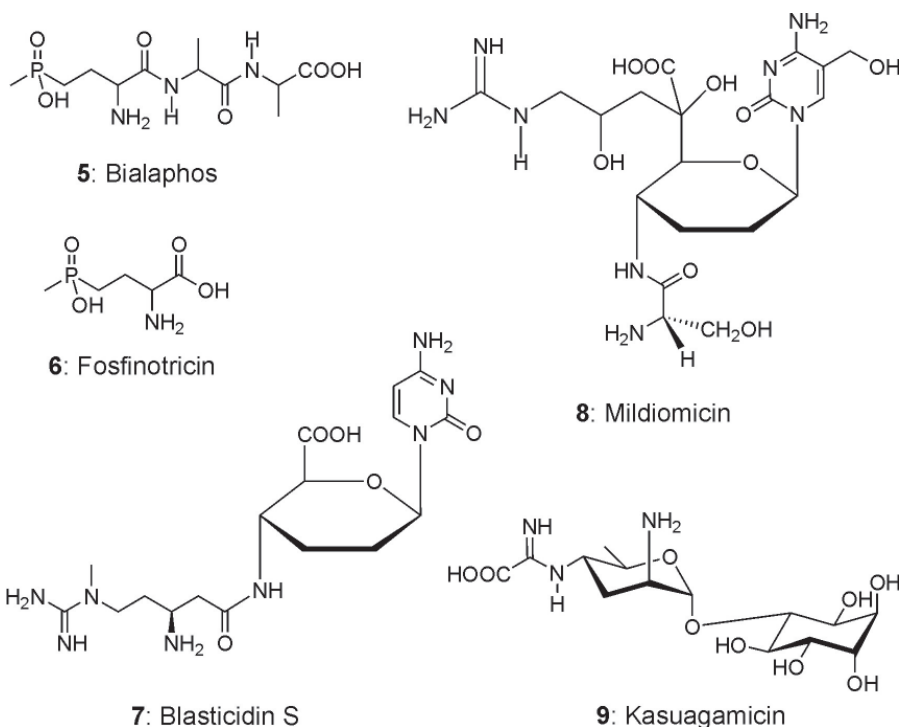


3: Eritromicina

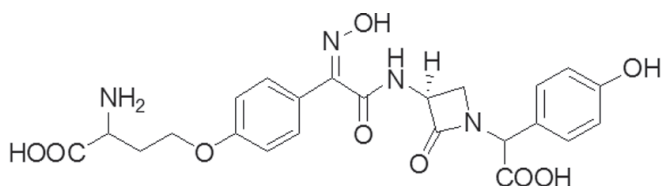


4: Oxitetraciclina

Algunos metabolitos secundarios de hongos también han logrado una posición en el comercio de agroquímicos. Durante 1971, dos grupos independientes descubrieron el bialaphos (5) en *Streptomyces viridochromogenes*²¹ y en *S. hygroscopicus*²². Sus actividades antigúngica contra *Botrytis cinera* y antibacterial de amplio espectro se asignaron al L-fosfinotricin (6), el cual fue desarrollado luego como herbicida comercial por vía sintética como la sal de amonio de la mezcla DL-fosfintricin (Glufosinato)²³. Otro es el caso de Blasticidin-S (7), aislado del actinomiceto del suelo *Streptomyces griseochromogenes* Fukunaga en 1955, por Fukunaga, y más tarde por Takeuchi en 1958. Sus propiedades fungicidas fueron descritas por primera vez por Misato en 1959. En general, se vende como sal del ácido bencilamino bencenosulfónico. Milidiomicin (8) y Kasugamicina (9) fueron aislados de *Streptoverticillium rimofaciens* y *Streptomyces kasugaensis* respectivamente y son usados como fungicidas en agricultura¹³.



Las bacterias, por ejemplo del género *Nocardia*, también han servido como fuentes de metabolitos secundarios. Igual que en las otras fuentes, la tendencia metodológica es hacia el fraccionamiento guiado por bioensayo. Así se aislaron los nuevos sideroforos, nocardimicin A (5)²⁴ a H, aislados de *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis*, como principios activos inhibidores de receptores muscarínicos^{25, 26}.



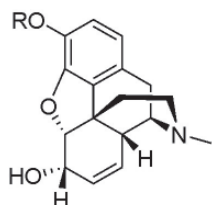
10: Nocardicin A

La proteína Harpin, producida por *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow, la bacteria que causa la enfermedad de fuego bacteriano en manzanas y peras, es un ejemplo de producto natural bacteriano que ha alcanzado el mercado de agroquímicos. Harpin es un ácido, estable al calor, con una masa molecular de aproximadamente 40 kD. Es producida comercialmente en una cepa debilitada de *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers. Esta proteína no actúa directamente sobre el organismo patógeno, sino que activa un mecanismo de defensa de la planta huésped, denominado resistencia sistémica adquirida¹³.

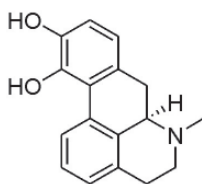
Cyanovirin N es una proteína aislada de la bacteria *Nostoc ellipsosporum*, la cual exhibe actividad antiviral mediada por gp120; es otro ejemplo de metabolito secundario de origen bacteriano^{27, 28}.

La manipulación genética de plantas y microorganismos²⁹ es otra tendencia en la búsqueda de fuentes de metabolitos secundarios, bien sea para mejorar rasgos agronómicos, como la tolerancia a los herbicidas y/o la resistencia a los insectos o dirigidas a alterar las vías metabólicas que lleven a una mejora nutricional y/o características de salud, como el arroz que contiene beta-caroteno, la soya con mayor contenido de ácido oleico, o de tomate con una mayor concentración de flavonoides³⁰.

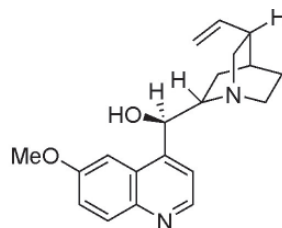
Las plantas siguen siendo la única fuente económica para la producción de compuestos como la morfina (**11**) y la codeína (**12**) obtenidos de *Papaver somniferum*, debido a su complejidad química; lo que hace la síntesis de novo difícil y costosa. Gran parte de la investigación se ha orientado hacia la comprensión de la biosíntesis y la manipulación de plantas para aumentar la producción de los principales metabolitos secundarios¹⁶. La apomorfina (**13**), un derivado de codeína, ha sido recientemente aceptada, como medicamento. Otros alcaloides también han llegado a convertirse en productos farmacéuticos; algunos ejemplos son la quinina (**14**) de la corteza de *Cinchona succirubra* Pavon et Klitzsch, atropina (**15**) de *Atropa belladonna*, tiotropium (**16**) un derivado de atropina, reserpina (**17**) de *Rawolfia serpentina* (Linné) Benthams, vincristina (**18**), vinblastina (**19**) de *Catharantus roseus* G. Don y galantamina (**20**) de *Galanthus nivalis*¹⁹.



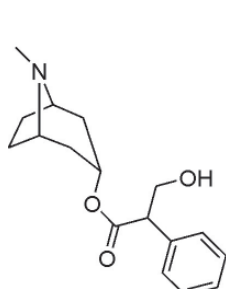
11: R= H Morfina
12: R= CH₃ Codeína



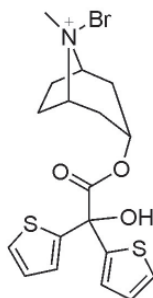
13: Apomorfina



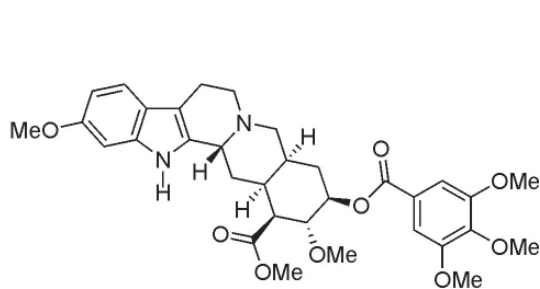
14: Quinina



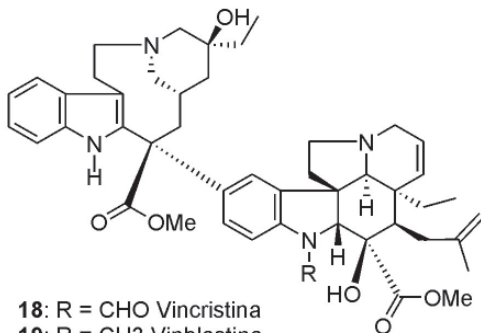
15: Atropina



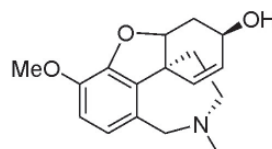
16: Tiotropium



17: Reserpina

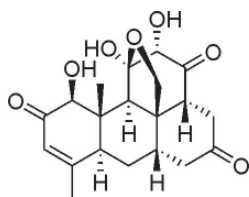
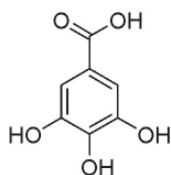
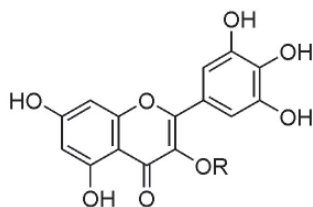
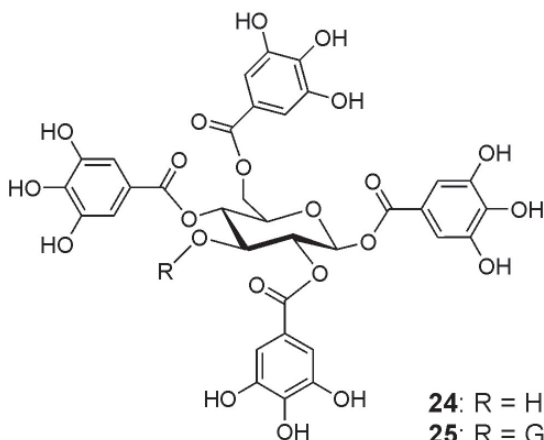
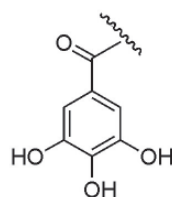


18: R = CHO Vincristina
19: R = CH₃ Vinblastina



20: Galantamina

A pesar del interés en aumento por los productos naturales para el control de plagas en agroecosistemas, muy pocos se han desarrollado comercialmente. Extractos de plantas o aceites esenciales con actividad alelopática in Vitro o en materas e incluso en invernadero han sido algunos de los avances en esta área; sin embargo, ningún metabolito secundario puro ha sido desarrollado como herbicida comercial. Algunos ejemplos de aleloquímicos de origen vegetal incluyen ailantona (**21**) obtenida de *Ailanthus altissima*³¹, ácido gálico (**22**), los flavonoides myricetin (**23**) y myricitrin (**24**), tetragaloilglucosa (**25**) y pentagaloilglucosa (**26**) obtenidos de *Nimpha odorata* mediante aislamiento guiado por bioensayo³².

**21:** Ailanthona**22:** Acido gálico**23:** R = H Myricetin**24:** R = Rha Myricitrin**24:** R = H 2,3,4,6-tetragaloilglucosa**25:** R = Galoil Pentagaloilglucosa

Galoil

Los actinomicetos marinos son una prolífica fuente infraexplotada para producir diferentes tipos de nuevos metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas y potencial para ser desarrollados como agentes terapéuticos³³. Los actinomicetos del suelo han sido importantes fuentes de antibióticos, pero fueron casi abandonadas en los últimos años en favor de objetivos de alto rendimiento basados en la selección de las bibliotecas químicas³⁴.

Los cultivos de células vegetales están siendo considerados como una alternativa a los procesos agrícolas para la producción de fitoquímicos valiosos. Dado que muchos de estos productos (metabolitos secundarios) se obtienen mediante extracción directa de vegetales cultivados en el hábitat natural, existen varios factores que pueden alterar su rendimiento³⁵.

Los cultivos de tejidos vegetales representan una potencial fuente de valiosos metabolitos secundarios, los cuales pueden ser usados como aditivos en alimentos, farmacéuticos y nutraceuticos. La síntesis de fitoquímicos por cultivo de tejidos en contraste con aquellos en las plantas es independiente de las condiciones ambientales y las fluctuaciones de calidad. En

muchos casos, la síntesis química de metabolitos no es posible o es económicamente irrealizable. Aún más, los aditivos para alimentos naturales son mejor aceptados por los consumidores en contraste con aquellos producidos artificialmente^{36, 37}.

Las esponjas marinas son conocidas por producir una inmensa variedad de metabolitos secundarios con potencial farmacéutico³⁸ como el macrólido halicondrin B obtenido inicialmente de la esponja *Halichondria okadae*³⁸. Las posibles aplicaciones de los invertebrados marinos no se limitan a los productos farmacéuticos³⁹, sino que incluyen cementos marinos, biominerales y compuestos antiincrustantes⁴⁰.

Animales marinos invertebrados como esponjas, gorgonias, tunicados y briozoos son fuentes de productos naturales biomédicamente importantes. Ahora hay abundantes pruebas que sugieren que una parte importante de los metabolitos bioactivos pensados originalmente para ser productos de origen animal suelen ser sintetizados por su microbiota simbiótica. Varios metabolitos de esponjas marinas de lucha contra el cáncer han progresado a estudios pre-clínicos o fases de juicio, como discodermolido, halicondrin B y bryostatin, se consideran los productos derivados de consorcios microbióticos⁴¹.

Los puntos en común

Luego de este breve recorrido por la ciencia de los productos naturales, podemos concluir que aunque ha habido mayor enfoque hacia las necesidades farmacéuticas, la agroquímica también es beneficiaria de las mismas fuentes, los mismos tipos de metabolitos secundarios y varios aspectos metodológicos. En la visión farmacéutica de Paracelso, las actividades de los metabolitos secundarios se mueven entre el remedio y el veneno, con una línea divisoria: la dosis¹. Los potenciales productos naturales agroquímicos, los aleloquímicos, también actúan entre herbicidas y fitohormonas que difieren en la concentración (dosis)⁴². Como prioridades de investigación, se requieren estudios de absorción, metabolismo, distribución y excreción (farmacocinética)^{43, 44}, relaciones estructura-actividad (farmacodinámica)^{45, 46}. Está bien la tendencia en la búsqueda de valor agregado, pero manteniendo el equilibrio con la ética, la rigurosidad científica y el respeto por los posibles beneficiarios. Se requiere mejorar y optimizar la financiación de los recursos instrumentales de última tecnología para mejorar la formación de los jóvenes recursos humanos (la verdadera capacidad tecnológica) en el país y para la competencia internacional. Con esta agenda, en el corto lapso de cinco años, debe ser posible concretar la tan anhelada conexión "Productos Naturales, Ciencia, Tecnología e Industria",

tanto en el área farmacéutica como en las de agroquímica, alimenticia y cosmética. Aunque se ha avanzado en el uso de bioensayos para selección preliminar, se requiere la estandarización y validación de bioensayos especializados con organismos inferiores, sistemas celulares y subcelulares aislados, órganos de vertebrados aislados y modelos animales completos. Finalmente, es necesario un gran trabajo en la estandarización y validación de técnicas analíticas y biológicas para el control y aseguramiento de la calidad en cada etapa de los procesos de fabricación de productos basados en la biodiversidad.

Referencias

1. Wedge DE, Camper ND. 2000. Connetions between Agrochemicals and Pharmaceuticals. In: Cutler SJ, Cutler HG. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*. Boca Raton: CRC Press p. 1-15.
2. Cutler SJ, Cutler HG. 1999. Agrochemicals and Pharmaceuticals: The Connection. In: Cutler SJ, Cutler HG. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Boca Raton: CRC Press p. 1-14.
3. Robbers JE, et al. 1996. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. 1 Ed. Baltimore: Williamas & Wilkins 337 p.
4. Pratchayasakul W, et al. 2008. Ethnobotany & Ethnopharmacology of Tabernaemontana Divaricata. *Indian J Med Res* 127(4): 317-335.
5. AU DT, et al. 2008. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Used by Hakka in Guangdong, China. *J Ethnopharmacol* 117(1): 41-50. S0378-8741(08)00034-2 [pii] 10.1016/j.jep.2008.01.016
6. Antoine-Moussiaux N, et al. 2007. Tuareg Ethnoveterinary Treatments of Camel Diseases in Agadez Area (Niger). *Trop Anim Health Prod* 39(2): 83-89.
7. Bruneton J, 2001. *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. 2 Ed. Zaragoza: Acribia, S. A. 1099 p.
8. Macias FA, et al. 2007. Evolution and Current Status of Ecological Phytochemistry. *Phytochemistry* 68(22-24): 2917-2936. S0031-9422(07)00602-4 [pii] 10.1016/j.phytochem.2007.10.010
9. Macias FA, et al. 1999. Terpenoids with Potential Use as Natural Products. In: Cutler SJ, Cutler HG. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Boca Raton: CRC Press p. 15-31.
10. Kieslich K. 1986. Production of Drugs by Microbial Biosynthesis and Biotransformation. Possibilities, Limits and Future Developments (1st Communication). *Arzneimittelforschung* 36(4): 774-778.

11. Clark AM, 1996. Natural Products as a Resource for New Drugs. *Pharm Res* 13(8): 1133-1144.
12. Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 564-582.
13. Copping LG, Duke SO. 2007. Natural Products That Have Been Used Commercially as Crop Protection Agents. *Pest Management Science Pest Manag Sci* 63: 524-554. 10.1002/ps.1378.
14. Tulp M, Bohlin L. 2005. Rediscovery of Known Natural Compounds: Nuisance or Goldmine? *Bioorg Med Chem* 13(17): 5274-5282.
15. Bohlmann J, Keeling CI. 2008. Terpenoid Biomaterials. *Plant J* 54(4): 656-669.
16. Liscombe DK, Facchini PJ. 2008. Evolutionary and Cellular Webs in Benzyloisoquinoline Alkaloid Biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 19(2): 173-180.
17. Shwab EK, Keller NP. 2008. Regulation of Secondary Metabolite Production in Filamentous Ascomycetes. *Mycol Res* 112(Pt 2): 225-230.
18. Smedsgaard J, Nielsen J. 2005. Metabolite Profiling of Fungi and Yeast: From Phenotype to Metabolome by Ms and Informatics. *J Exp Bot* 56(410): 273-286.
19. Chin YW, et al. 2006. Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal* 8(2): E239-E253.
20. Grabley S, Thiericke R. 1999. The Impact of Natural Products on Drugs Discovery. In: Grabley S, Thiericke R. (eds.). *Drug Discovry from Nature*. Berlin: Springer, p. 3-37.
21. Bayer E, et al. 1972. [Metabolic Products of Microorganisms. 98. Phosphinothricin and Phosphinothricyl-Alanyl-Analine]. *Helv Chim Acta* 55(1): 224-239. 10.1002/hlca.19720550126.
22. Kondo Y, et al. 1973. Studies on a New Antibiotic Sf-1293.I. Isolation and Physico-Chemical and Biological Characterization of Sf-1293 Substance. *Sci.Reports of Meiji Seika Kaisha* 13: 34-41.
23. Hoagland RE. 1999. Biochemical Interactions of the Microbial Phytotoxin Phosphinothricin and Analogs with Plants and Microbes. In: Cutler HG, Cutler SJ. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Boca Raton: CRC Press p. 107-125.
24. Gunsior M, et al. 2004. The Biosynthetic Gene Cluster for a Monocyclic Beta-Lactam Antibiotic, Nocardicin A. *Chem Biol* 11(7): 927-938. 10.1016/j.chembiol.2004.04.012. S1074552104001607 [pii]

25. Ikeda Y, et al. 2005. Nocardimicins a, B, C, D, E, and F, Siderophores with Muscarinic M3 Receptor Inhibiting Activity from *Nocardia* Sp. Tp-A0674. *J Nat Prod* 68(7): 1061-1065.
26. Ikeda Y, et al. 2005. Nocardimicins G, H and I, Siderophores with Muscarinic M3 Receptor Binding Inhibitory Activity from *Nocardia* Nova Jcm 6044. *J Antibiot (Tokyo)* 58(9): 566-572.
27. Boyd MR, et al. 1997. Discovery of Cyanovirin-N, a Novel Human Immunodeficiency Virus-Inactivating Protein That Binds Viral Surface Envelope Glycoprotein Gp120: Potential Applications to Microbicide Development. *Antimicrob Agents Chemother* 41(7): 1521-1530.
28. Dey B, et al. 2000. Multiple Antiviral Activities of Cyanovirin-N: Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gp120 Interaction with Cd4 and Coreceptor and Inhibition of Diverse Enveloped Viruses. *Journal of Virology* 74(10): 4562-4569.
29. Demain AL, Adrio JL. 2008. Strain Improvement for Production of Pharmaceuticals and Other Microbial Metabolites by Fermentation. *Prog Drug Res* 65: 251, 253-289.
30. 2008. Safety and Nutritional Assessment of Gm Plants and Derived Food and Feed: The Role of Animal Feeding Trials. *Food Chem Toxicol* 46 Suppl 1: S2-70.
31. Heisey RM. 1999. Development of an Allelopathic Compound from Tree-of-Heaven (*Ailanthus Altissima*) as a Natural Product Herbicide. In: Cutler HG, Cutler SJ. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Boca Raton: CRC Press p. 57-68.
32. Elakovich SD, et al. 1999. Phytochemical Inhibitors from the Nymphaeaceae: *Nymphaea Odorata* and *Nuphar Lutea*. In: Cutler HG, Cutler SJ. (eds.). *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. Boca Raton: CRC Press p. 49-56.
33. Jegorov A, et al. 2006. Nonribosomal Cyclic Peptides: Specific Markers of Fungal Infections. *J Mass Spectrom* 41(5): 563-576.
34. Baltz RH. 2008. Renaissance in Antibacterial Discovery from Actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol*.
35. Srivastava S, Srivastava AK. 2007. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27(1): 29-43.
36. Smetanska I. 2008. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.
37. Sivakumar G. 2006. Bioreactor Technology: A Novel Industrial Tool for High-Tech Production of Bioactive Molecules and Biopharmaceuticals from Plant Roots. *Biotechnol J* 1(12): 1419-1427.

38. Sipkema D, et al. 2005. Large-Scale Production of Pharmaceuticals by Marine Sponges: Sea, Cell, or Synthesis? *Biotechnol Bioeng* 90(2): 201-222.
39. Muller WE, et al. 2004. Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part I-the History: Sustainable Exploitation of Biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic Sea in Rovinj (Croatia). *Evid Based Complement Alternat Med* 1(1): 71-82.
40. Liebezeit G. 2005. Aquaculture Of "Non-Food Organisms" For Natural Substance Production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 97: 1-28.
41. Dunlap WC, et al. 2007. Biomedicinals from the Phytosymbionts of Marine Invertebrates: A Molecular Approach. *Methods* 42(4): 358-376.
42. Macias FA, et al. 2007. Allelopathy—a Natural Alternative for Weed Control. *Pest Manag Sci* 63(4): 327-348. 10.1002/ps.1342.
43. Saunders M, Kohn LM. 2008. Host-Synthesized Secondary Compounds Influence the in Vitro Interactions between Fungal Endophytes of Maize. *Appl Environ Microbiol* 74(1): 136-142. AEM.01538-07 [pii]. 10.1128/AEM.01538-07
44. Dietrich DR, et al. 2008. Toxin Mixture in Cyanobacterial Blooms—a Critical Comparison of Reality with Current Procedures Employed in Human Health Risk Assessment. *Adv Exp Med Biol* 619: 885-912.
45. Ni X, et al. 2008. Insect-Attracting and Antimicrobial Properties of Antifreeze for Monitoring Insect Pests and Natural Enemies in Stored Corn. *J Econ Entomol* 101(2): 631-636.
46. Kong CH, et al. 2008. Fate and Impact on Microorganisms of Rice Allelochemicals in Paddy Soil. *J Agric Food Chem* 56(13): 5043-5049. 10.1021/jf8004096.

COMENTARIOS AL TRABAJO DEL PROFESOR ISAZA

En esta conferencia el profesor José Hipólito Isaza, de la Universidad Tecnológica de Pereira, llamó la atención hacia extender los campos de acción de la fitoquímica (estudio de la composición química de las plantas) en Colombia. La mayoría de los grupos de investigación hace y ha hecho durante largos años, ya casi 30, aislamiento y caracterización estructural de compuestos de plantas, y solo desde hace unos 15 se han venido incorporando los bioensayos a los planes del conocimiento químico de las especies con el objeto de establecer su potencial de aplicación y por lo tanto su valor económico. Al igual que la mayoría de los grupos en el mundo, en Colombia nuestros investigadores también dedican casi todo su tiempo al estudio de las plantas terrestres, particularmente hacia la caracterización de compuestos con miras a su aplicación en el campo farmacéutico. Por esta razón, en esta conferencia se llamó la atención hacia investigar también las plantas con el objeto de buscar otras aplicaciones, entre ellas hacia el uso de compuestos naturales como agroquímicos.

También se mencionó, además de los cambios de tendencia en la investigación fitoquímica, que aunque ésta se continúa realizando en los programas de química y farmacia de las universidades públicas, también ha sido adoptada en varias universidades privadas y en diversos programas como las licenciaturas y las tecnologías, con lo cual se prevee suficiente espacio académico-investigativo para tratar otros temas de importancia en el estudio de productos naturales. Así mismo se mencionó la influencia que ha tenido el auge de los postgrados nacionales en maestría y doctorado, junto con las mejoras en infraestructura física, lo cual ha facilitado el desarrollo de nuevos grupos de investigación interdisciplinaria, conjugando evaluación de actividades biológicas en busca de metabolitos secundarios promisorios como fármacos o cosméticos y en menor proporción como agroquímicos.

Finalmente, se vuelve a hacer énfasis en que está bien la tendencia en la búsqueda de valor agregado de las especies vegetales en Colombia, pero manteniendo el equilibrio con la ética, la rigurosidad científica y el respeto por los posibles beneficiarios.

Searching for antiparasitic agents: from the empiric screening of natural products to the investigation of traditional medicinal plants

Alaíde Braga de Oliveira¹

Abstract

New drugs are needed for tropical diseases which are included among the neglected diseases (DND). Many approaches to drug discovery are available and for antiparasitic drug it must be taken into account specific concerns, in particular the requirements for very inexpensive therapies and the need to limit the cost of drug discovery. Screening natural products represent a valuable and effective strategy in the search for antiparasitic drugs and, for screening plant extracts, the selection of plants according to ethnopharmacological use is recommended. The classical methods of screening plant extracts, natural products and synthetic chemicals in parasite cultures and parasite-infected animal models, although laborious and time consuming, are of relatively low costs and can disclose new leads for drug development. Another important and current approach is the investigation of traditionally used plant medicines aiming to develop effective and safe phytotherapeutics (phytomedicines). Some of these issues, with results of the researches carried on by the author, are reported in this paper.

Key words: Neglected diseases; Natural Products; Medicinal Plants; Bioprospection; Drug Development; Trypanosomicidal Activity; Antimalarial Activity; Anti-*Toxoplasma gondii* Activity.

Introduction

Infectious diseases are a major threat to humans throughout the world and kill 14 million people each year. More than 90% of these deaths occur in developing countries. Even so, there is a limited number of drugs for the therapy or

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

prophylaxis of protozoan diseases (Troullier et al., 2001; Morel, 2003). Most of the available antiparasitic drugs were all discovered via an empirical approach and the mode of action of many of them remains unknown. However, a rational approach is presently attractive to pharmaceutical companies because it promises to accelerate the drug discovery process although it is more expensive and requires high initial investment in resources to provide availability of validated targets and appropriate assay methodology with purified functional enzymes or receptors (Gutteridge, 1997).

By the end of the XX century, new classes of antiprotozoal drugs have been developed. Nevertheless, major problems remained and for some parasitic diseases the situation was worst than at the middle of this century. While marked advances are taking place in the development of drugs and vaccines for bacterial, fungal and viral diseases, the discovery of new drugs for parasitic diseases progressed relatively slowly. As a consequence, human parasitoses (toxoplasmosis; leishmaniasis; malaria; giardiasis; strongyloidiasis; scabies) re-emerged (Trouiller et al., 2001) and there is a need for intensive research on antiparasitic drug discovery. Malaria is the best example, in this respect: the advent of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* has resulted in a major health problem (Croft and Sutherland, 2002; Ambroise-Thomas, 2000).

Empirical lead discovery is associated with mass-volume screening of compounds available regardless of their chemical structure. It is an expensive approach which has become possible by a combination of combinatorial synthesis and the robotics techniques (HTS) (Hudson, 1994). The rational approach requires the identification of a key biochemical metabolic feature unique and vital to the parasite. Knowledge of the parasite receptor or enzyme will allow the design of novel ligands and the uncovering of new leads (Douglas, 1994).

During the last decades of the XX century, the drug design was born and the so called rational approach is presently widely exploited. The theory is well established and supported by new methodologies. It was expected that the advances in the life sciences that allowed the identification of parasite targets, the progress in combinatorial chemistry, where thousands of compounds can be readily synthesized, coupled to the High Throughput Screening (HTS) techniques would revolutionize the development of antiparasite drugs. Unfortunately, until now, no antiparasitic drug resulted from this approach although computer modelling is being more and more used to identify how existing drugs can function and for studies on target inhibitors that could provide new leads (Hudson, 1994; Gutteridge, 1997).

Infectious diseases are considered “neglected” as there is a lack of effective and affordable drugs for treatment and they are often referred to as

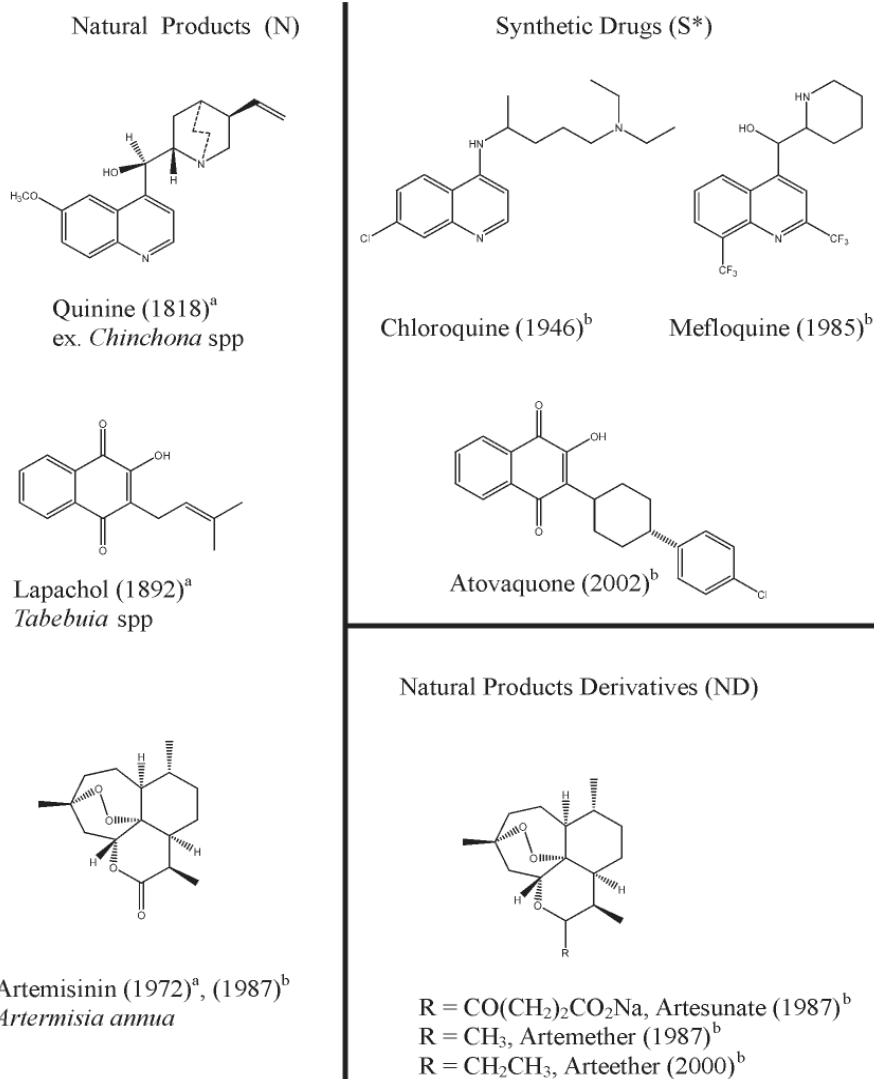
tropical diseases, endemic diseases, diseases of the poor or orphan diseases (Ridley, 2003). This group includes diseases such as malaria, tuberculosis, African trypanosomiasis (sleeping sickness), American trypanosomiasis (Chagas' disease), dengue, leishmaniasis, schistosomiasis, and lymphatic filariasis. As most patients with such diseases live in developing countries and are too poor to pay for drugs, the pharmaceutical industry has traditionally ignored these diseases. The net effect is that only 10% of global R&D resources are directed at diseases accounting for 90% of the global disease burden. Very few new alternatives have been developed in the last 25 years: between 1981 and 2006, 1,174 new drugs were made available to the public, but only 13 (1.1%) of these were for tropical diseases and no one has been designed totally rationally (Pécoul et al., 1999; Yamey, 2002; Ridley, 2003; Newman and Cragg, 2007). Besides, of the 13 new antiparasitic drugs approved between 1981-2006, only four are synthetic (30.8%); two are natural products, one of them being artemisinin, the active compound from the Chinese drug *Artemisia annua* (Asteraceae) and, of the rest, three are artemisinin derivatives, three are totally synthetic but the templates were active natural products, represented by quinine, for mefloquine and bulaquine, and lapachol, for atovaquone (Table 1) (Figure 1).

Table 1. Antiparastic drugs: New chemical entities approved from 1981 to 2006

Drug	Class	Introduction Year
Artemisinin	N	1987
Ivermectin	N	1987
Arteether	ND	2000
Artemether	ND	1987
Artesunate	ND	1987
Eflornithine HCl	ND	1990
Mefloquine	S	1985
Albendazole	S	1982
Halofantrine	S	1988
Lumefantrine	S	1987
Quinfamide	S	1984
Atovaquone	S*	2002
Bulaquine/chloroquine	S*	2000

N = Natural Product; N D = Natural Product Derivative; S = Synthetic Drug;

S* = Synthetic drug after an active Natural Product template (Newman & Cragg, 2007)



a: year of isolation; b: year of introduction in therapeutics; S*: natural product as template

Figure 1. Antimalarial drugs

It is widely recognized that the impact and long-term sustainability of drug R&D for tropical diseases depends heavily on the development of research capacity and the engagement of scientists and institutions in developing countries. Indeed, WHO/TDR stress this is integral to their mission, as does the newly created DNDi. Many countries, such as India, China, South Korea and South Africa, now have the ability to produce

and manufacture drugs. Many countries also have expertise in some of the individual scientific components that are required to discover and develop drugs. However, few have the capacity to perform the full spectrum of tasks required to move from early discovery research through to preclinical and clinical development, dossier preparation and registration (Nwaka and Ridley, 2003). Unfortunately, we, at the Latin American countries, are not part of this group, although, fortunately, in the last three decades, an important step forward seems to be occurring in the direction of the expected and needed engagement of scientists of developing countries. This scientific meeting, here in Bogotá, joining specialists in Parasitology and in Natural Products, is a clear evidence of this remark.

Efforts to develop new drugs have relied mainly on one of the following approaches:

1. optimization of therapy with available drugs, including the use of combined therapy;
2. synthesis of derivatives and/or analogues of existing drugs;
3. investigation of compounds that were originally developed to treat other diseases;
4. exploitation of new molecular targets (rational approach);
5. discovery of new prototype of pharmaceutical agents (lead molecules) (Rosenthal et al., 2001; 2003).

Approaches 1-3 are important but they use existing drugs as models and therefore there is an urgent need for the discovery of totally new prototype agents with possibly new mechanisms of action. The pipeline concept of drug discovery and development represented in Figure 2 shows the three basic stages: discovery, development and registration. The first step, in a drug discovery pipeline, is the identification of lead compounds showing the required biological activity that is followed by development of this lead molecule into a safe and therapeutically effective medicine. Both empirical and rational approaches can be used for drug discovery. The empirical route is traditionally associated with screening of large number of compounds (natural or synthetic) or extracts of natural origin (bioprospection of plants, insects, marine organisms, microorganisms). The goal is to identify new leads (prototypes), usually by *in vitro* assays. However, once a lead molecule has been identified, its pharmacological profile can be improved by structure modifications, and/or by the synthesis of analogs. Such process of lead optimization may, presently, follow the established rational approach if the mecha-

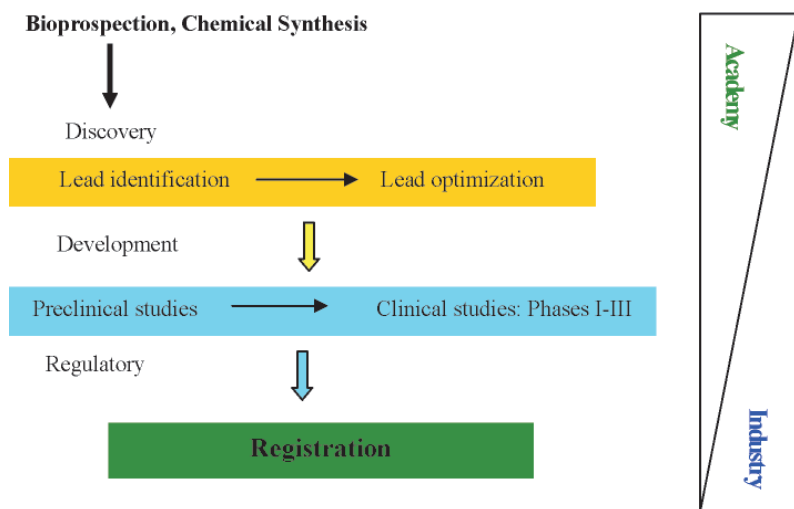


Figure 2. Pipeline concept for drug research and development (R&D)

nism of action is known. An outstanding example is atovaquone, a naphthoquinone recently introduced for treatment of malaria, whose development has had lapachol, a prenyl-hydroxynaphthoquinone, frequently found in Southamerican *Tabebuia* species (Bignoniaceae family), as a template. The antimalarial effect of the naphthoquinones, including lapachol, was demonstrated in the 1940's, by *in vivo* assays against *Plasmodium lophurae* and *P. gallinaceum*, in ducks and chicks. The synthesis and biological effects of several analogs (2-alkyl-3-hydroxynaphthoquinones), aiming to optimize the antimalarial activity and assaying against *P. berghei*-infected mice, was described in the 1980's and has resulted in a series of antiprotozoal compounds, among them atovaquone which has shown a broad spectrum of activity against *Plasmodia* species, *Pneumocystis carinii*, *Babesia* spp and *Toxoplasma gondii* (Hudson et al., 1986; Croft et al., 1992; Khan et al., 1998). In 1992, atovaquone was released for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia and, recently, for treatment and prophylaxis of malaria in combination with the biguanide proguanil (Malarone®, GlaxoSmithKline). The antimalarial activity of atovaquone is attributed to its interference with mitochondrial electron transport and it can be considered an analogue of ubiquinone. Inhibition of ubiquinone also results in inhibition of the parasitic enzyme dihydroorotate dehydrogenase which is required for *de novo* pyrimidine biosynthesis, causing parasite death because plasmodia are unable to scavenge pyrimidines for DNA synthesis (Baggish and Hill, 2002).

The search for bioactive compounds from plants traditionally used (ethnopharmacological approach) is considered a more successful strategy

(20-60% positive results) than the random selection of plants for mass screening (5% positive results) (Cordell and Colvard, 2005; Phillipson and Wrigth, 1991). Traditional plant remedies have been used to treat parasitic diseases for thousand of years and investigation of traditionally used plants afforded the two main groups of antimalarial drugs, quinine and artemisinin. Besides their relevant role as potential source of new antiparasitic drugs, traditional plant medicines are important as sustainable remedies for treatment of human parasitic diseases in tropical endemic areas. However, little is known about their efficacy and safety. Validation of traditionally used plants aiming to further research on traditional medicines for malaria is the goal of RITAM (Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods), founded in 1999. A survey of relevant articles has disclosed over 1,200 plant species used to treat malaria and fever; of which 11 species are used in three continents and only 10 controlled clinical trials are documented. RITAM'S proposed guidelines recommend to standardise and improve the quality of ethnobotanical, pharmacological, and clinical studies on herbal antimalarials (Willcox and Bodeker, 2004).

Two different approaches to the development of antiparasitic medicines from plants selected according to ethnopharmacological criteria are here considered: one explores the potential of plant species with a reputation of use in traditional medicines to yield pure active natural products, while the second one aims at the validation of traditionally used plant based medicines. In the first approach, the pure active natural product (chemical entity) would represent a new drug itself, or can be investigated as a lead to a new drug, while the second approach would lead to safe and effective phytotherapeutics (phytomedicines) (Figure 3). The registration of phytotherapeutics is under restrict regulatory requirements concerning pre-clinical and clinical investigations, in some countries, including Brasil (2004). Among the quality criteria for a phytomedicine, the standardization of extracts used in the pharmaceutical formulation is obligatory. As a consequence, the isolation and identification of bioactive plant constituents is indispensable and must be carried out since they are necessary as pharmacological markers (Figure 4).

Screening plant traditional remedies used to treat parasite diseases, by *in vitro* and *in vivo* assays, with simultaneous isolation of active compounds requires a research group including botanists, phytochemists, pharmacognosists, parasitologists and pharmacologists. The R&D costs to safe and effective phytopharmaceuticals (phytomedicines) is and less expensive than that for a single drug medicine (10-20 years, US\$800 million to 1,7 billion). Moreover, successful results will certainly lead to an impact in the conservation of biodiversity stimulating sustainable exploitation, agronomic and biotechnological research, besides contributing for the expected and desired scientific and economic development of biodiversity rich countries.

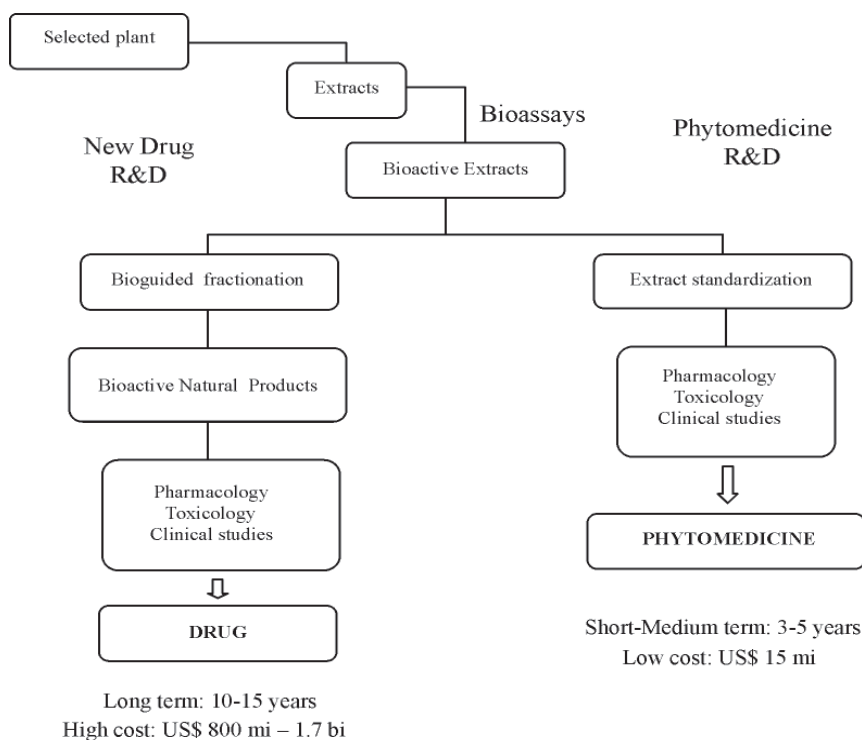


Figure 3. R&D of a drug or a phytomedicine from a traditionally used plant

Pre-clinical and clinical trials for validation of traditionally used plant remedies must be preceded by phytochemical studies aiming to afford chemical/biological markers requested for preparing safe and effective phytopharmaceuticals (phytomedicines). Application of available high-tech analytical methods, like the spectrometric hyphenated techniques, to standardize phythopreparations, before conducting systematic pharmacological and clinical investigations, will afford the quality standards required for safe and effective medicines (Hamburguer and Hostettmann, 1989; Wagner, 2004; Ulrich-Merzenich et al., 2007).

I do believe, we, scientists in Latinamerican countries, are in condition to carry on such a project: we have a rich tropical plant biodiversity, ethnopharmacological informations on their traditional use and a number, not so high, but of competent and enthusiastic scientists acting in the required areas. However, investments in basic research alone will not lead to development of new tools, including medicines, for health systems of poor countries. Disease endemic countries have to take a central role in the fight against ill health to foster their own development otherwise the gap between scientific progress and technological innovation will continue to increase (Morel, 2003).

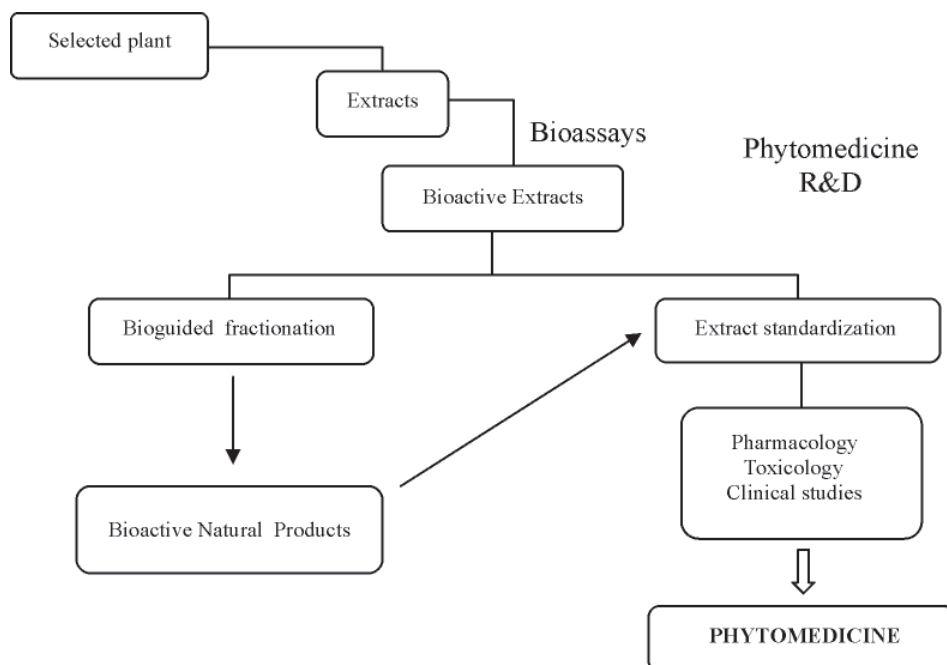


Figure 4. R&D of a phytomedicine from a standardized extract requires isolation and identification of active natural products to be used as biological markers

As a pharmacist (1963), with a doctorate degree on Chemistry of Natural Products (1967), I have started my academic career working on classical phytochemistry that led me to carry on chemical and microbial modifications of abundant natural products and total synthesis of naphthoquinones and isoflavonoids resulting in a collection of compounds, most of them of unique structural characteristics. Then, in collaboration with parasitologists, I have directed my phytochemical research interest aiming to contribute for drug research towards Chagas' disease, malaria and toxoplasmosis. The different exploited approaches, from the classical phytochemistry, through the semi-synthesis and total synthesis of bioactive natural compounds and analogs, to the bioprospection of plant extracts and the bioguided isolation of active compounds have been covered in the following topics.

I. Phytochemistry: Construction of a natural products library

I have obtained my Dotorate degree at the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brasil, under the supervision of Prof. Otto R. Gottlieb, an outstanding Brazilian phytochemist. One characteristic of the Gottlieb's Phytochemical School has

been the systematic investigation of some Brazilian plant taxa with a remarkable contribution to the knowledge on the chemistry of Brazilian flora besides his endeavour on the appraisal and rational use of natural product chemical data in plant systematics, evolution and ecology that has led him to the proposal of a novel discipline based on a methodology with parameters for correlating structural variation of secondary plant metabolites to systematics and geographical distribution (Gottlieb, 1982). At the stage of classical phytochemistry, I have concentrated my efforts on the investigation of plant species from the families Leguminosae, Icacinaceae, Bignoniaceae and Annonaceae what has led to a modest but representative library of natural products of different biogenetically origin and, consequently, of very diverse chemical structures. Attention should be called to the the studies of species belonging to the genera *Machaerium*, *Dalbergia* and *Cyclolobium* (Leguminosae-Papilionoideae) which have afforded a novel class of flavonoids, the neoflavonoids, with a 1,1-diarylpropanoid skeleton, a new type of flavonoids (1,3-diaryl propanoids), the cinnamylphenols and new types of isoflavonoids (1,2-diaryl propanoids), the isoflavans and isoflavanquinones. Figure 5 shows the structures of representative flavonoid compounds, occurring in *Dalbergia*, *Machaerium* and *Cyclolobium* species, showing their biogenetic derivation by the usual cinnamoylation route to give flavonoids and isoflavonoids and cinnamylation of a polyketide precursor, leading to neoflavonoids, cinnamylphenols and 2,3-dihydrobenzofurans (Oliveira et al., 1968a; 1968b; 1971). Since then, phytochemical studies of *Dalbergia*, a genus distributed in three continents, Asia, Africa and America, has proceeded on enriching the neoflavonoid group (Kaplan et. al., 1994; Donnely & Boland, 1995). From the exclusively American genus *Platymiscium*, as well *Myroxylon* and *Monopterix*, we have isolated several types of flavonoids and isoflavonoids (chalcone, flavanone, aurone, flavonol, isoflavone, isoflavanone, pterocarpin, coumestran, 2-arylbenzofuran) (Oliveira et al., 1970; 1972; Maranduba et al., 1979; Oliveira et al., 1978; Albuquerque et al., 1980). Cassia species (*Senna*, Leguminosae-Caesalpinoideae) afforded, as expected, anthranoids (anthraquinones and anthrones) besides stilbenes, pinitol, an unusual isobutenyl-chromone, rubrofusarin (a rare naphthopyrone) and its 6-O- β -galactosylderivative (Oliveira et al., 1977).

The antitumoral activity, of lapachol, a prenyl-naphthoquinone isolated from *Tabebuia impetiginosa*, in 1892, has driven the investigation of Bignoniaceae in the search for new biologically active constituents (Gottlieb and Mors, 1980). Novel quinones, biogenetically related to lapachol, like furanonaphthoquinones, which were firstly isolated from Brazilian *Tabebuia* species (Zani et al., 1991; Oliveira et al., 1993), were shown to be cytotoxic to human tumour cells (Kingston and Rao, 1980). However β -lapachone has deserved greater interest as antitumoral agent (Figure 6) (Pardee et al., 2002; Silva et al., 2003).

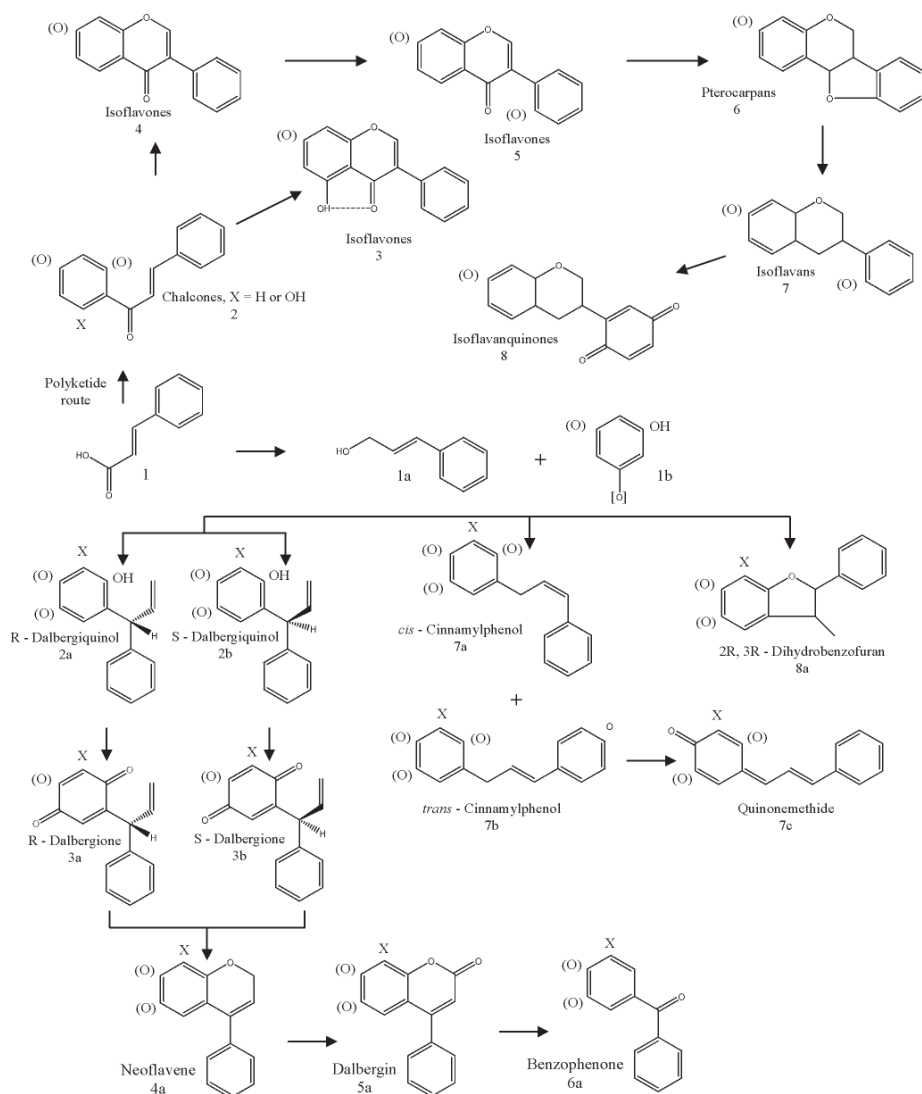
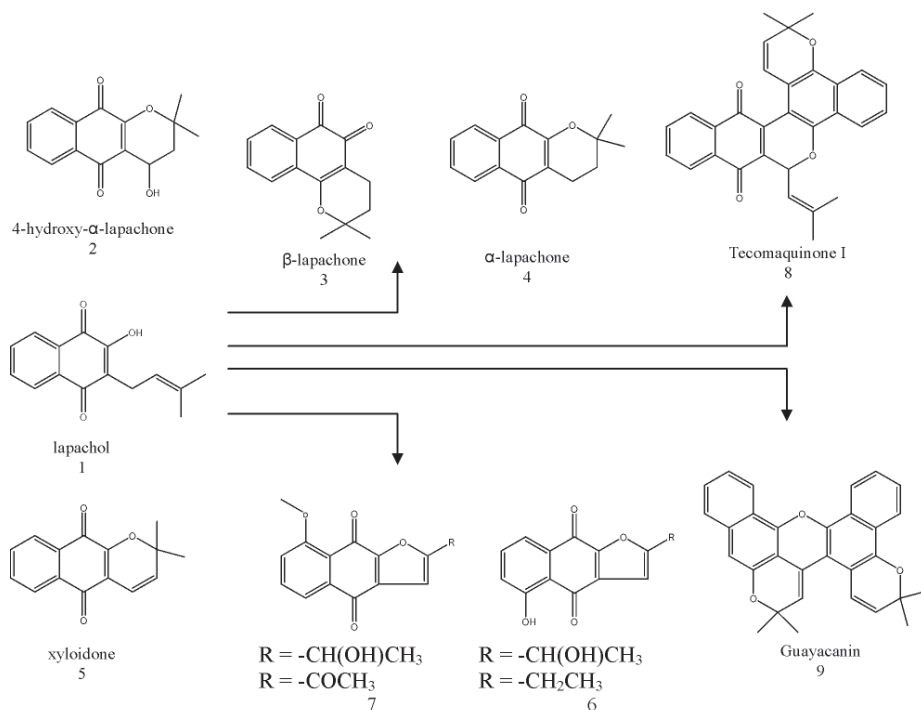


Figure 5. Possible biogenetic relationships among isoflavonoids, neoflavonoids and related natural products (X= H or OMe) (Oliveira et al., 1971)

For a long time, alkaloids have been the main class of natural products isolated from Annonaceae what can be explained by the traditional acid-base extraction methodology that facilitates their separation and purification. With the advent of more efficient chromatographic processes, more extensive phytochemical studies of this family disclosed interesting neutral alkaloids along with acetogenins that were left behind in the organic layer containing the acid unsoluble constituents, during alkaloids extraction. McLaughlin's group



1,2,4,5: ex. *Zyhyeria tuberculosa* (Weinberg et al., 1976); ex *Z. montana* (Jácome et al., 1999);
 6,8: ex. *Tabebuia incana* (Oliveira et al., 1993); 1,6,7: ex *T. ochracea* (Zani et al., 1991)

Figure 6. Naphthoquinones from Bignoniaceae biogenetically related to lapachol

at Purdue University (USA) has isolated and characterized over 200 new annonaceous acetogenins, which represents approximately one-half of these compounds that have been reported to date (Alali et al., 1999, MacLaughlin, 2008). From *Annona crassiflora* and *Xylopia frutescens* we have isolated, respectively, acetogenins (Santos et al., 1996a, 1996b) and kaurane diterpenes (Takahashi et al., 1995). *Guatteria dielsiana*, *G. Shomburgkiana* and *Annona ambotay* afforded known isoquinoline alkaloids and representative of the rare groups of azaanthracene and azafluorenone alkaloids (geovanine, dielsine, dielsinol) and dielsiquinone (Goulart et al., 1986; Oliveira et al., 1987; Tradic et al., 1987; Alves et al., 1988; Bayma et al., 1988).

II. Semi-synthesis and total synthesis of natural products and analogs: increasing a collection of unique molecules

Chemical transformation of abundant natural products, as isoflavans (Oliveira et al., 1968a; 1968b; Maranduba et al., 1979; Maranduba, 1978)

together with chemical and microbial transformation of the diterpenoid kaurenoic acid, afforded a number of unique compounds. Kaurenoic acid has been obtained in substantial quantities from *Xylopia frutescens* (Annonaceae) (Takahashi et al., 1995; Melo et al., 2001) and *Wedelia paludosa* (Asteraceae) (Silva et al., 1999; Batista et al., 1999, 2005; Vieira et al., 2002; Batista et al., 2005; 2007).

Total synthesis of isoflavonoids was carried on by three routes. 1- By the classical methodology via deoxybenzoins, we have obtained ($\pm$)-claussequinone. The (3R)-estereoisomer, named (3R)-claussequinone, was isolated firstly from *Cyclolobium* species and has had its structure confirmed by this synthesis (Oliveira et al., 1975). 2- An one-pot procedure for the synthesis of polyhydroxyisoflavones, via intermediate deoxybenzoins and its in situ cyclization (Wahälä & Hase, 1991) was employed for the synthesis of amphiphilic cationic derivatives of isoflavones and isoflavans of interest for trypanosomicidal assays (Faria et al., 2005; Faria, 1997). 3 - An alternative procedure to those via deoxybenzoins for the synthesis of isoflavones is by oxidation of chalcones with thallium (III) salts. We have obtained isomeric isoflavones by oxidation of the corresponding 2'-hydroxychalcones with thallium (III) acetate. However 2'-nitro derivatives were formed when thallium (III) nitrate was used (Oliveira et al., 1979).

For the total synthesis of furanonaphthoquinones from Bignoniaceae and analogs, a variety of methods has been explored. The synthetic strategies have included the construction of the benzenoid ring, via a Diels-Alder cycloaddition reaction (A), of the the quinonoid ring (B), and of the furano ring, in a existing 2-hydroxy-naphthoquinone (C) (Zani et al., 1994). (Figure 7). Method A, as expected, afforded mixtures of regioisomers, of difficult separation, in the case of dissimetric dienes (Corral et al., 2006). For the strategy B, we have explored the *ortho*-directed lithiation methodology, starting with N, N-diethylamides of conveniently substituted benzoic acids, by lithiation and reaction with furfural (Zani et al., 1987; Starling et al., 1998a; 1998). Strategy C afforded *ortho*- and *para*-furanonaphthoquinones (Corral et al., 2006; Oliveira, et al., 1990; Oliveira et al., 1993).

III. Screening available compounds in the search of potential drugs for Chagas' disease, malaria and toxoplasmosis

IIIA. Chagas' disease

T. cruzi is the causative agent of Chagas' disease, a major health problem in Central and South America. It is estimated that 16-18 million peo-

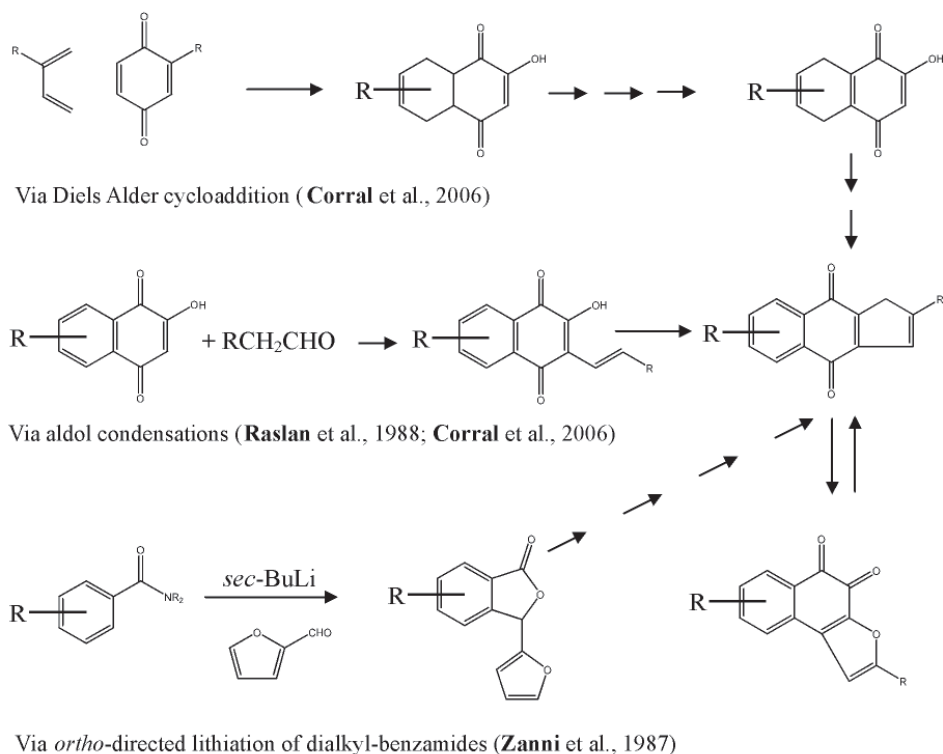


Figure 7. Strategies for the synthesis of furanonaphthoquinones

ple are infected in Latin America and 100 million are at risk of infection (Coura & Castro, 2002). Since 1975, only two drugs entered the market for treatment of Chagas' disease: benznidazole (Rochagan[®], Roche) and nifurtimox (Lampit[®], Bayer). Both drugs have significant activity in the acute phase, with about 80% parasitological cure in treated patients, but their effect in chronic patients is very low. Therefore new trypanocidal drugs are needed for both prophylaxis and therapy. The *in vitro* assay with bloodstream *T. cruzi* trypomastigotes is recommended for *in vitro* assays (Coura and Castro, 2002). The *in vitro* active compounds should be further evaluated for *in vivo* sensitivity, in mice experimentally infected with *T. cruzi*. In a rapid test, the suppressive effect on parasitaemia occurs almost immediately after administration of an effective drug and this assay would allow the selection of candidates for curative murine models of acute or chronic Chagas' disease (Filardi and Brener, 1984). A limitation to the *in vivo* evaluation of natural products is the amount of sample required for assays, about 20 mg for the rapid test (6 hours) and 500 mg for a 20 days treatment. Therefore, *in vivo* assays of natural products are restricted to abundant ones.

In a search for new trypanosomicidal agents, compounds from our collection of natural products, semi-synthetic derivatives and synthetic analogs have been evaluated for *in vitro* activity against bloodstream trypomastigote form of *T. cruzi*. A compound was considered as active when it caused complete elimination of the parasites from blood. A comprehensive review on Chagas' disease, including a survey on trypanosomicidal synthetic and natural products, was published (Coura and Castro, 2002) and only results of our group are summarized here.

The first screening of compounds from our natural products collection, at concentration of 2×10^{-3} M, revealed seven trypanosomicidal compounds six of which were flavonoids and the seventh was a sesquiterpene lactone. Three quinones were the most active causing elimination of parasites at 5×10^{-4} M (Figure 8) (Chiari et al., 1991).

We have shown that kaurenoic acid causes complete elimination of trypomastigotes from infected blood in the *in vitro* assays but lysis of erythrocytes was also observed (Batista et al., 1999). A series of derivatives of kaurenoic acid obtained by chemical and microbial transformations were assayed and *ent*-12 β -hydroxy-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid, a novel diterpene formed under the action of *Rhizopus stolonifer*, was twice more active than kaurenoic acid (Silva et al., 1999; Silva, 1999) (Figure 9). A glucosyl derivative of kaurenoic acid (C19-methylester-C17-O-glucoside) was shown to be more active and less hemolytic than kaurenoic acid when assayed *in vitro* against trypomastigotes. A remarkable profile, comparable to that one of benznidazole, a standard trypanosomicidal drug, was observed when a

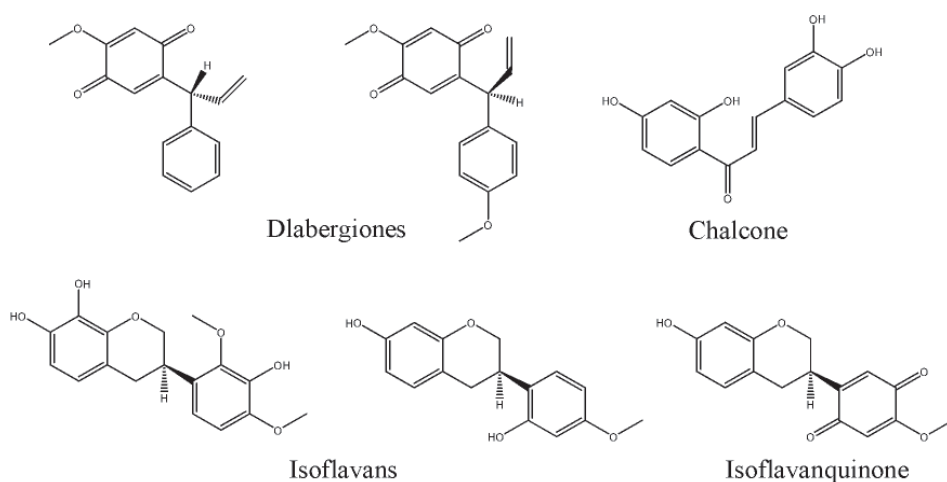
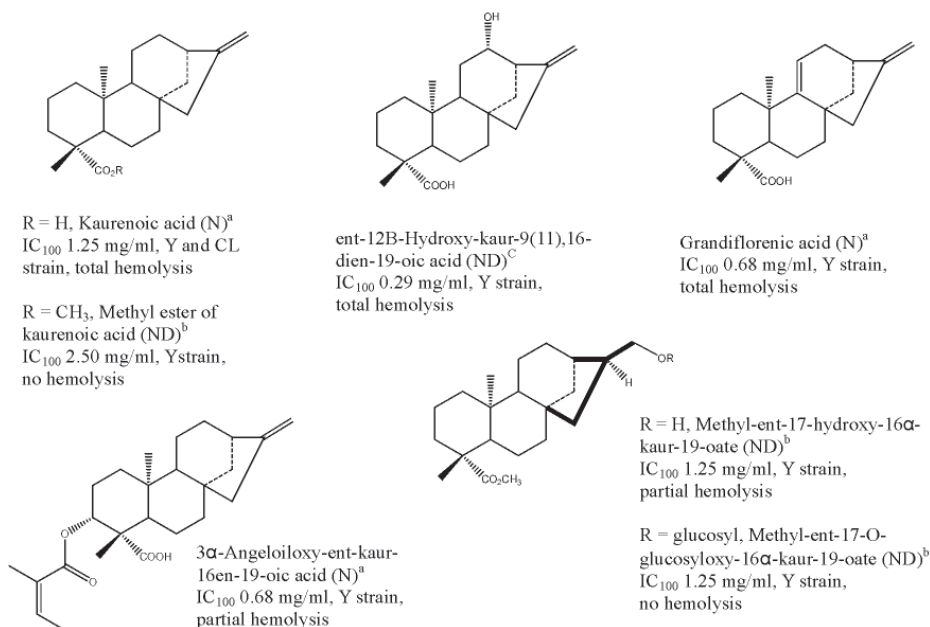


Figure 8. Trypanosomicidal flavonoids isolated from *Machaerium*, *Dalbergia* and *Cyclolobium* (Chiari et al., 1991)

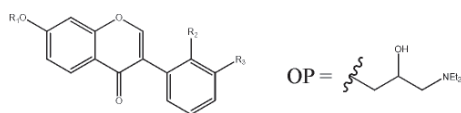


a: ex. *Wedelia paludosa* (Silva et al. 1999; Batista et al., 1999); b: chemical derivative (Batista et al., 2007); c: biotransformation derivative (Silva, 1999).

Figure 9. Trypanosomicidal natural kaurane diterpenoids and derivatives

single dose (250 mg/kg) of this glucoside was orally administered to Swiss albino mice inoculated with blood trypomastigotes of *T. cruzi*. On the other hand, the C17-O-glucoside-C19-alcohol derivative of kaurenoic acid was less active *in vitro* and was not assayed *in vivo* (Figure 9) (Batista et al., 2007). A similar correlation between trypanosomicidal activity and hydrophilicity, as observed for glucoside derivatives of kaurenoic acid, was disclosed for isoflavones and isoflavans. The oxipropanolamine derivatives of isoflavones were more active than the corresponding phenolic forms causing clearance of parasites in concentrations ranging from 2.25 to 0.31 mM, in the *in vitro* assays (Figure 10) (Faria et al., 2005).

A special feature of *T. cruzi* is its sensitivity to the action of intracellular generators of active oxygen species via redox cycling, a mechanism by which naphthoquinones exhibit their antiprotozoan activity (Docampo et al., 1978). Evaluation of natural and synthetic naphthoquinones, against *T. cruzi* epimastigotes has disclosed quinones with higher trypanosomicidal activity than nifurtimox, one of the drugs clinically used for treatment of Chagas' disease (Lopes et al., 1978; Ribeiro-Rodrigues et al., 1995). However, it is



R ₁	R ₂	R ₃	Concentration (mM)
% inhibition*			
2.25			
H	H	H	100
H	OH	H	100
H	H	OH	59
1.13			
OP	OH	H	100 (L)
0.31			
OP	OCH ₃	H	100 (L)
OP	H	H	100 (L)
OP	H	OP	100 (L)

**T. cruzi* Y strain; (L): partial lysis of erythrocytes

Figure 10. Trypanosomicidal synthetic isoflavones (Faria, 1997; Faria et al., 2005)

recommended that the search for trypanosomicidal drugs must initially involve bloodstream trypomastigotes, the infective form of the parasite (Coura and Castro, 2002). A series of 21 quinones including furanonaphthoquinones, 1,4- and 1,2-naphthoquinones, some of which previously assayed against epimastigotes, were evaluated against trypomastigotes, gentian violet being the positive control. Higher trypanosomicidal activity was observed for synthetic ortho-furanonaphthoquinones while β -lapachone, an *ortho*-naphthodihydropyranquinone highly active against epimastigotes, has caused less than 50% reduction of trypomastigotes present in the blood (Figure 11) (Goulart et al., 1997).

IIIB. Malaria

Malaria is one of the major parasitic diseases in the tropical and subtropical regions of the world and its aetiological agents are protozoans of the genus *Plasmodium*. It is responsible for over 1 million deaths each year and approximately 3.2 billion people, living in 107 countries, are presently at risk. Over 80% of malaria deaths occur in Africa and 15%, in Asia. In the Americas, 14% of the population is at risk. The emergence of chloroquine resistant strains of *Plasmodium falciparum*, the most deadly species of malaria parasites, the resistance of vectors (*Anopheles* spp) to insecticides, in combination with poverty and lack of good quality health care, are the main causes for the increase of malaria morbidity and mortality (WHO, 2005).

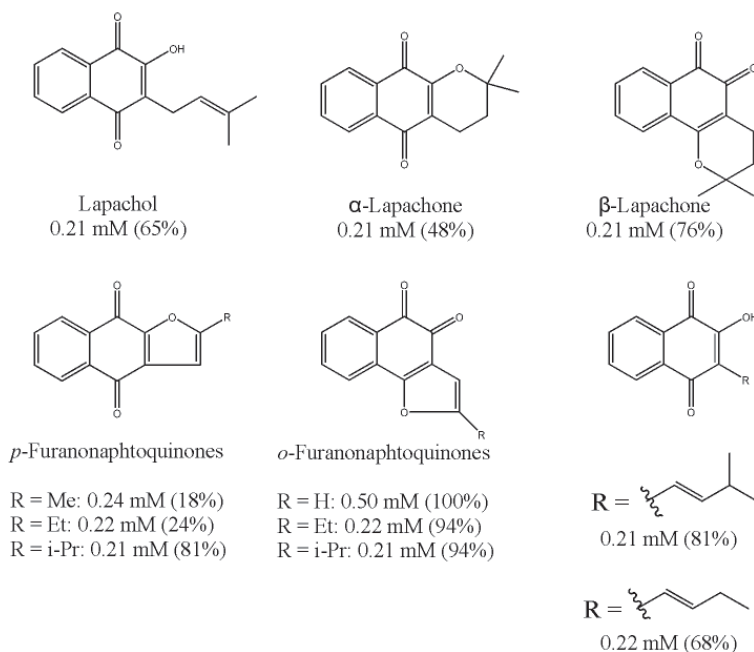


Figure 11. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Goulart et al., 1997)

There is a consensus that new drugs to treat malaria are urgently needed. Many approaches to antimalarial drug discovery are available (Ridley, 2002; Rosenthal, 2006; Fidock et al., 2004). Investigation of plant-derived compounds is a valid strategy and this approach can benefit from traditional knowledge of populations from malarious regions. Natural products afforded two of the most important currently available drugs to treat malaria falciparum, quinine and artemisinin. The first one, a quinoline alkaloid, was isolated from *Cinchona* species used for treatment of fevers and/or malaria by South America Peruvian indians and has been a template for the synthesis of chloroquine, the most widely used antimalarial drug. Artemisinin is responsible for the antimalarial activity of *Artemisia annua*, a species of millenar traditional use in China. The development of artemisinin derivatives has been a major advance in the chemotherapy of malaria (Wright, 2005).

It is estimated that 80% of world's population depends on herbal remedies for treatment of diseases. Indeed, in malaria endemic areas, plant remedies are still widely used but mostly without assurance of their efficacy. Validation of traditionally used plants to treat malaria is important and requires clinical trials (Wright, 2005; Willcox and Bodeker, 2004) which

must be preceded by phytochemical and toxicological studies that are necessities to guarantee efficacy and safety of herbal preparations (phytomedicines). Furthermore, knowledge of active compounds of a medicinal plant is important for development of standardized preparations aiming pre-clinical and clinical assays.

In the search for new antimalarial agents, several of our natural naphthoquinones isolated from Bignoniaceae plant species and synthetic analogs were evaluated *in vitro* against erythrocytic stages of *P. falciparum*. Lapachol, considered an antimalarial drug, has exhibited very low activity while α - and β -lapachone were the most active causing 100% inhibition of parasite growth at 2.0 μ M (Carvalho et al., 1988). The *in vitro* antiplasmodial activity of 26 naphthoquinones derivatives related to lapachol and β -lapachone was recently reported confirming the previously observed higher activity of β -lapachone (IC_{50} 4.1 ± 1.17 μ M) in relation to lapachol (IC_{50} 24.4 ± 4.59 μ M) against F32 strain of *P. falciparum* (Perez-Sacau et al., 2006). *In vivo* assays in *P. berghei*-infected mice have disclosed low activity for β -lapachone while lapachol was inactive (Andrade-Neto et al., 2004).

IIIC. Toxoplamosis

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan capable of invading all types of nucleic cells. The immune system of immunocompetent patients control tachyzoite multiplication, whereas infections in immunocompromised patients can result in fatal encephalitis. Pyrimethamine alone or in combination with sulfadiazine has been the conventional treatment for acute toxoplasmosis and toxoplasmic ancephalitis although adverse reactions are frequent. There is a need for new therapeutic drugs to treat toxoplasmosis, particularly for patients with AIDS. Atovaquone, a naphthoquinone structurally related to lapachol, was recently introduced as an antimalarial agent, has proven to be effective against *Pneumocysts carini* and *Toxoplasma gondii* (Araujo et al., 1991). A total of 14 naphthoquinones from our collection were evaluated against *T. gondii* *in vitro* in cultures of 2C4 fibroblasts and in murine models of infection. In the *in vitro*, assay, seven naphthoquinones have shown significant inhibition of intracellular *T. gondii*, with IC_{50} ranging from 37.50 μ g/ml to 3.01 μ g/ml. Only three synthetic 2-hydroxy-3-(1'-alkenyl)-1,4-naphthoquinones (PHNQ4, PHNQ5 and PHNQ6) (Figure 12) were significantly protective when tested in mice infected with tachyzoites or cysts of *T. gondii*. PHNQ6 was the most effective. When administered i. p. to mice infected with the EGS strain, at the dose of 50 mg/kg/day, for 10 consecutive days, a life prolongation of up 30 days was observed. Moreover, PHNQ6 significantly reduced the number of brain in P strain-infected mice, after four weeks of treatment what is an interesting result once the efficiency of chemotherapy against *T. gondii* cysts is, generally, limited. This

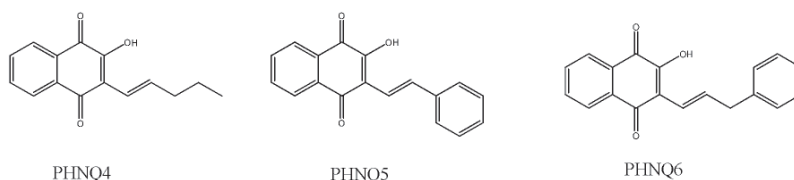


Figure 12. Synthetic 2-hydroxy-3-(1'-alkenyl)-1,4-naphthoquinones disclosing *in vitro* and *in vivo* anti-*Toxoplasma gondii* activity (Ferreira et al., 2002; 2006)

hydroxynaphthoquinone might be useful for treating chronic toxoplasmosis since it seems to be active against bradyzoites reducing the parasite burden (number of cysts) (Ferreira et al., 2002; 2006).

IV. Screening plant extracts against *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*: bioguided isolation of active compounds

Screening of plant extracts against *T. cruzi* has started in the 1990's in collaboration with Prof Egler Chiari, from our university, at Instituto de Ciências Biológicas, while screening against *P. falciparum* has started recently in collaboration with Dr. Marinete Marins Póvoa, from Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, State of Pará.

Information on traditional use of plants to treat Chagas' disease is very scarce. Therefore the ethnopharmacological approach is not helpful and we have adopted the taxonomical approach, concentrating efforts on Asteraceae, Bignoniaceae. Forty-seven Asteraceae plant species randomly collected in the neighbourhood of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, have been screened against blood trypomastigote form of *T. cruzi*. Eleven of them caused 100% growth inhibition of Y strain and eight of these were also active against CL strain (Chiari et al., 1996). Bioguided fractionation of ethanol extracts from *Lychnophora passerina* (Mart. ex DC) Gardn., *L. pinaster* Mart. and *L. trichocarpha* Spreng. led to the isolation of four active compounds, the sesquiterpene lactones goyazensolide, eremantholide and lychnopholide along with a new caryophyllene derivative, which we have named lychnophoic acid (Figure 13) (Oliveira et al., 1996). Kaurenoic and grandiflorenic acids (Figure 9) were shown to be responsible for the activity of *Wedelia paludosa* whose extract had been identified as trypanosomicidal in the screening of Asteraceae (Batista et al., 1999).

Aiming to establish simple tests to be carried on by phytochemists, the correlation between trypanosomicidal activity and toxicity for *Artemia salina* was investigated and the well known BSLA (Brine Shrimp Lethality Assay) has been shown to be valuable as a pre-screening system for anti-*Trypano-*

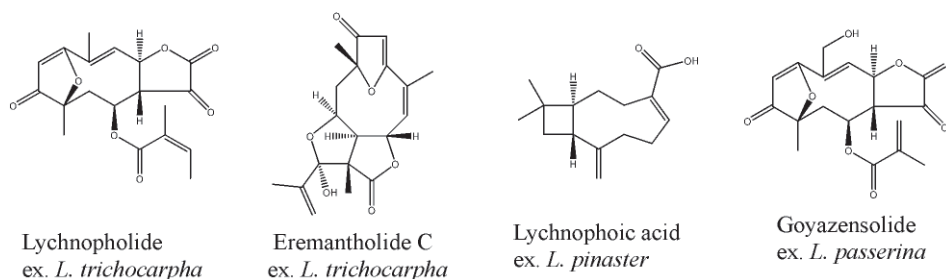


Figure 13. Trypanosomicidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species (Chiari et al., 1996; Oliveira et al., 1996)

soma cruzi activity (Zani et al., 1995). Representatives of several genera of the Asteraceae family have been disclosed as potentially trypanosomicidal, among them *Mikania* and *Trixis* which afforded active kaurane diterpenes, flavonoids and sesquiterpene lactones (Alves et al., 1995; Ribeiro et al., 1997; Nascimento et al., 2004).

Screening Bignoniaceae plant species against *T. cruzi* trypomastigote has disclosed *Arrabidaea triplinervia* as one active species. Activity guided fractionation of its ethanol extract has led, in a short route, to oleanolic and ursolic acids, the second one being four times more active (ED_{100} 0.4 mg/ml). Derivatives of both of these triperpenic acids were prepared and structure-activity evaluation allowed to infer that the carboxy function (COOH or COOR) is essential for the trypanosomicidal activity (Leite et al., 2006) (Figure 14). Trypanosomicidal natural products of different structural classes have been reported (Coura and Castro, 2002). Most of them are unsoluble in water what is a limitation to their use as chemoprophilatic agent to be added to transfusional blood. Up to now, the most promising candidate for Chagas' disease prophylaxis seems to be a synthetic hydrosoluble aminoquinoline [6-methoxy-8(diethylamino)lepidine dihydrochloride, WR6026], which was effective for clearance of parasites from infected blood at doses comparable to those for gentian violet (65, 135 μ g/ml) (Chiari et al., 1996; Moraes-Souza et al., 2002).

Most of the currently used antimalarial drugs have been developed from investigation of traditional medicinal plants (popular, indigenous, folkloric). Extracts of a large number of plant species, including many that are used in traditional medicines, have been evaluated for *in vitro* antiplasmodial activity and some have also been tested *in vivo*, usually in mice infected with *P. berghei* or *P. yoelli* (for reviews, see Tagboto and Townson, 2001; Schwikkard and van Heerden, 2002; Saxena et al., 2003; Go, 2003; Krettli et al., 2001).

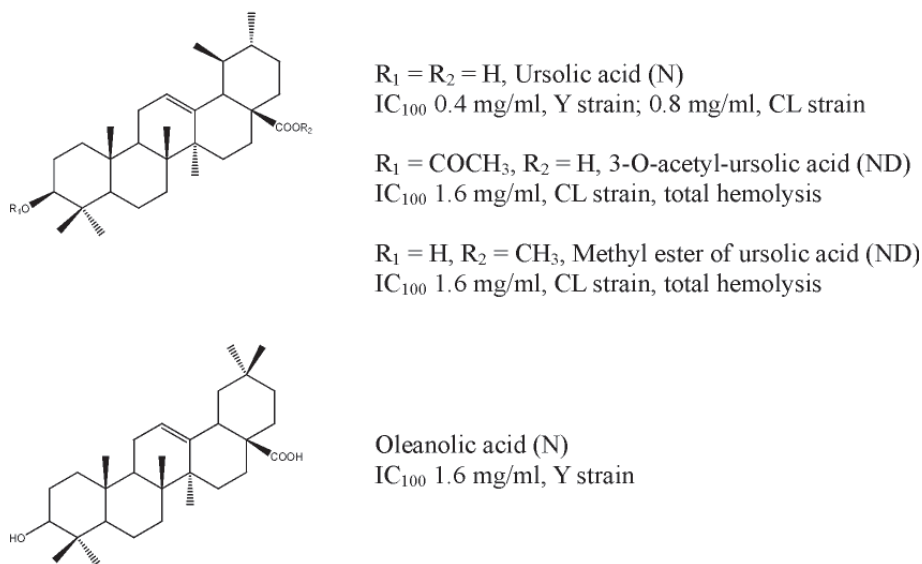


Figure 14. Trypanosomicidal triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae) and derivatives (Leite et al., 2006)

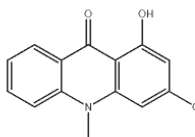
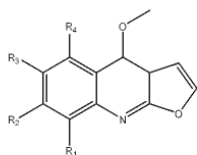
Our recent screening of plant extracts for *in vitro* activity on culture of *P. falciparum* has revealed several active *Aspidosperma* species (Apocynaceae) and confirmed the antiplasmodial effect of *Esenbeckia febrifuga* (A. St. Hil.) Juss. ex Mart. (Rutaceae) (Dolabela, 2007). Popularly known in Brazil as “quina-do-mato” and “tres folhas”, *E. febrifuga* is used for the treatment of fever and/or malaria by inhabitants of the Brazilian Amazon region. An aqueous bark/stalk extract of this species has been previously assayed *in vivo* against *Plasmodium berghei* –infected mice, at a dose of 1.0 g/kg, and was shown to be partly active, causing 43% inhibition of parasite multiplication (Carvalho et al., 1991; Brandão et al., 1992). We have assayed an ethanol extract of stems which displayed a good antiplasmodial activity against *P. falciparum* strains W-2 (IC_{50} 15.5 ± 0.71 $\mu\text{g/ml}$) and 3D7 (IC_{50} 21.0 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$). Two coumarins (bergaptene and isopimpinellin), five alkaloids (flindersiamine, kokusaginine, skymmianine, gamma-fagarine and 1-hydroxy-3-methoxy-N-methylacridone/ HMMA), besides a limonoid (rutaevine), have been isolated by the first time from this species. The furoquinolines skymmianine and ? -fagarine were the most potent displaying IC_{50} values <50 $\mu\text{g/ml}$; flindersiamine showed a weak activity while HMMA and rutaevine were inactive ($IC_{50} >100$ $\mu\text{g/ml}$) (Table 2) (Dolabela et al., 2008)

One serious limitation concerning the investigation of antimalarial plants in Brazil are the restricted facilities for bioassays to which we have had

Table 2. Antiplasmodial activity of *Esenbeckia febrifuga* extract and constituents

Activity against <i>Plasmodium falciparum</i> , IC ₅₀ μ M							
<i>P. falciparum</i> strains							
	3D7 ^a	W-2 ^a	W-2 ^b	HB3 ^b	HB3 ^c	K1 ^c	FcM29 ^d
Extract <i>E. febrifuga</i>	21.0 $\pm$ 1.4*	15.5 $\pm$ 0.71*					
Compounds							
Flindersiamine	265.6 $\pm$ 12.8	348.0 $\pm$ 35.3					
Kokusaginine		29.7	89.2	60.6			
Skimmianine	166.0 $\pm$ 5.4	75.3 $\pm$ 2.7	54.4	60.6	47.5 $\pm$ 0.42	59.0 $\pm$ 0.32	134.3
γ -Fagarine	109.8 $\pm$ 18.3	157.2 $\pm$ 12.2					98.4
MHMA	> 392	> 392					

*mg/ml; ^aDolabela et al., 2008; ^bBasco et al., 1994; ^cMurithi et al., 2002; ^dRandrianarivelojosa et al., 2003



N-Methyl-1-hydroxy-3-methoxy-acridone (MHMA)

R1 = OMe; R2 = R3 = OCH₂O; R4 = H; Flindersiamine

R1 = R4 = H; R2 = R3 = OMe; Kokusaginine

R1 = R2 = OMe; R3 = R4 = H; Skimmianine

R1 = OMe; R2 = R3 = R4 = H; γ -Fagarine

access recently through a collaboration with Dr. Marinete Marins Póvoa/ IEC, Belém/PA. Fortunately we have now, at our research laboratory, a scintillation equipment which will accelerate the *in vitro* assays. Finally, supported by our national research council –CNPq, within the “Programa Sul Americano de Apoio às Atividades de Cooperação em Ciência e Tecnologia – PROSUL”, we have recently started a scientific collaboration with the “Grupo Principios Bioactivos de Plantas Medicinales”, from the Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, UNAL, Bogotá, for a project on antimalarial plants from South America, which counts upon facilities and research specialists to carry on *in vivo* antimalarial assays. I am sure we will both benefit of this cooperation.

Finally, Figure 16 represents my vision of a collaborative research program joining Parasitology and the “Grupo de Plantas Medicinales” from Colombia in the search of antiparasitic agents. It is needed just a small joint endeavour but great results could be expected.

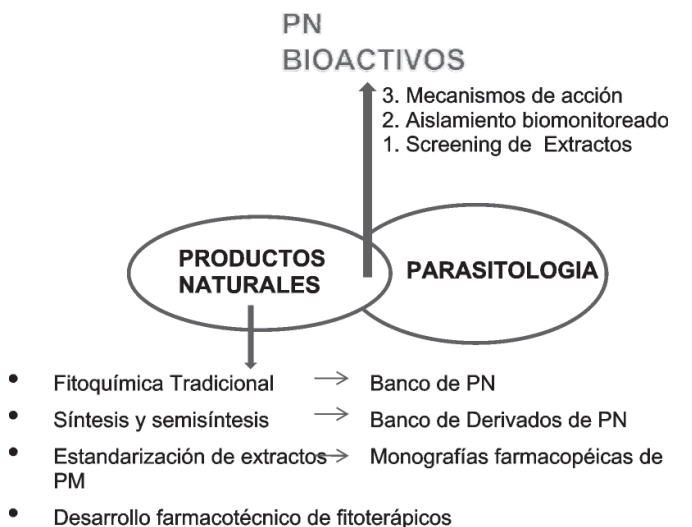


Figure 16. Natural Products-Parasitology collaborative project searching for antiparasitic drugs

References

- Alali, F. Q.; Liu, X.-X.; McLaughlin, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62: 504–540.
- Albuquerque, F. B., Braz-Filho, R., Gottlieb, O. R., Magalhães, M. T., Maia, J. G. S., Oliveira, A. B., Oliveira, G. G., Wilberg, V. C. (1981) Isoflavone evolution in *Monopterix*. *Phytochem.* 19: 235-236.
- Alves, T. M. A., Chaves, P. P. G., Nagem, T. J. Murta, S. M. F., Cerávolo, I. P., Romanha, A. J., Zani, C. L. (1995) A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 61: 85-86.
- Alves, T. M. A., Oliveira, A. B., Snieckus, V. (1988) Short synthesis of azafluorenone alkaloids using transition metal-catalysed cross coupling tactics. *Tetrahedron Lett.* 29: 2135-2136.
- Ambroise-Thomas, P. (2000) Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *Internat. J. Parasitol.* 30: 1361-1367.
- Andrade Neto, V. F., Goulart, M. O. F., Filho, J. F. S., Silva, V. A. M. J., Pinto, M. C. F. R., Pinto, A. V., Zalis, M.G., Carvalho, L. H., Krettli, A. U.

- (2004) Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 1145-1149.
- Baggish, A. L. and Hill, D. R. (2002) Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1163-1173.
- Batista, R., Braga, F. C., Oliveira, A. B. (2005) Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D. C. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 15: 119-125.
- Batista, R., Chiari, E., Oliveira, A. B. (1999) Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. *Planta Med.*, 65: 283-284.
- Batista, R., Del Corral, J. M. M., San Feliciano, A., Oliveira, A. B. (2007) New oxidized ent-kaurane and ent-nor-kaurane derivatives from kaurenoic acid. *J. Braz. Chem. Soc.* 18: 622-627.
- Batista, R., Humberto, J. L., Chiari, E., Oliveira, A. B. (2007). Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. *Bioorg. Med. Chem* 15: 381-391.
- Bayma, J. C., Oliveira, A. B., Cavé, A., Dadoun, H. (1988). Aporphinoid alkaloids from *Guatteria Schomburgkiana* leaves. *Planta Med.* 54: 84-86.
- Brandão, M.G.L., Grande, T.S.M., Rocha, F.M.M., Sawyer, D.R. and Krettli, A. U. (1982). Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 36: 175-182.
- Brasil (2004). Ministério da Saúde, Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos.
- Carvalho, L. H., Brandão, M. G. L., Santos-Filho, D., Lopes, J. L. C. and Krettli, A. U. (1991) Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 24: 1113-1123.
- Chiari, E., Duarte, D. S., Raslan, D. S., Saúde, D. A., Perry, K. S. P., Boaventura, M. A. D., Grandi, T. S. M., Stehmann, J. R., Anjos, A. M. G., Oliveira, A. B. (1996) *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. *Phytother. Res.* 10: 636-638.
- Chiari, E., Oliveira, A. B., Prado, M. A., Alves, R. J., Galvão, L. M. C., Araújo, F. G. (1996) Potential use of WR6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted American trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 613-615.
- Cordell, G. A., Colvard, M. D. (2005) Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharm.* 100: 5-14.

- Corral, J. M. M. , Castro, M. A., Oliveira, A. B., Gualberto, S. A., Cuevas, C., San Feliciano, A. (2006) New cytotoxic furoquinones obtained from 1, 4- naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 7231-7240.
- Coura, J. R., Castro, S. L. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
- Croft, L. S., Sutherland, C. (2002) Antiprotozoan drugs. *Encyclopedia of Life Sciences*, MacMillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group/ www.els.net
- Docampo, R., Cruz, F.S., Boveris, A., Muniz, R.P., Esquivel, D.M. (1978). Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in beta-lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Arch Biochem Biophys.* 186: 292-297.
- Dolabela, M. F. Atividade antiplasmodica e citotoxicidade de *Esenbeckia febrifuga* (A. St. Hil.) Juss. ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 178 p.
- Dolabela, M. F., Oliveira, S. G., Nascimento, J. M., Peres, J. M., Wagner, H., Póvoa, M. M., Oliveira A. B. (2008) *In vitro* antiplasmodial activity of an extract and constituents of *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine* 15: 367-372.
- Donnelly, D. M. X., Boland, G. M. (1995) Isoflavonoids and neoflavonoids: naturally occurring O-heterocycles. *Nat. Prod. Rep.* 12: 321-338.
- Douglas, K. T. (1994) Rational drug design in parasitology. *Parasitol. Today* 10: 389-392.
- Faria, T. J. (1997) Síntese de derivados anfifílicos de isoflavonóides potencialmente tripanosomicidas. Belo Horizonte: UFMG. 208pp. Tese de Doutorado em Química Orgânica – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Faria, T. J., Silva, L. G. F., Souza-Filho, J. D., Chiari, E., Oliveira, A. B. (2005) Synthesis and trypanocidal activity of 7,2'-dioxigenated isoflavones and oxypropanolamine derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 1415-1419.
- Ferreira, R. A., Gualberto, S. A., Oliveira, A. B., Vitor, R. W. A. (2002) Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii* *in vitro* and in murine models of infection. *Parasite* 9: 261-269.
- Ferreira, R. A., Oliveira, A. B.; Vitor, R. W. A. (2006) *Toxoplasma gondii*: *in vitro* and *in vivo* activities of 2-hydroxy-3-(1'-propen-3'-phenyl)-1,4-naphthoquinone (PHNQ6) alone or combined with sulfadiazine. *Exp. Parasitol.* 113: 125-129.

- Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R. and Niwaka, S. (2004) Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Rev. Drug Disc.* 3: 509-520.
- Filardi, L. S.; Brener, Z. (1984) A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 221-225.
- Fournet, A., Muñoz, V. (2002) Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Cur. Top. Med. Chem.* 2: 1215-1237.
- Go, M. L.. (2003) Novel antiplasmodial agents. *Med Res Rev* 23: 456-487.
- Gottlieb, O. R. (1982) *Micromolecular evolution, systematics and ecology.* Springer-Verlag Berlin Heildeberg. 170 pp.
- Gottlieb, O. R., Mors, W. B. (1980) Potential utilization of Brazilian wood extractives. *J. Agric. Food Chem.* 28: 196-215.
- Gottlieb, O. R., Oliveira, A. B., Gonçalves, T. M. M., Oliveira, G. G., Pereira, S. A. (1975) Isoflavonoids from *Cyclolobium* species. *Phytochem.* 14: 2495-2499.
- Goulart, M. O. F., Zani, C. L., Tonholo, J., Freitas, L. R., Abreu, F. C., Oliveira, A. B., Raslan, D. S., Starling, S., Chiari, E. (1997) Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 7: 2043-2048.
- Goulart, M. O. F., Santana, A. E. G., Oliveira, A. B., Maia, J. G. S. (1986). Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. *Phytochem.* 25: 1691-1695.
- Gutteridge, W. E. (1997) Designer drugs: pipe-dreams or reality? *Parasitol.* 15: S145-S151.
- Hamburguer, M., Hostettmann, K. (1989) Analytical aspects of drugs of natural origin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7: 1337-1349.
- Hudson, A. T. (1994) A contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitol. Today* 10: 387-392.
- Jácome, R. L. R. P., Oliveira, A. B., Raslan, D. S., Müller, A., Wagner, H. (1999) Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. *Química Nova* 22: 175-177.
- Kaplan, M. A. C., Figueiredo, M.. R., Gottlieb, O. R. (1994) Chemical diversity from Brazilian cerrados. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 66: 49-54.
- Kayser, O., Kiderlen, A. F., Croft, S. L. (2003) Natural products as antiparasitic agents. *Parasitol. Res.* 90: S55-S62.

- Khan, A. A., Nasr, M., Araújo, F. G. (1998) Two 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones with in vitro and in vivo activities against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2284-2289.
- Kirchhoff, V. L. (1999) *In: Emerging Infections*; Scheld W. M. et al., Eds.; ASM Press. p 111-134.
- Krettli, A. U. Andrade-Neto, V. F., Brandão, M. G. L., Ferrari, W. M. S. (2001) The search for new antimalarial drugs from plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1033-1042.
- Kurosawa, K., Ollis, W. D., Redman, B. T., Sutherland, I. O., Oliveira, A. B., Gottlieb, O. R., Magalhães, H. M. (1968) The natural occurrence of isoflavans and an isoflavanquinone. *Chem. Commun.* 20: 1263-1264.
- Leite, J. P. V., Oliveira, A. B., Lombardi, J. A., Souza-Filho, J. D., Chiari, E. (2006) Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2307-2309.
- Lopes, J. N., Cruz, F. S., Docampo, R.; Vasconcelos, M. E., Sampaio, M. C. R., Pinto, A. V., Gilbert, B. (1978) *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 523-531.
- Mafezoli, J., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Da Silva, M. G. F., Albuquerque, S. (2000) In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharm.* 73: 335-340.
- Maranduba, A., Oliveira, A. B., Oliveira, G. G. Reis, J. E. P., Gottlieb, O. R. (1979) Isoflavonoids from *Myroxylon peruiferum*. *Phytochem.* 18: 815-817.
- McLaughlin, J. L. (2008) Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J. Nat Prod.* 71: 1311-1321
- Melo, A. C., Cota, B. B., Oliveira, A. B., Braga, F. C. (2001) HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. *Fitoterapia* 72: 40-45
- Moraes-Souza, H., Pianetti, G. M., Barreto, O. C. O.P., Nonoyama, K., Grogl, M., Chiari, E. (2002) Aminoquinoline WR6026 as a feasible substitute for gentian violet in Chagas' disease prophylaxis in preserved blood for transfusional purpose. *Rev. Soc. Brasil. Med Trop.* 35: 563-569.
- Morel, C. M. (2003) Neglected diseases: under-funded research and inadequate health. *European Mol. Biol. Org. Report* 4(Suppl): S35-S38.
- MS/SVS (2007) Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância Sanitária, Situação epidemiológica da malária no Brasil.
- Nascimento, A. M., Chaves, J. S., Albuquerque, S., Oliveira, D. C. R. (2004) Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated compounds. *Fitoterapia* 75: 381-384.

- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years J. Nat. Prod. 70: 461-477
- Nwaka, S., Ridley, R. G. (2003) Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public private partnerships. Nature Reviews/Drug Discovery 2: 920-928.
- Oliveira, A. B., Perry, K. S. P., Duarte, D. S., Raslan, D. S., Boaventura, M. A. D., Chiari, E. (1996) Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora species*. Phytother. Res. 10: 292-295.
- Oliveira, A. B., Santos, L. P.; Boaventura, M. A. D. (1994) Crassiflorina, uma acetogenina tetraidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora*. Quimica Nova 17: 387-391.
- Oliveira, A. B.; Brandão, M. A. F., Snieckus, V. (1993) Combined directed metalation-cross coupling strategies. A regiospecific route to heteroring-annelated ortho-naphthoquinones and a short synthesis of β -lapachone. Tetrahedron Lett. 34: 2437-2440.
- Oliveira, A. B., Raslan, D. S., Oliveira, G. G. Maia, J. G. S. (1993) Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. Phytochem: 34: 1409-1412.
- Oliveira, A. B., Raslan, D. S.; Huu, F. K. (1990) Selenium reagents in the synthesis of naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. Tetrahedron Lett. 47: 6873-6876.
- Oliveira, A. B., Ferreira, D. T., Raslan, D. S. (1988) Synthesis of naturally occurring naphtho-[2,3]-pyran-5-10-quinones. Tetrahedron Lett. 29: 155-158.
- Oliveira, A. B., Carazza, F., Maia, J. G. S. (1987) Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* Aubl. Phytochem. 26: 2650-2651.
- Oliveira, A. B., Pimenta, L. O., Madruga, M. I. L., Reis, J. E. P.; Gottlieb, O. R. (1979) Direct conversion of 2'-hydroxychalcones into isoflavones using thalium (III) nitrate: a comment. Revista Latinoamericana de Química 10: 122-125.
- Oliveira, A. B., Fernandes, M. L. M., Shaat, V. T., Vasconcelos, I. A., Gottlieb, O. R. (1977). Constituents of *Cassia* species. Revista Latinoamericana de Quimica 8: 82-85.
- Oliveira, A. B., Madruga, M. I. L., Gottlieb, O. R. (1978) Isoflavonoids from *Myroxylon balsamun*. Phytochem. 17: 593-595.
- Oliveira, A. B., Silva, L. G. F., Gottlieb, O. R. (1972) Flavonoids and coumarins from *Platymiscium praecox*. Phytochem. 11: 3515-3519.
- Oliveira, A. B., Gonçalves, T. M. M., Ollis, W. D., Gottlieb, O. R. (1971). A Química de Leguminosas Brasileiras. XXXIII. Os isoflavonoides de *Cyclobium clausenii* e *C. vecchii*. Anais Acad. Brasil. Ciênc., 43: 129-130.

- Oliveira, A. B., Gottlieb, O. R., Ollis, W. D., Rizzini, C. T. (1971) A phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*. (1971) *Phytochem.* 10: 1863-1876.
- Oliveira, A. B., Gottlieb, O. R., Eyton, W. B., Kurosawa, K. Ollis, W. D. (1968) A Química de Leguminosas Brasileiras. XV. Constituintes do *Machaerium villosum* (Pimeira Parte). *Anais Acad. Brasil. Ciênc.*, 40: 33-37.
- Oliveira, A. B., Gottlieb, O. R., Ollis, W. D. (1968) A Química de Leguminosas Brasileiras. XVII. Constituintes do *Machaerium villosum* (Segunda Parte). *Anais Acad. Brasil. de Ciênc.*, 40: 147-150.
- Pardee, V., Li, A. B., Li, Y. Z. (2002) Cancer therapy with β -lapachone. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2: 227-242.
- Pécoul B., Trouiller, P. Pinel, J. (1999). Access to essential drugs in poor countries: a lost battle? *JAMA* 281: 361-367.
- Perez-Sacau, E., Estévez-Braun, A., Ravelo, A. G., Yapu, D. G. Turba, A. G. (2005) Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and β -lapachone. *Chemistry & Biodiversity* 2: 264-274.
- Phillipson, J. D., Wrigth, C. W. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial drugs? *J. Ethnopharm.* 32: 155-165.
- Rao, M. M., Kingston, D. G. I. (1982). Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. *J Nat Prod.* 45: 600-604.
- Ribeiro A, Piló-Veloso D, Romanha A. J., Zani, C. L. (1997) Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J Nat Prod* 60: 836-838
- Ribeiro-Rodrigues, R., Santos, W. G., Zani, C. L., Oliveira, A. B., Romanha, A. J. (1995) Growth inhibitory effect of naphthofuran and naphthofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 5: 1509-1512.
- Ridley, R. G. (2003) Product R&D for neglected diseases. *European Mol. Biol. Org.* 4(Suppl.): S43-S45.
- Ridley, R.G. (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415: 686-693.
- Rosenthal, P. J. (2001) Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 1185-1186.
- Rosenthal, P. J. (2003) Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J. Exp. Biol.* 206: 3735-3744.
- Santos, L. P., Boaventura, M. A. D., Oliveira, A. B., Cassady, J. M. (1996) Grossamide and N-trans-caffeoyltyramine from *Annona Crassiflora* seeds. *Planta Med.* 62: 76-77.

- Santos, L. P., Boaventura, M. A. D., Sun, N.-J., Cassady, J. M., Oliveira, A. B. (1996) Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. *Phytochem.* 42: 705-707.
- Saxena, S, Pant, N, Jain, D. C., Bhakuni, R. S. (2003) Antimalarial agents from plant sources. *Current Sci.* 85: 1314-1329.
- Schwikkard, S., van Heerden, F. R. (2002) Antimalarial activity of plant metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 19: 675-692.
- Silva, E. A. (1999) Transformações microbianas de diterpenos caurânicos e traquilobânicos. Belo Horizonte: UFMG. 144 pp. Tese de Doutorado em Química Orgânica – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Silva, E. A., Takahashi, J. A., Boaventura, M. A. D., Oliveira, A. B. (1999) The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Phytochem.* 52: 397-400.
- Silva, M. N., Ferreira, V. F., Souza, M. C. B. V. (2003) Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quím. Nova* 26: 407-416.
- Starling, S., Raslan, D. S., Oliveira, A. B. (1998) Synthesis of 2-substituted furanonaphthoquinones using directed metalation and cross coupling reactions. *Synthetic Commun.* 28: 1013-1030.
- Starling, S., Raslan, D. S., Oliveira, A. B., Zani, C. L. (1998) Synthesis of C-2 unsubstituted furanonaphthoquinones. *Synthetic Commun.* 28: 3567-3578.
- Tagboto, S, Townson, S. (2001) Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitol.* 50: 199-295.
- Takahashi, J. A., Boaventura, M. A. D., Bayma, J. C., Oliveira, A. B. (1995) Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopia frutescens*. *Phytochem.* 40: 607-609.
- Takahashi, J. A., Hanson, J. R., Oliveira, A. B. (1995) The biotransformation of *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochem.* 40: 439-442.
- Tradic, D., Cavé, A., Cassels, B. K., Goulart, M. O. F., Oliveira, A. B. (1987) Revised structures of the azafluorenone alkaloids from *Guatteria dielsiana*. *Phytochem.* 26: 1551-1552.
- Trouiller P. et al. (2001) Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? *Trop. Med. Int. Health* 6: 945-951.
- Ulrich-Merzenich, H., Zeitler, D., Jobst, D., Panek, H., Vetter, H. Wagner, H. (2007) Application of the “-OMIC-” technologies in phytomedicine. *Phytomed.* 14: 70-82.

- Vieira, H. S.; Silva, E. A., Takahashi, J. A.; Oliveira, A. B.; Chiari, E.; Boaventura, M. A. D. (2002) Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. J. Braz. Chem. Soc. 13: 151-153.
- Wagner, H. (2004) Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. ARKIVOC VII: 277-284.
- Wähälä, K., Hase, T. A. (1991) Expedient synthesis of polyhydroxyisoflavones. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 3005-3008.
- Weinberg, M. L. D., Gottlieb, O. R., Oliveira, G. G. (1976) Naphthoquinones from *Zeyhera tuberculosa*. Phytochem. 15: 570-572.
- WHO – World Health Organization (2005) World Malaria Report. <http://www.who.int/malaria>
- Willcox, M. L., Bodeker, G. (2004) Traditional herbal medicines for malaria. Brit. Med. J. 329: 1156-1159.
- Wright, C.W. (2005) Plant-derived antimalarial agents: new leads and challenges. Phytochem. Rev. 4: 55-61.
- Wright, C. W., Phillipson, J. D. (1991) Antiprotozoal agents from plant sources. Planta Med. 57: 353-359.
- Yamey, P. (2002) The world's most neglected diseases. Brit. Med. J. 325: 176-177.
- Zani, C. L., Alves, T. M. A., Oliveira, A. B., Murta, S. M. F., Cerávolo, I. P.; Romanha, A. A. J. (1994) Trypanocidal components of *Pluchea quitoc* L. Phytotherapy Research 8: 75-377.
- Zani, C. L., Chaves, P. P. G., Queiroz, R., Cardoso, J. E., Anjos, A. M. G., Grandi, T. S. M., Oliveira, A. B. (1995) Brine shrimp lethality assay as a pre-screening system for anti-*Trypanosoma cruzi*. Phytomedicine 2: 47-50.
- Zani, C. L., Oliveira, A. B., Starling, S. M. (1994) Síntese de parafranaftoquinonas. Uma Revisão. Química Nova. 17: 44-52.
- Zani, C. L., Oliveira, A. B., Oliveira, G. G. (1991) Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. Phytochem. 30: 2379-2381.
- Zani, C. L., Oliveira, A. B., Snieckus, V. (1987) Efficient directed *ortho* metalation-based route to cytotoxic furanonaphthoquinone natural products. Tetrahedron Lett. 28: 6561-6564.

COMENTARIOS AL TRABAJO DE DE LA PROFESORA BRAGA DE OLIVEIRA

La conferencia de la Profesora Alaide Braga de Oliveira de la Universidad de Minas Gerais, Bello Horizonte, Brasil, versó principalmente sobre la línea denominada "Descubrimiento y desarrollo de drogas". La compleja tecnología y metodología necesaria para buscar drogas a partir de organismos vivos, solo la tienen los grandes centros de investigación y las compañías farmacéuticas de países desarrollados. Sin embargo, algunos países del tercer mundo tales como India, China, Corea del Sur y Suráfrica han adquirido recientemente la habilidad para producir drogas. Otros países tienen solo el expertise necesario con respecto a uno o algunos de los componentes científicos individuales que se necesitan para transitar el camino de descubrir y producir drogas. Sin embargo, pocos tienen la capacidad de hacer la tarea completa y moverse desde el descubrimiento de los compuestos bioactivos hasta las etapas preclínica y clínica, y finalmente la preparación del dossier final y el registro. Desafortunadamente, los países de América Latina, como Colombia y Brasil, no somos parte del grupo de países que pueden descubrir y producir una droga, de ahí la necesidad de establecer alianzas entre nuestros países, y mencionaba que este Seminario Internacional era un ejemplo de la búsqueda de oportunidades.

*Sin embargo, se mencionaba que países como los nuestros podríamos seguir una línea tradicional de producción de drogas que involucrara el screening de plantas tradicionalmente usadas como medicinas (etnofarmacología) haciendo uso de los conocimientos de nuestros ancestros y ensayos *in vitro* e *in vivo* para aislar compuestos activos, dentro de un grupo de investigación que incluyera botánicos, fotoquímicos, farmacognosistas y especialistas en bioensayos. Con esta aproximación podremos obtener compuestos activos puros necesarios para asegurar la calidad de preparaciones farmacéuticas (fitomedicinas) para ensayos preclínicos y clínicos. Esta ruta hacia las fitopreparaciones (llamadas en Colombia, extractos activos normalizados) toma un tiempo menor (5-10 años) que la ruta hacia la producción de una droga (10-20 años) y es, además, mucho más barata (se considera que todo el proceso para producir una droga cuesta alrededor de uno a dos billones de dólares). Finalmente, menciona algunos de los intentos hechos en su grupo de investigación en investigación de drogas contra la enfermedad de Chagas, contra la malaria y contra la toxoplasmosis.*

En conclusión, la aproximación que propone esta conferencista para el descubrimiento de nuevas drogas, es algo que ya se está pensando en Colombia, y que como se mencionó anteriormente es nada menos que la producción de extractos normalizados o fitomedicinas, garantizados en cuanto a efectividad y seguridad. Algunos grupos de investigación como el de Investigación de principios activos de plantas del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia están ya intentando dirigir sus esfuerzos hacia la producción de estas fitopreparaciones.

Contribución a la química del género *Montanoa*: lactonas sesquiterpénicas

Leovigildo Quijano¹, José S. Calderón¹ y Tirso Ríos¹

Resumen

En el presente trabajo, se hace una revisión de las lactonas sesquiterpénicas aisladas de diferentes especies del género *Montanoa* y sus relaciones estructurales y taxonómicas. Los resultados obtenidos sugieren que el género produce lactonas sesquiterpénicas con fusión 6, 7-*cis*, pudiendo considerarse estos metabolitos como característicos del género. Sin embargo *M. tomentosa* produce principalmente 6, 7-*trans*-germacranólidas y guayanólidas relacionadas, aunque en algunas poblaciones colectadas en Guatemala y Costa Rica también se ha detectado la presencia de 6, 7-*cis*-germacranólidas.

Palabras clave: *Montanoa*, lactonas sesquiterpénicas.

Abstract

A review of the sesquiterpene lactones isolated from different species of genus *Montanoa* and their structure and taxonomic relationships, is presented. The results suggested that most species of genus *Montanoa* produce sesquiterpene lactones with a 6, 7-*cis* fused lactone ring, which could be considered as characteristic metabolites of the genus. Nevertheless, *M. tomentosa* produce mainly 6, 7-*trans*-germacranolides and related guaianolides, although some collections from Guatemala and Costa Rica also produce 6, 7-*cis*-germacranolides.

Key words: *Montanoa*, sesquiterpene lactones.

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México, D. F. México. Correo electrónico: quijano@unam.mx

Introducción

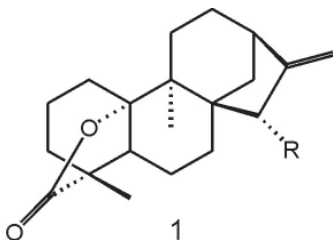
El género *Montanoa* Cerv. es uno de los más atractivos de la familia de las Compuestas y la tribu Heliantheae. La mayoría de sus miembros son arbustos, aunque en algunos casos son verdaderos “árboles de margaritas”, como *M. josei* y *M. gigas* que es un árbol que llega a medir 20 m. de altura y 40 cm. de diámetro en su tronco. Estas especies son verdaderamente espectaculares cuando se encuentran en plena floración por lo que algunas de ellas son cultivadas con fines ornamentales. El género se encuentra ampliamente distribuido en Latinoamérica desde México hasta Perú y su primera descripción botánica fue hecha por Cervantes en 1825, nombrado en honor del médico y naturalista novohispano Dr. Luis Montaña, originario del Estado de Puebla en México.

Botánicamente es un género que siempre ha presentado dificultades en la identificación de las especies. En la última revisión botánica, el género se redujo a 22 especies de las más de 100 descritas anteriormente además de tres nuevas especies (*M. standleyi*, *M. josei* y *M. imbricata*) (Funk, 1982).

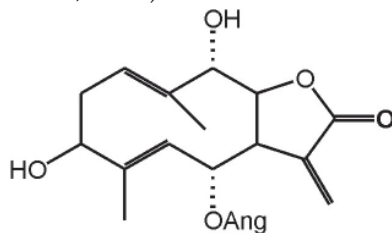
Una de las especies más conocidas por sus propiedades oxitócicas es la *M. tomentosa* que se conoce popularmente como “zoapatle” que en Nahuatl significa “medicina para la mujer” (cihuatl: mujer y pahltli: medicina). Esta especie ha sido usada en México desde tiempos prehispánicos para inducir las contracciones uterinas durante el parto, para el tratamiento de algunos desórdenes del sistema reproductivo en las mujeres o con fines abortivos.

Resultados

La *Montanoa tomentosa* es una planta que debido al potencial para su posible uso con fines médicos, por sus propiedades oxitócicas, ha sido motivo de diferentes estudios desde fines del siglo pasado. Los primeros estudios químicos de la era moderna fueron hechos en el Instituto de Química de la UNAM en 1970. Estos condujeron al aislamiento de ácidos grasos, diterpenos del tipo kaurano y una lactona diterpénica que se denominó zoapatlina (1) (Caballero & Walls, 1970).

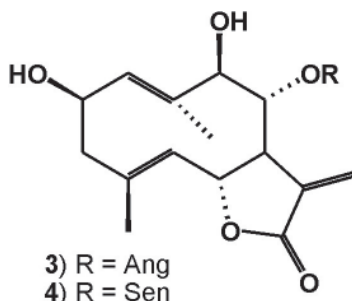


De la misma especie, un año después, se publicó el aislamiento de la primera lactona sesquiterpénica del género, a la que denominó tomentosina (2) (Geissman & Griffin, 1971).



2

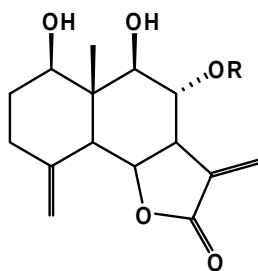
Mientras que de la *M. frutescens*, otra especie que también suele llamarse “zoapatle”, se aisló b-cariofileno, acetato de taraxasterilo, esteroides, ácido kaurenoico y su 15-a-isovaleroil éster. Además de una nueva lactona sesquiterpénica a la cual se le dio el nombre de montafusina (3) (Quijano, 1979).



3) R = Ang

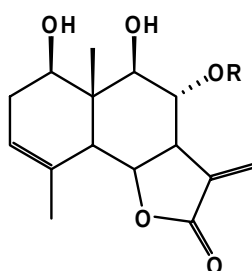
4) R = Sen

La estructura y estereoquímica de la montafusina (3) fueron establecidas con base en datos espectroscópicos, así como la pirolisis de su diacetato que dio el producto de ciclización de Cope, lo que confirmó el carácter *trans-trans* de los dobles enlaces del ciclodecadieno. Años más tarde se aisló otra germacrólida la cual se denominó montafusina B (4), así como cuatro nuevas eudesmanólidas que se denominaron montafusinas C, D, E y F (5-8). Este nuevo estudio también permitió la



5) R = Ang

6) R = Sen

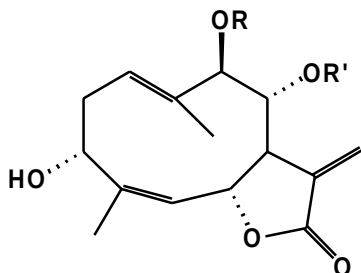


7) R = Ang

8) R = Sen

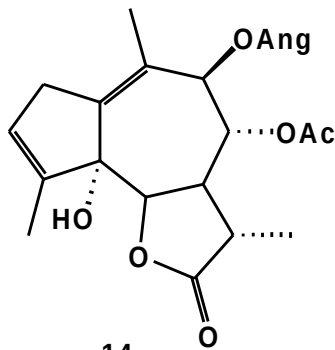
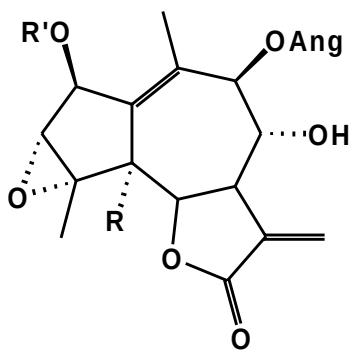
confirmación de la estructura de la montafrusina (3) por difracción de Rayos-X (Quijano, 1986).

Durante la elucidación estructural de la montafrusina (3), pudimos percatarnos de que algunos de los datos publicados para la tomentosina (2) (Geissman & Griffin, 1971), no concordaban con la estructura propuesta. Lo anterior condujo a una nueva investigación de la *M. tomentosa*, de la que se aisló un compuesto cuyos datos fueron muy similares a los reportados; sin embargo, estos indicaron la presencia de una lactona del tipo de las heliangolidas, la cual fue nombrada zoapatanolida A (9), además de otro isómero, la zoapatanolida B (10) (Quijano, 1982).



- 9) R = H, R' = Ang
10) R = Ang, R' = H

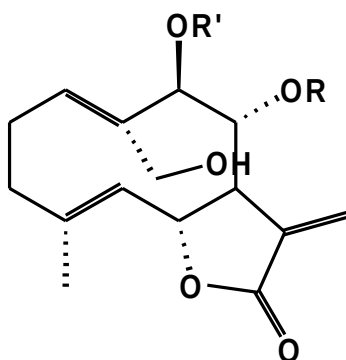
Investigaciones posteriores llevaron al aislamiento de otros compuestos del tipo de las guayanolidas que fueron nombradas zoapatanolidas C, D, E y F (11-14) (Quijano, 1984, 1985, 1991).



- 11) R = OH, R' = Ac
12) R = H, R' = Ac
13) R = OH, R' = H

14

M. gigas Rzedowski (sinónimo *M. revealii* H. Robinson) es una especie endémica del estado de Guerrero en México, donde crece en bosques de pino y encino a 2200-2700 m de altura snm. Es una de las cinco especies arbóreas que existen dentro del género que fue descrita primeramente por Rzedowski y posteriormente por Robinson como *M. Revealii* (Rzedowski, 1975; Robinson, 1976). El estudio de esta especie dio como resultado el aislamiento de varios diterpenos y mezclas complejas de 6, 12-*cis*-germacrólidas características del género, entre estas, algunas aisladas anteriormente de la misma especie (Reaman, 1984), así como de *M. Hibiscifolia* (Bohlmann, 1984) y *M. Tomentosa* (Castro, 1985). Se aislaron además tres nuevos componentes, los que se nombraron gigantánólidas A, B y C (15-17), las cuales fueron caracterizadas como nuevos miembros de este novedoso grupo. Sus estructuras fueron establecidas con base en sus datos espectroscópicos y algunas transformaciones químicas. La estructura de la gigantánólida A (15) fue confirmada por difracción de rayos X (Quijano, 1987). Los datos indicaron que en el estado cristalino, esta presenta una conformación de tipo silla-bote con los dos grupos metilos *syn* y orientados hacia abajo del plano (a) del ciclodecadieno.



- 15) R = Ang, R' = H
16) R = H, R' = Ang
17) R = H, R' = Mebu

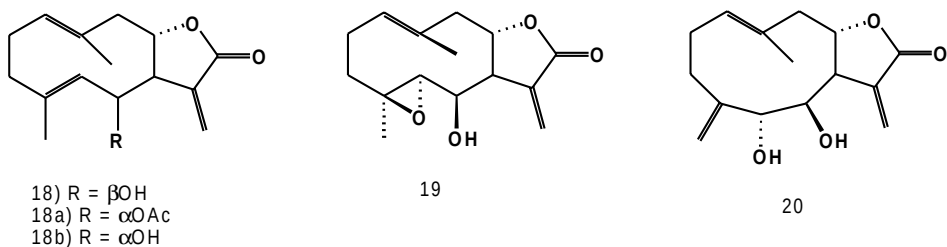
Continuando con nuestros estudios sobre el género hemos analizado algunas especies del subgénero *Acanthocarphae*, Serie *Grandiflorae*, en la que se encuentra la *M. grandiflora*, *M. speciosa*, *M. imbricata* y *M. Bipinnatifida*. Estas especies son similares y los caracteres de los frutos son usados a menudo para distinguirlas.

De la *M. grandiflora* se aisló una 8, 12-*trans*-germacrólida conteniendo un hidroxilo con orientación b en la posición C-6, el cual fue caracterizado

como la 6-epi-desacetil-laurenobiólida (**18**), que puede considerarse precursor de las 6, 12-*cis*-germacrólidas (Quijano, 1984a).

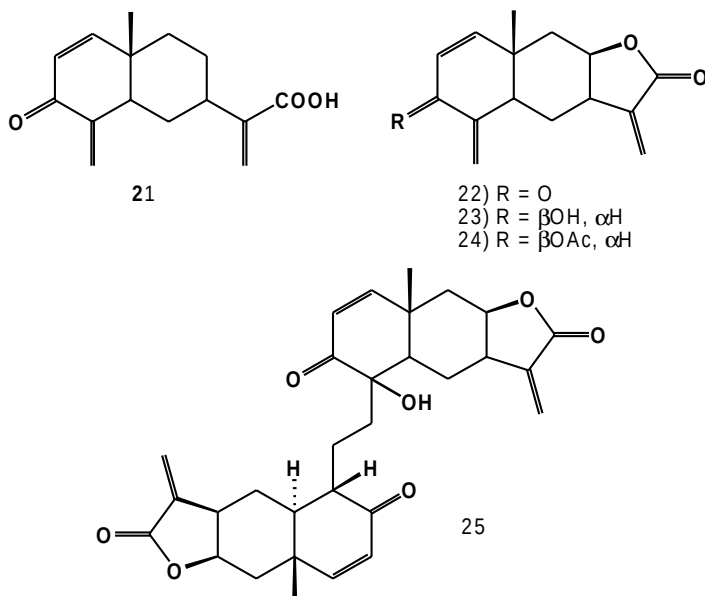
En un estudio posterior de esta especie se aislaron compuestos del mismo tipo que se denominaron 6-epi-specificiformina (**19**) y grandiflorida (**20**), además de los epímeros ya conocidos: laurenobiólida (**18a**), desacetil-laurenobiólida (**18b**) y sus correspondientes derivados cíclicos de tipo eudesmano (resultados no publicados).

Las estructuras y estereoquímica de la 6-epi-desacetil-laurenobiólida (**18**) y la 6-epi-specificiformina (**19**) fueron confirmadas por difracción de rayos X, los resultados indican que en el estado cristalino el ciclodecadieno adopta una conformación poco común, en la cual los grupos metilos se encuentran con una disposición *anti*, en la cual el metilo sobre C-4 se encuentra con orientación a y el metilo sobre C-10 con orientación b (Quijano, 1984a).

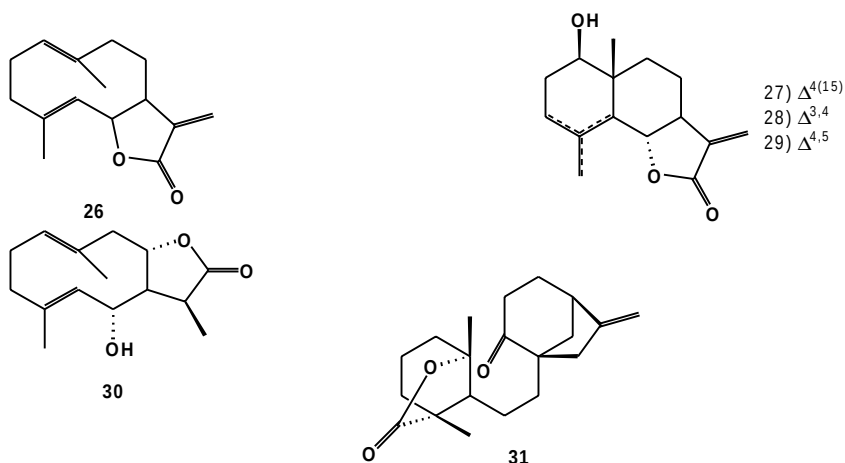


La *M. grandiflora* y la *M. speciosa* son arbustos muy atractivos cuando se encuentran en plena floración. En ambas especies se suelen encontrar ejemplares que presentan flores de las llamadas “formas dobles”. En estos casos la distinción entre ambas especies es muy difícil por lo que son a menudo confundidas. Sin embargo, desde el punto de vista fitoquímico ambas presentan componentes completamente diferentes. Mientras que *M. grandiflora* produce 8, 12-*trans*-germacrólidas, el estudio de *M. speciosa* dio como resultado el aislamiento de compuestos del tipo del eudesmano entre los que se identificaron el ácido 1, 2-dihidro-3-oxo-cóstico (**21**) aislado anteriormente de la misma especie (Seaman, 1985). Así como encelina (**22**), 1, 2-dihidro-3-epi-isotelekina (**23**) y su correspondiente acetato (**24**), además de un nuevo compuesto dimérico al que se nombró hidrox-bis-dihidroencelina (**25**) (Quijano, 1991a).

La *M. bipinnatifida* se encuentra desde Sinaloa hasta Oaxaca entre los 400 y 2000 m snm. También es una especie muy atractiva a menudo cultivada en Argentina, Ceylan, Sur de la India y Florida (EUA). El estudio de *M. bipinnatifida* (resultados no publicados) recolectada en el Estado de Morelos en México resultó en el aislamiento de b-cariofileno, diterpenos, triterpenos



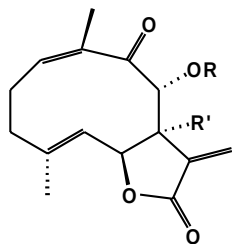
y esteroides comunes en el género, así como b-caroteno y luteína. De las flores se aislaron custunólida (26), reynosina (27), santamarina (28) y magnolialida (29). Del extracto metanólico de las flores se obtuvo ácido aspártico. De otro lote recolectado en el Estado de México, no se aisló ninguno de los compuestos anteriores. En este caso, tanto de flores como de hojas se aisló la desacetil-laurenobiólida (18b) y la 11, 13-dihidro-desacetil-laurenobiólida (30). Entre los diterpenos se aisló el ácido 9b-hidroxi-cinamoilgrandiflorico y un seco-diterpeno que fue identificado por sus datos espectroscópicos y algunas transformaciones químicas como la wedelia seco-kaurenólida (31) aislada anteriormente de *Wedelia trilobata* (Bohlmann, 1981).



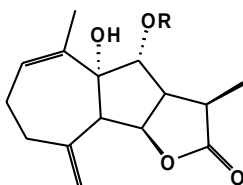
En el subgénero *Acanthocarphae*, serie *Hibiscifoliae*, se encuentran: *M. leucantha*, *M. karwinskii*, *M. atriplicifolia*, *M. pteropoda* y *M. hibiscifolia*.

El estudio de *M. leucantha* subsp. *leucantha* recolectada en el Estado de Zacatecas dio como resultado el aislamiento de diterpenos comunes en el género y varios flavonoides ya descritos que se identificaron como: 5-hidroxi-6, 7, 8, 4'-tetrametoxiflavona, 5-hidroxi-6, 7, 4'-trimetoxiflavona (salvigenina), 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona, 5-hidroxi-3, 7, 4'-trimetoxiflavona y 5, 3, 7, 4'-tetrahidroxiflavona (kaempferol) (Quijano, 1994). Los flavonoides son poco comunes en el género y solo se ha reportado la presencia de la salvigenina en *M. tomentosa* subsp. *tomentosa* (Quijano, 1991) así como de nicotiflorina e isoquercitrina (Oshima, 1986).

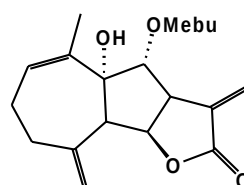
De *M. leucantha* subsp. *leucantha* se aislaron además siete nuevas lactonas sesquiterpénicas: tres de ellas fueron caracterizadas como 9-ceto-melampolidas que se nombraron montaleucanthólidas A, B y C (32-34). Las otras cuatro (35-38) poseen un nuevo tipo de esqueleto con anillación 7-5-5, que fue nombrado como montahibisciólida, el cual puede originarse a partir de las 9-ceto-melampolidas, como fue sugerido por Bohlmann (1984). Las estructuras de estos nuevos compuestos fueron determinadas con base en sus datos espectroscópicos, principalmente de RMN ^1H y comparación con los reportados previamente. Ambas estructuras fueron confirmadas por difracción de rayos X (Quijano, 1994).



- 32) R = iBu, R' = H
33) R = Mebu, R' = H
34) R = Ang, R' = OH



- 35) R = Mebu
36) R = iBu
37) R = Ang



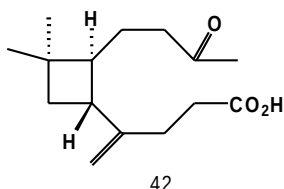
38

Desde el punto de vista fitoquímico los resultados obtenidos en este estudio muestran una cercana relación de *M. leucantha* subsp. *leucantha* con *M. hibiscifolia*, ya que los compuestos aislados de ambas especies guardan una estrecha relación estructural.

M. karwinskii está relacionada con *M. atriplicifolia* y *M. pteropoda* con la que comparte algunos caracteres morfológicos. De las hojas de esta especie, hemos aislado además de compuestos ampliamente distribuidos en el género, varias lactonas sesquiterpénicas entre las que se identificaron tres nuevas 4,

5-epoxi-12, 6-*cis*-germacrólidas que se nombraron karwinsinólidas A, B y C (39-41) (Quijano, 1995) y cuyas estructuras están íntimamente relacionadas con aquellas obtenidas de *M. mollisima* y en menor grado con las obtenidas de *M. pteropoda*, *M. atriplicifolia*, *M. hibiscifolia*, *M. guatemalensis*, *M. gigas*, *M. leucantha* subsp. *leucantha* y algunas colecciones de *M. tomentosa* subsp. *xanthiifolia* hechas en Guatemala (Seaman, 1985a) y Costa Rica (Castro, 1985).

Se aisló además un derivado del cariofileno, el cual fue identificado con el ácido 4-hidroxi-4, 5-secocariofilen-5-oico (42) (Quijano, 1995).



De acuerdo con los datos aquí descritos, podemos concluir que desde el punto de vista fitoquímico, el género *Montanoa* muestra una marcada homogeneidad en cuanto que la mayoría de especies producen 6, 12-*cis*-germacrólidas, pudiendo considerarse estos metabolitos como característicos del género. Sin embargo *M. tomentosa* produce principalmente 6, 12-*trans*-germacrólidas, aunque en algunas poblaciones colectadas en Guatemala y Costa Rica se ha detectado la presencia de 6, 12-*cis*-germacrólidas.

Referencias

- Bohlmann F, Ziesche J, King RM, Robinson H. 1981. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. *Phytochemistry* 20: 751-756.
- Bohlmann F, Schmeda-Hirrichmann G, Jakupovic J, Castro V, Ciccio JF, Calvo G. 1984. Further 6, 12-*cis*-germacranolides and eudesmanolides from *Montanoa* species. *J Nat Prod* 47: 663-672.
- Caballero Y, Walls, F. 1970. Productos Naturales del Zoapatle. *Bol Inst Quim UNAM* 22: 79-102.
- Castro V, Jakupovic J. 1985. Two further 6, 12-*cis*-germacranolides from *Montanoa tomentosa* subsp. *xanthiifolia*. *Phytochemistry* 24: 2449-2450.
- Funk VA. 1982. The systematic of *Montanoa* (Asteraceae, Heliantheae). *Mem N Y Botan Garden* 36: 1-133.
- Geissman TA, Griffin TS. 1971. Sesquiterpene lactones. Tomentosin from *Montanoa tomentosa* Cerv. *Rev Latinoamer Quim* 2: 81-83.

- Oshima Y, Wong SM, Konno C, Cordell GA, Waller DP, Soejarto DD, Fong H HS. 1986. Leucanthanolide, a novel sesquiterpene lactone from *Montanoa leucantha* ssp. *leucantha*. J Nat Prod 49: 313-317.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez F, Rios T, 1979. Montafrusin, a new germacrolide from *Montanoa frutescens*. Phytochemistry 18: 843-845.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G, Rios T. 1982. Zoapatanolide A and B, two new heliangolides from *Montanoa tomentosa*. Phytochemistry 21: 2041-2044.
- Quijano L, Gómez-GF, Calderón JS, López-P J, Rios T. 1984. Zoapatanolides C and D, two guaianolides from *Montanoa tomentosa*. Phytochemistry 23: 125-127.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G F, López-P J, Rios T, Fronczek F. 1984a. The crystal structure of 6-epi-desacetyllaurenobiolide, a germacra-1(10), 4-dien-12-olide from *Montanoa grandiflora*. Phytochemistry 23: 1971-1974.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G, Rosario MV, Rios T. 1985. Oxepane diterpenoids and sesquiterpene lactones from 'zoapatle' (*Montanoa tomentosa*), a Mexican plant with oxytocic activity. Phytochemistry 24: 2337.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G F, Bautista Rios T, Fronczek F. 1986. Montafrusin B, a germacrolide from *Montanoa frutescens* and the molecular structure of montafrusin A. Phytochemistry 25: 695-697.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G F, Angulo-M M, Rios T. 1987. Sesquiterpene lactones from *Montanoa gigas* and the crystal structure of gigantanolide A. Phytochemistry 26: 2589-2592.
- Quijano L, Calderón JS, Gómez-G, Sierra RE, Rios T. 1991. Acyclic diterpenes and sesquiterpene lactones from *Montanoa tomentosa* subsp. *tomentosa*. Phytochemistry 30: 1947-1950.
- Quijano L, Gómez-GF, Trejo RI, Rios T. 1991a. Hydroxy-bis-dihydroencelin, a dimeric eudesmanolide and other eudesmanolides from *Montanoa speciosa*. Phytochemistry 30: 3293-3295.
- Quijano L, Trejo RI, Collera O, Rios T. 1994. Sesquiterpene lactones from *Montanoa leucantha* subsp. *leucantha*. Phytochemistry 36: 1243-1248.
- Quijano L, Vasquez-CA, Rios T, 1995. Sesquiterpene lactones and a seco-caryophyllene derivative from *Montanoa karwinskii*. Phytochemistry 38: 1251-1255.
- Robinson H, 1976. Three new Asteraceae from Guerrero, Mexico. Phytologia 33: 285-292.
- Rzedowski J, 1975. Tres dicotiledóneas mexicanas de posible interés ornamental. Bol Soc Bot México 35: 37-50.

Seaman FC, Malcolm AJ, Fischer NH, 1984. Germacra-12, 6 α -olides from *Montanoa revealii* and *M. mollissima*. *Phytochemistry* 23: 1063-1066.

Seaman FC, Bencsath A, 1985. A eudesmane acid from *Montanoa speciosa*. *Phytochemistry* 24: 607-608.

Seaman FC, Malcolm AJ, Fischer NH. 1985a. Sesquiterpene lactones of *Montanoa guatemalensis* and *Montanoa tomentosa* subsp. *xanthiifolia*. *Phytochemistry* 24: 2003-2005.

COMENTARIOS AL TRABAJO DEL PROFESOR QUIJANO

El género *Montanoa* Cero. es uno de los más atractivos de la familia de las Compuestas y la tribu *Heliantheae*. La mayoría de sus miembros son arbustos, aunque en algunos casos son verdaderos “árboles de margaritas”. Estas especies son verdaderamente espectaculares cuando se encuentran en plena floración, por lo que algunas de ellas son cultivadas con fines ornamentales. El género se encuentra ampliamente distribuido en Latinoamérica desde México hasta Perú. Una de las especies más conocidas por sus propiedades oxitócicas es la *M. tomentosa* que se conoce popularmente como “zoapatle” que en Nahuatl significa “medicina para la mujer” (cihuatl: mujer y pahtli: medicina). Esta especie ha sido usada en México desde tiempos prehispánicos para inducir las contracciones uterinas durante el parto, para el tratamiento de algunos desórdenes del sistema reproductivo en las mujeres o con fines abortivos.

En esta conferencia el Profesor Leovigildo Quijano, de la Universidad Autónoma de México, hizo una revisión de las lactonas sesquiterpénicas aisladas de diferentes especies del género *Montanoa* y sus relaciones estructurales y taxonómicas. Los resultados mostrados (cerca de medio centenar de compuestos), obtenidos durante muchos años de trabajo, corresponden a los metabolitos (composición química) de muchas especies pertenecientes a este género.

Finalmente, vale la pena mencionar que el tema de esta conferencia, nos lleva a concluir que en estas especies del género *Montanoa*, los metabolitos mayoritarios producidos son las sesquiterpenlactonas, con diversas variaciones estructurales, según de la especie de donde provengan. Sin embargo, la *M. tomentosa* además de las sesquiterpenlactonas produce principalmente 6, 12-trans-germacrólidas, aunque en algunas poblaciones colectadas en Guatemala y Costa Rica se ha detectado la presencia de 6, 12-cis-germacrólidas. Pensamos, aunque el conferencista no lo menciona, que estos últimos compuestos pudieran ser los responsables de la acción antiabortiva que muestra esta especie.

Aunque no se presentaron estudios de actividad antiabortiva de los compuestos aislados, estos resultados nos sirven de ayuda en Colombia en caso de querer incursionar en esta línea de investigación buscando extractos de estas plantas para preparaciones farmacéuticas con esta actividad específica.

Ciencia *vs.* Sociedad. La búsqueda de sustancias bioactivas de la flora colombiana

Fernando Echeverri¹

Introducción

La naturaleza ha suministrado al hombre una amplia gama de materiales y moléculas con las cuales éste se ha curado, asesinado, embellecido y decorado su cuerpo, además de alimentarse y vestirse. De esta manera le ha ofrecido sustancias para usarse en forma cruda o bien se refinan y transforman en los laboratorios de química y en última instancia en una industria (Tabla 1). En un sentido muy general, la naturaleza provee en última instancia modelos químicos, bioquímicos y fisiológicos que cumplen algunas de las funciones anteriormente enunciadas¹⁻⁶.

La mayor parte de esos organismos, de lo que globalmente se conoce como biodiversidad, está localizada en una estrecha franja alrededor del Ecuador, en la que además paradójicamente se encuentran también los países menos desarrollados y que urgen de ella para enfrentar problemas sanitarios y económicos. Históricamente muchos de esos materiales se tomaron de sus fuentes naturales sin que mediara una autorización para colectarlos, e incluso para utilizar la información inherente a su uso y propiedades.

Supuestamente esta patente de corso hizo carrera hasta 1992, año en el cual se llevó a cabo en Río de Janeiro la Convención para la Diversidad Biológica (CDB)⁷, que puso coto a esos desafueros formulando tres pilares fundamentales para explorar y explotar la biodiversidad:

¹ Universidad de Antioquia- ACCEFYN, Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, Sede de Investigaciones Universitarias Lab. 2-234. Correo electrónico: echeverri@udea.edu.co

Antibióticos: Penicilinas - Eritromicina - Tetraciclina - Rifampicina- Kanamicina - Cloramfenicol Anfotericina - Polimixina - Nucleosidos Antivirales
Antiparasitarios: Emetina - Avermectinas
Antitumorales: Vinca - Camptotecina - Taxol - Etoposido - Daunorubicina
Antihipertensivos: Reserpina - Captopril - Enalapril
Antiinflamatorios: Aspirina - Colchicina - Inhibidores COX
Inmunología: Ciclosporina - Lentilan
Analgésicos: Morfina - Epibatidina - Ergots - Conotoxinas
Esteroides: Antiinflamatorios, Cardíacos, materia prima para Anticonceptivos
Antimaláricos: Artemisinina - Quinina
Colorantes: Carotenos - Alizarina - Antocianinas- Azul Jagua
Edulcorantes/saborizantes/Aditivos: Eugenol - Anetol - Mentol - Miristicina
Esteviosido - Capsaicina - Papaína - Bromelína
Sicoactivos: Cannabinoides - Heroína -Cocaína - Psilocibina - LSD
Varios: Silimarina - Aescina - Prostanoides - Codeína - Efedrina - Ginkgolidos - Gingsenosidos - Galanthamina - Sennosidos - Psoraleno - Fisostigmina - Atropina- Tubocurarina - Aromas - Lacas - Resinas -Taninos - Cosméticos
Cosmética: Bothos - Pigmentos - Perfumees - Geles- Ambreina
Tóxicos: Brucina, Estricnina - Batrachotoxina, Ciguatoxina, Miserotoxina,
Agropecuaria: Feromonas - Piretroides - Nicotina - Hormonas Vegetales - Dicoumarol
Materiales: Fibras (seda, lino), lacas, resinas, pigmentos

Tabla 1. Algunas sustancias bioactivas provenientes de la biodiversidad.

- Su conservación
- El uso sostenible de sus componentes
- La distribución justa y equitativa de los beneficios de uso

Además estableció como requisito fundamental “el consentimiento previo informado” con el poseedor de la biodiversidad, es decir, la obligación por parte del interesado de suministrar datos veraces acerca del objetivo de su búsqueda y el producto final que se desea obtener. Por tanto se han discutido algunas maneras de proceder de una forma políticamente correcta con los lineamientos de la CDB⁸.

Desde entonces surgieron dos nuevos términos en la literatura científica. El primero de ellos es Bioprospección, para describir esa serie de actividades concatenadas entre la sociedad (comunidades), los investigadores y las empresas con el fin de darle uso a un recurso natural. Y el segundo término, Biopiratería, se acuñó para todas aquellas actividades en las cuales se accedía a un recurso o a una información sin el permiso del poseedor.

La biodiversidad es una riqueza que trasciende el potencial económico, ya que además de ser una alternativa para mejorar la calidad de vida de la humanidad, es un patrimonio para las próximas generaciones. Además el valor de la biodiversidad oscila entre lo inconmensurable y lo inútil, según de quien se trate, poseedor o empresario. Por otra parte, existen situaciones que ponen en franco riesgo la existencia y uso adecuado de esa biodiversidad y que incluyen factores políticos, científicos y sociales. No siempre los modelos científicos y la logística empresarial del tercer mundo propenden por la apropiación de esos productos de la biodiversidad. Cada uno va por su lado, haciendo ciencia y dinero, pero la primera actividad a ritmos desesperadamente lentos y económicamente ineficientes. Estos hechos se conjugan habitualmente con las políticas erráticas (o inexistentes) de estado y de sus agencias para el fomento y la promoción científica, la crónica carencia de recursos destinados a dicha actividad, la incompetencia burocrática y otro conjunto de situaciones que más parecen estar dirigidas hacia la extinción de cualquier intento de investigación científica apropiable por la sociedad que hacia su implementación.

En este trabajo se analiza la problemática del uso de la biodiversidad enfocada hacia la perspectiva de la búsqueda de nuevos fármacos, a partir del análisis de tres circunstancias: los aportes de la biodiversidad como fuente de moléculas bioactivas y las ficciones que derivan, la problemática del megadiverso, y finalmente un profundo análisis del papel de la ciencia en la sociedad del Tercer Mundo.

A continuación veremos cómo ese celo excesivo, las malas prácticas empresariales, el desconocimiento social y la desidia estatal han forjado una serie de curiosas expectativas que caen más en el terreno de la ficción que en las directrices de la CDB.

La biodiversidad como fuente de moléculas bioactivas. Realidades y ficciones

Se han tejido muchos sueños y esperanzas alrededor de la biodiversidad, pero muy pocas son hoy realidades tangibles. Una mezcla de nacionalismo, intereses comerciales, jugadas políticas e ingenuidad se han mezclado para impedir su uso. Y mientras se tejen esos sueños, la biodiversidad disminuye, reduce su valor y su precio y muere más gente que tal vez hubiese podido sanar con un desarrollo racional de algunos de sus productos; además se incrementan las importaciones de bienes que pueden ser reemplazados fácilmente con sus productos y se pierden oportunidades de abrir nuevos mercados externos, generar empleo y hacer un uso racional de la

biodiversidad. Solo están quedando algunas ficciones, que se describen a continuación (Figura 1).

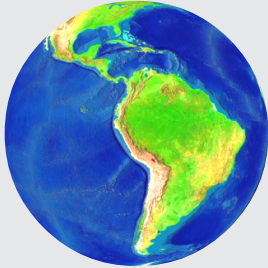
1. La farmacia de la selva... "Medicina tradicional" 2. "Somos los únicos en poseer. ..." 3. CDV vs "Vamos a salir de pobres y pagaremos la deuda externa¡¡¡¡¡" 4. La Biodiversidad no vale nada. Es un oro verde que ya no le interesa a nadie¡ 5. La Biodiversidad es la única fuente de nuevos medicamentos 6. Es una riqueza Inalienable, Imprescriptible e Inembargable: Eterna 7. La Biodiversidad es patrimonio de todos 8. La inversión en investigación aplicada proviene de fondos privados 9. Hay que investigar/desarrollar productos de acuerdo a los modelos EEUU-Europa-Japón 10. Con tanta riqueza y no hemos sacado ni un matapulgas¡¡¡	
---	--

Figura 1. Realidades y ficciones alrededor de la biodiversidad.

1ª Ficción. La farmacia de la selva... "Medicina Tradicional".

La medicina tradicional, entendida como la serie de prácticas que usan conocimientos y materiales vernáculos de cada país o región con fines curativos, parece ser más un rito exótico y relegado a aquellas poblaciones rurales, olvidadas por los estados y carentes de otra opción sanitaria; en la etnomedicina urbana otra es la realidad. Hay pruebas evidentes: la lista de plantas medicinales permitidas en Colombia tiene menos de un 20% de plantas nativas y la mayoría de ellas son básicamente tisanas y alimentos que alivian los síntomas pero no curan las enfermedades⁹.

Buena parte de sus recomendaciones son de naturaleza digestiva y de ellas cabe resaltar un altísimo porcentaje contra la flatulencia, que no es una enfermedad de alto ni mediano ni bajo riesgo. Y a lo mejor no es ni una enfermedad. No se aprecian formulaciones contra nuestros males endémicos: parásitos internos y externos, malaria, leishmania, tuberculosis o virosis

y menos aun para cáncer y unos pocos (si los hay) son antihipertensivos. Este panorama general no es exclusivo de Colombia, sino que está ampliamente diseminado por Suramérica y Centroamérica¹⁰.

Por otra parte, la medicina tradicional es una moda como cualquier otra. Así, en Colombia antes de los años setenta (y aún ahora) se usaron las Tisanas, la Marihuana y el Ajo (que nunca han pasado de moda) y la Chuchuhuaza. Poco después el Aloe y el Anamú y más recientemente el Fríjol de la India (causante de la muerte de varias mujeres en la ciudad de Medellín, en su afán de adelgazar), el Confrey (o Comfrey, prohibido en Estados Unidos), la Uña de Gato (de Perú o Surinam, y en su mayor expresión comercializada como tal todo material vegetal que tuviera espinas). Luego llegó la época del jugo más costoso de la historia, el Noni (originario de las islas del Pacífico) y recientemente la Echinaceae o Equinacia (vendida por firmas norteamericanas), la hierba de San Juan (Europa) y el Almendro (de la medicina tradicional hindú) (Figura 2). Adicionalmente, el país importa casi un 70% de los insumos para productos naturales que se expenden como tales. Un lamentable panorama para quienes aún creen que usamos nuestra riqueza biológica y la tradición etnomédica. Más aún,

¿Es Medicina Tradicional?

- TISANAS*
- AJO
- QUASSIA
- SALVIA
- CHUCHUHAUAZ
- MARIHUANA
- ALOE
- ANAMÚ

* Lista INVIMA

- FRÍJOL DE LA INDIA
- CONFREY (China??)
- UÑA DE GATO (Perú)
- ECHINACEA (EEUU)
- NONI (EEUU)
- HIERBA DE SAN JUAN (Europa)
- ALMENDRO



Es atóxica y segura. Mejor que los... “Químicos” (i)
 Lista INVIMA: Laxante, Apetito, Fibra, Inflamación... Flatulencia, Constipación
ÚNICAMENTE PARA SÍNTOMAS

Figura 2. Medicina tradicional en Colombia.

los usos de esas plantas y de otras con fama de medicinales son incrementales y sin ninguna base científica o experimental. Inicialmente su introducción en el mercado se hace para una aplicación terapéutica, luego se adicionan dos o tres recomendaciones más y a partir de allí hay un par de alternativas que incrementan su valor: por una parte se recomienda para reducir el colesterol, adelgazar y para controlar desórdenes nerviosos o bien, entra en la lista de anticancerosos, luego antisida y finalmente obtiene su máxima apreciación en la terapia de problemas sexuales, incluyendo su uso como afrodisíaco. Todo ello muy distante de su recomendación farmacológica original; existe además el riesgo toxicológico que ya ha cobrado varias vidas, pues la gente de manera errónea asume que todo lo natural es inocuo^{11, 12}.

2ª Ficción. “Somos los únicos en poseer... y además somos el país más rico en ...”

Un desaforado afán nacionalista cubre esta aseveración, que también tiene su componente económico, pues de esta manera el exotismo y la presunta escasez le dan una valor agregado importante a la biodiversidad. No obstante la naturaleza no seleccionó en cuál país desarrollarse; la diversidad biológica sufre modificaciones más drásticas tanto por razones geográficas (cordilleras, ríos, etc.) como por los cambios en latitud más que en longitud. Así, muy buena parte de la biodiversidad de Colombia en el oriente es similar a la llanura y a la zona andina venezolana, y la selva amazónica es similar a la de Perú, Ecuador y Brasil. Sin embargo, es drásticamente diferente de los bosques y selvas yucatecos en México o de la Pampa Argentina. Esto significa que si un país hace un acción tendiente a licenciar el acceso a la biodiversidad de esas zonas limítrofes, afectará a sus países vecinos; por esta razón se propone muy acertadamente conformar un “Cartel de la Biodiversidad”¹³, para acordar las condiciones y costos de los accesos, pues de lo contrario lo que tiene precio en un país tendrá también su contraprecio en otro, situación que se podría aprovechar para lograr más ventajas para una industria al momento de las negociaciones.

Si bien existen algunas zonas o regiones prácticamente intactas por las condiciones geográficas, las enfermedades o la violencia, la mayor parte de Suramérica así como África, han sido durante siglos objeto de expediciones (Botánica por ejemplo), exploraciones, proyectos de evaluación, búsqueda de nuevos materiales (nuevas drogas para la segunda guerra mundial o la de Corea o la de Vietnam, de caucho), construcción de represas, prospecciones madereras, navegabilidad de ríos, excursiones turísticas, etc. etc. Prueba de ello es que las mejores colecciones de organismos (plantas, aves, mamíferos) se encuentran en los jardines y museos de Norteamérica y de Europa y no en los países de origen. El caso del Tapón del Darién colombia-

no es otro claro ejemplo, pues es una zona intrincada compartida con Panamá, en la cual se asentaron durante muchas décadas entidades científicas y comerciales de los Estados Unidos. ¿Hasta qué extensión de la costa pacífica colombiana es tan exótica la biodiversidad?

Por otra parte, la riqueza biológica no puede medirse por el número de especies sino por su variabilidad genética, que en términos normales equivale a la diversidad molecular que cumple diversas funciones específicas en un organismo^{14, 15}. Esto significa que no es más rica una zona que tenga por ejemplo 100 ejemplares de la misma especie, todos con las mismas moléculas, que otra zona que posea solo diez especies diferentes entre sí, pero con cinco o seis metabolitos diferentes, cada uno de ellos con diferentes propiedades biológicas. Y para efectos financieros, el costo del acceso a una zona muy rica como el Chocó no será el mismo que la zona ganadera de Córdoba.

3ª Ficción. Convenio por la Diversidad Biológica vs. “¡Vamos a salir de pobres y pagaremos la deuda externa!”

La valoración de la biodiversidad también es un problema muy grande, pues cualquier cifra es poca para calcular su valor tangible en un futuro producto farmoquímico¹⁶. Si Costa Rica recibió 11 millones de dólares por el acceso a su biodiversidad durante 11 años¹⁷ y tiene aproximadamente el 5% de la diversidad mundial, una sencilla operación matemática demuestra que la biodiversidad mundial vale algo así como 200 millones de dólares, una cifra muy alejada de la que producen los farmoquímicos en el mercado. Así, las ventas de estatinas (derivadas del conocimiento de la estructura y mecanismo de acción de una sustancia natural) entre 2002-2004 fueron del orden de 43.000 millones de dólares, compartidos entre Pfizer y Merck¹⁸. En el panorama más pesimista de buscar un nuevo producto farmoquímico, su investigación y desarrollo cuestan cerca de 802 millones de dólares¹⁹, pero la ganancia sigue siendo muy alta: si suponemos una ganancia neta del 20% ello equivale a 8.600 millones dólares, es decir casi diez veces la inversión. Y eso solo en tres años de prescripciones. Y para un solo producto. En este mismo orden de ideas caben también, por ejemplo, los inhibidores de COX-2, cuya existencia se debe al conocimiento del mecanismo de acción de la aspirina (derivado de un producto natural) y de sus efectos secundarios, que en el mismo período tuvieron ventas por valor de un poco más de ocho mil millones de dólares¹⁸.

Sí, la biodiversidad tiene un valor incalculable en términos mercantiles, pero hay un error cuando se piensa que las arcas de los estados se colmarán con los fondos provenientes de su acceso y explotación. El Convenio por la Diversidad propuso acertadamente que esos dineros se deben dirigir a suplir

necesidades de las comunidades locales propietarias del material biológico y genético y del conocimiento tradicional, no a los estados. Y que en lo posible, dicha retribución no sea en dinero sino en elementos necesarios para la comunidad tales como escuelas, electricidad, alcantarillas, becas, y eventualmente para los estados en un rubro dedicado exclusivamente al mantenimiento y preservación de la misma biodiversidad. Ahora bien, las empresas tampoco ofrecen un margen de retribución acorde con sus futuras ganancias. A lo sumo ofertan un 3% a 5% de las ganancias futuras, pero reembolsables después de los 10 a 14 años que dura el proceso de investigación, desarrollo y mercadeo. Y en verdad las necesidades de las comunidades son tan grandes que unos pocos meses de espera son para ellas toda una eternidad.

4ª Ficción. La biodiversidad es la única fuente de nuevos medicamentos

Casi desde el mismo inicio de la implementación del CDB hasta entrados algunos años del siglo XXI hubo una automoratoria de la industria farmoquímica para explorar y explotar la biodiversidad. Los estados, a falta de reglamentaciones claras y precisas, cerraron sus fronteras, implementaron legislaciones de última hora e incrementaron al máximo los requisitos de acceso. Dedujeron también las empresas que bioprospectar los podía presentar ante la sociedad como biopiratas, lo cual se constituía en una amenaza a la cotización de sus acciones en las bolsas de valores. Dicha situación bien la describe un empresario afirmando que los únicos beneficiados de la biopiratería son los abogados, ya que amparados en las ONG prácticamente chantajea a los laboratorios farmoquímicos con acusaciones de este tipo²⁰.

Forzados a buscar nuevas fuentes de moléculas, las empresas dirigieron sus esfuerzos hacia la Química Combinatoria y la Química Computacional *In Silico*²¹; además se amplió el panorama con métodos de ensayos más rápidos y precisos (highthroughput y ultraHTS screening).

Por otra parte se tomaron los organismos marinos²² (difíciles de definir geográficamente por la inmensidad del mar y de los cuales ya tenían grandes reservorios), los bancos de extractos y de sustancias producto de anteriores bioprospecciones, nuevos microorganismos secundarios para nuevas aplicaciones²³ (Figura 3). Y el azar también tuvo su cuota importante: el viagra es fruto del mismo. Hoy se reconoce que la biodiversidad vegetal no es fundamental para obtener nuevos medicamentos, ya que las plantas están agotando su arsenal de nuevos núcleos de metabolitos secundarios. (mixomicetes y mixobacterias), drogas antiguas con nuevas prescripciones, sustancias que en anteriores estudios estuvieron en el limbo (taxol, etopósido) y análisis de efectos.

EL ORIGEN DE LOS FÁRMACOS

- La naturaleza
 - Plantas: Vinca, Digitalicos
 - Mar, Microorganismos
 - Ingeniería Metabólica
- La síntesis orgánica "al azar"/Biodirigida
 - 10.000 a 1
 - Química Combinatoria
 - Ensayos HTS/UHTS
- Modelación Molecular/
 - Bibliotecas Virtuales
- Viejas drogas:

Toda la toxicología y afines ya hechas;
- El azar
 - Viagra



Figura 3. Las fuentes de moléculas bioactivas.

Para comienzos de este siglo ha ocurrido un nuevo acercamiento a la biodiversidad, en lo que se ha llamado el Renacer de los Productos Naturales²⁴⁻²⁷, pero los empresarios también han modificado los estilos de acercarse a ella. Ya la gran industria farmoquímica no se apropia institucionalmente del proceso de investigación y desarrollo, sino que hace outsourcing, alquila los bancos de extractos y moléculas y busca intermediarios para colectas de material y de datos que les protejan de eventuales acusaciones de biopiratas.

5ª Ficción. La biodiversidad no vale nada. Es un oro verde que ya no le interesa a nadie

Así como algunos le ponen un alto precio a la biodiversidad, también existe una campaña para disminuir su valor asumiendo que la biodiversidad es un oro verde que ya no le interesa a nadie y argumentando que los laboratorios no necesitan de ella para desarrollar sus nuevos productos^{29, 30} (Figura 4). Craso error, pues en la actualidad los nuevos estilos de vida del hombre urgen hacia el uso de otros ingredientes naturales para alimentarse, acicalarse, curarse, combatir pestes de cosechas e incrementar la productividad del agro, entre otras.

“Prospecting the full biodiversity of nature to find leads for new drugs is not necessary. Because finding leads is aimed at identifying biological activity, structure is of secondary importance”



Biodiversity and Conservation 12: 207–216, 2003.
© 2003 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Bioprospecting – why is it so unrewarding?

RICHARD D. FIRN

Department of Biology, University of York, York YO1 5DD, UK (e-mail: r.d.firn@york.ac.uk; j.04432880)

COMBINING HIGH RISK SCIENCE WITH AMBITIOUS SOCIAL ECONOMIC GOALS

Geoforum
Volume 34, Issue 2, May 2003, Pages 221–233

doi:10.1016/S0924-6460(03)00088-X © Cite or link using doi
Copyright © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

The state and the regulation of biodiversity

International biopolitics and the case of Mexico

Ulrich Brand and Christoph G6rg

Department of Social Sciences, Kassel University, 60385 Frankfurt/Main, Germany

MOLECULAR THERAPY
The Journal of the American Society of Gene Therapy

Editor-in-Chief
Inder M. Verma

Biopiracy: Distrust Widens the Rich–Poor Divide

“Nature distributed medicine everywhere.” —Pliny the Elder, circa A.D. 77

Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery?

Martin Tulp and Lars Bohlin

Prospecting the full biodiversity of nature to find leads for new drugs is not necessary. Because finding leads is aimed at identifying biological activity, structure is of secondary importance. Furthermore, although natural chemical diversity might be essential, functional diversity is bound to be considerably less. It is likely that many millions of chemically distinct molecules exist in nature but it is unreasonable that the number of different biological functions is near this number. This is corroborated by knowledge obtained from the genome sequences of an increasing number of species. It is unlikely that ligands for specific molecular targets are restricted to one species and even individual compounds are often found in more than one species. Important molecular mechanisms are likely to be ubiquitous and there are no prior reasons to assume that some are restricted, for example, to tropical rainforests. Thus, there are no obvious advantages of biodiversity prospecting, which will, possibly, undergo higher scepticism in the search for new drugs.

In contrast, the use of natural products has been the single most successful strategy in the discovery of new medicines [1]. Not only have most medical breakthroughs been based on compounds of natural origin, such compounds also represent a large share of the market. In 1999 half of the top 20 best-selling drugs were natural products, and their total sales amounted to \$15.6 billion [2]. Of the ~500 new chemical entities approved by regulatory authorities

announced in the past decade, nearly half are of natural sources [3]. Thus, it is likely that newly identified natural compounds will continue to reach the market at the expense of synthetic drugs in the near future [4].

What are the reasons why natural compounds will continue to be successful in drug discovery? (1) View of the currently available classes of drugs under consideration of products to be developed as original leads. This applies not only to industrially developed drugs, but also to new drugs such as the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, and naturally important antibiotics, immunosuppressants, and anticancer drugs. For many of these drugs, synthetic counterparts have not yet been developed (Table 1). (2) In most drug development projects, leads, natural compounds with the same molecular structure have been identified subsequently. For example, some flavonoids are agonists at the benzodiazepine site of the GABA_A receptor, anxiolytics, and natural compounds such as hyperforin from *Hypericum perforatum* [5]. It has a weak and partial inhibitory effect on the GABA_A receptor (Table 2). (3) There are many targets for which natural compounds have been identified, although analogues have yet been developed (Table 3).

The number of different plant species is estimated at over a quarter of a million but only a small fraction of these have been studied [6]. Eighty per cent less investigated sources, such as microorganisms and marine organisms, have also remained to be studied (Table 4). 100,000 natural compounds [1], a number that grows at a rate of 4000 per year [6]. Because the full diversity of species on earth is unknown [7], extrapolations of the total number of different natural compounds are extremely speculative. Nevertheless, to assume there are many millions is a conservative estimate. Ignoring the biodiversity and those of other natural compounds have reduced the range of functions. It is important to assume that many be regarded as biologically active. It is not thinkable that there are many different molecular targets.

Figura 4. Los debates sobre bioprospección y las posibilidades de la biodiversidad.

6ª Ficción. La biodiversidad es una riqueza Inalienable, Imprescriptible e Inembargable. Es Eterna.

Erróneamente, también se piensa que la biodiversidad durará siempre. No se presta atención a muy diversos factores que atentan contra ella: la deforestación, la colonización, la siembra de cultivos ilícitos, el empleo de herbicidas como el glifosato, la minería incontrolada y la introducción de especies no nativas, la están acabando paulatinamente.

Pero existen otras amenazas que ponen en franco riesgo la biodiversidad o que al menos impiden su correcta utilización y que son inherentes a cada país (internas) o bien se relacionan más con el desequilibrio de su capacidad científica propia y la del entorno científico (externas). Entre los riesgos internos están la fuga de material, principalmente por el sector académico, en actos de buena fe. Pero también atentan contra ella la falta de inventarios, la depredación causada por el comercio indiscriminado de productos naturales y la indiferencia política y empresarial (Figura 5). Y un régimen de acceso que por su complejidad favorece más la biopiratería que el apego a la ley.

BIODIVERSIDAD: RIQUEZA FRÁGIL**AL INTERIOR**

- El producto natural NO siempre ES lo importante
(El modelo, la actividad y la información)
- Fuga de material:
Tesis, intercambios, colaboraciones, colectas, ventas, convenios, ofertas
- Incertidumbre para demostrar material de origen
- Depredación. Abuso de la “medicina tradicional”
- Legislación obsoleta, contradictoria, no operativa
 - Falta de Interés Académico
 - Carencia de Interés Industrial
- La percepción social y política de la investigación

Figura 5. Amenazas internas a la biodiversidad.

Por otra parte, también hay amenazas externas que se relacionan fundamentalmente con la biopiratería y con la disponibilidad de medios científicos y tecnológicos en otros países que hacen relativamente fácil conocer la información contenida en organismos³¹⁻³⁶. No basta creer que “somos los únicos en poseer...”, ya que no siempre importa el material como tal (la hoja, el insecto, la esponja marina, los microorganismos) sino la información que lleva en sí mismo: una molécula, un mecanismo de acción, una interacción bioquímica (Figura 6).

Desde esta perspectiva la biodiversidad es una riqueza transiente, pues una vez se ha tomado esta información, cesa el interés por el recurso biológico, ya que en los laboratorios de biología molecular, cultivo de tejidos, síntesis orgánica y química combinatoria y computacional, se pueden replicar y mejorar rápidamente³⁷⁻³⁹.

Tratar de seguirle la pista a una molécula desde su material de origen hasta el producto desarrollado es una labor difícil con muchas probabilidades de fracasar; por ejemplo los piretroides de hoy en nada se parecen estructuralmente a las piretrinas naturales y como tal puede ser imposible reclamar derechos por un país, debido a que alguien se apropió del recurso

BIODIVERSIDAD: RIQUEZA FRÁGIL**AL EXTERIOR**

La Biopiratería en los Productos Naturales
(Aprovechamiento de un recurso sin el consentimiento del poseedor)

- Propagación por Cultivo de Tejidos (Herbario, J. Botánicos)
- Captura de material genético
- Purificación e Identificación por medios avanzados
- Síntesis Rápida y Masiva
- Modelación Molecular
- Screening Highthroughput HTS y UHTS
- Publicaciones y Patentes
- El producto natural NO siempre ES lo importante
Lo son los Modelos Químicos, Bioquímicos, Fisiológicos.

Figura 6. Amenazas externas a la biodiversidad.

sin su consentimiento. Los derechos de propiedad de la biodiversidad han avanzado muy rápidamente hacia la comercialización de otro tipo de bienes: la Universidad de California compró al gobierno de Samoa el gen involucrado en la biosíntesis de la prostratina⁴⁰, un reactivador de latencia del virus del SIDA e importante en la futura terapia de esa enfermedad. Ya no solo se comercializa el recurso biológico, sino también el genético.

De manera paradójica, las entidades estatales de financiación de la investigación exigen que los resultados de las investigaciones se difundan e incluso que se protejan por medio de patentes. En ambos casos se está suministrando una información potencialmente valiosa pero obtenida a altos costos, pues con las patentes existen riesgos de mejoramientos posteriores, afines solamente a las poderosas infraestructuras logísticas, presupuestales y operativas, propias de las industrias de los países desarrollados.

7ª Ficción. La biodiversidad es patrimonio de todos

Los estados abogan porque la biodiversidad es su patrimonio, pero dentro de éstos existen otros microestados. Las nuevas constituciones le confieren

amplios derechos a las minorías étnicas, de tal manera que ellos definen el uso y el destino de sus recursos naturales. Es común escuchar frases como “*Nuestra comunidad no autoriza ninguna investigación o prospección en su territorio*”, en un obvio encerramiento por los abusos que históricamente se han cometido. Si buena parte de la biodiversidad se encuentra en zonas protegidas y en las áreas de las comunidades locales, entonces se crea un círculo vicioso: hay necesidades pero no hay acceso. Uno tiene las herramientas y otro el material, pero sus intereses están divididos⁴¹. Tal situación dista hoy de tener una solución, pues algunos quieren invertir en bioprospección pero para proteger su inversión exigen patentar sus hallazgos y otros consideran que es inmoral patentar la naturaleza.

La problemática del megadiverso

Por lo expuesto anteriormente, tal parece que los lineamientos de la CDB no pasaron de ser meras buenas intenciones, pues desde entonces se han presentado múltiples casos de biopiratería o simplemente malas conductas e ingenuidades y las bioprospecciones se ven más como un colonialismo científico que sólo imparte beneficios al bioprospector⁴². Existen varias situaciones que dejan en entredicho el proceso posCDB. El caso más conocido es el de Costa Rica, que casi desde el comienzo de la implementación de la CDB abrió sus puertas a la industria farmoquímica así como a entidades científicas y académicas. Se generó un vasto acceso a los recursos de ese país a precios muy baratos y por eso últimamente ha tenido que reformular sus políticas e incluso rechazar la posibilidad de la financiación externa de un programa para hacer un inventario de su biodiversidad.

Varios países también han sido objeto de prácticas de biopiratería, entre ellos Filipinas y una universidad belga. Brasil recibió una oferta para explorar microorganismos por Novartis, que fracasó por carencia de reglamentación en ese entonces. Un proceso igualmente tortuoso sucedió en México con la empresa Diversa Co. y la UNAM, para coleccionar microorganismos extremófilos pero cuyo acuerdo fue declarado inválido por la Procuraduría del Medio Ambiente de ese país debido a que dicha institución educativa no tenía autorización estatal para negociar aspectos relacionados con su biodiversidad. Poco después también fue revocado otro acuerdo para explorar elementos de la medicina tradicional maya en Chiapas⁴³. Más recientemente fue denegada una patente sobre el frijol amarillo, algo prohibido expresamente en las negociaciones postCDB. Incluso dos países desarrollados también han sido víctimas de lo que puede considerarse como biopiratería, pues fueron llevados a cabo antes de 1992. Noruega es el sitio de origen del hongo *Tolyposcladium inflatum*, que produce la exitosa droga inmunosupresora ciclosporina, gracias a la colecta de una porción de tierra

de un parque natural de ese país, por un empleado de una compañía europea en uso de sus vacaciones⁴⁴. Similarmente, en el parque natural Yellowstone (Estados Unidos), se colectó el microorganismo productor de la enzima Taq polimerasa, que hizo posible el impresionante avance de la Biología Molecular y que cada año genera millones de dólares en regalías; a partir de esa experiencia se regularizaron los procedimientos de acceso y los beneficios compartidos para bioprospectar en los parques nacionales (públicos) norteamericanos⁴⁵.

Otros actos contrarios a la CDB y al correcto acceso a la biodiversidad se han presentado en Ecuador (rana *Epipedobates bicolor* y su analgésico⁴⁶, la patente y comercialización del Sangregado o Sangre de Drago silvestre) y en Perú (sobreconsumo de Uña de Gato y patentes de la Maca, el Yacón⁴⁷⁻⁴⁹ y la ya rechazada patente del Ayahuasca o Yagé)⁵⁰. En Sudáfrica se generó una fuerte polémica con la Hoodia, una planta antiobesidad cuyos derechos fueron adquiridos por Pfizer, pero que recientemente fueron revertidos a ese país después de controversiales análisis sobre el origen de esa decisión y el funcionamiento de la planta como tal⁵¹⁻⁵³. Y el más patético de todos, la flor *Alstroemeria*, de origen chileno, desarrollada por holandeses, cultivada por colombianos y comprada por norteamericanos. Con relación a Colombia, en 1996 hubo una petición de acceso por la firma Bioandes, que a fin de cuentas quería un convenio o contrato similar al de Costa Rica en cuanto a acceso indiscriminado y zonas de exclusividad, pero que después de un larguísimo proceso que tomó cerca de dos años no prosperó⁵⁴. Finalmente el único caso exitoso a la luz de las directrices de la CDB es el de una comunidad hindú, que percibe anualmente 20.000 dólares por un tónico que fue licenciado a una empresa nacional⁵⁵, y que tampoco ha estado exento de polémicas por configurarse una posible biopiratería interna.

Pero quedan aún varios interrogantes en torno al uso de la biodiversidad, entre ellos los que surgen cuando se evalúa el avance científico en la literatura especializada:

1. Si hay tanta sustancia bioactiva, ¿por qué hay tan pocos productos en el mercado para algunas enfermedades?

Todos los meses, o mejor, todos los días, se publica un gran número de artículos en revistas científicas relacionados con la búsqueda de sustancias bioactivas, naturales, semisintéticas o sintéticas. Entre las más importantes en el campo de la biodiversidad se encuentran *Phytochemistry*, *J. Natural Products*, *Tetrahedron*, *Phytotherapy Research*, *Organic Letters*, *J. Organic Chemistry*, *J. Medicinal Chemistry*, *Phytomedicine*, *Drugs Discovery Today*, etc. etc. La mayor parte de ellas están dedicadas a publicar resultados de investigaciones tendientes a buscar o a mejorar farmoquímicos en muy dis-

tintos frentes: Antivirales, Antibióticos, Antihipertensivos, Antimaláricos, Tripanocidas, Antituberculosos y una amplia gama de enfermedades. Cada edición mensual o semanal consta de unos 30 a 40 artículos y por política institucional dichas revistas no publican resultados negativos, así que la pregunta central es: ¿Por qué existiendo tantos y tan buenos reportes de actividad, finalmente muy pocos productos llegan al mercado, si acaso llegan? Y lo que es peor, hay muy pocas soluciones para los países más pobres. Según la empresa Novartis, en 14 años se descubrieron 1400 nuevas entidades químicas, pero menos del 1% eran para enfermedades tropicales⁵⁶.

Hay varias aproximaciones a una respuesta racional (Figura 7). Como primera medida los buenos resultados no se publican, ¡se guardan para patentarlos! De otro lado, dichas publicaciones provienen en gran medida del mundo académico, lo que implica una baja continuidad tanto por la financiación como por la participación de estudiantes, quienes toman otros rumbos una vez alcanzados sus objetivos para graduarse. Operativamente existen limitaciones, ya que en su mayor parte son ensayos *in vitro* que no siempre se correlacionan con los ensayos *in vivo* ni con los clínicos, que adicionalmente no tienen el modelo adecuado (estadio del patógeno y forma

TANTAS SUSTANCIAS ACTIVAS Y ...?

(Phytochemistry, J. Nat. Prod., Phytotherapy Res., JOC, JACS, Tetrahedron, J.B.C., PNAS...)

- La investigación tiene orígenes netamente académicos.
- El modelo experimental no es el adecuado: estadio, forma infecciosa y patogénica en la vida real.
- Dosis son francamente extremas
- Validar modelos experimentales más seguros
- No se realiza una fase de optimización molecular
- La vía de administración: Glucantime, IP, oral....
- Usualmente se toma una gran cantidad de especies y de extractos
- Fracasos en el desarrollo
- Y dónde está el metoxilo?

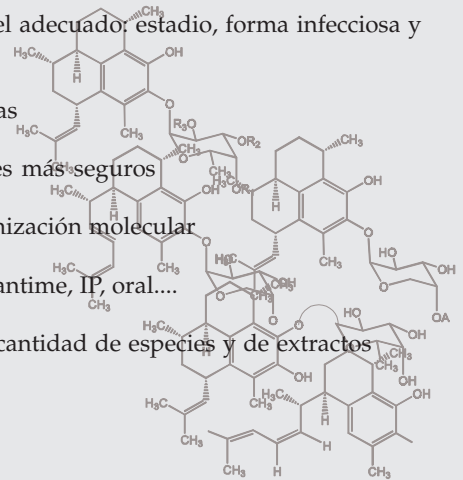


Figura 7. Causas de fracasos de moléculas promisorias.

infecciosa, la vía de administración, las dosis son usualmente extremas, se carece de frecuencias de aplicación, etc.) y finalmente usan técnicas obsoletas que ofrecen poco grado de confiabilidad y exigen repeticiones de experimentos a altos costos de tiempo y dinero. Desde el punto de vista químico, no hay una optimización molecular y los esfuerzos se dirigen más hacia la elucidación estructural que a la parte biológica y la disponibilidad de material es muy deficiente: difícilmente se aíslan solamente unos pocos miligramos.

¿Y por qué la industria farmoquímica no retoma esas moléculas?

En primera instancia, los intereses de la academia y los de la industria son muy distintos, pues mientras que los primeros crean y ahondan en el conocimiento, los segundos buscan un producto farmacológicamente activo y comercializable. Y para ello exigen una molécula:

- Con esqueleto novedoso,
- Drogueable, es decir, que se pueda transformar en mejores moléculas,
- Aplicable en una afección que ofrezca un buen mercado,
- Poseer un mecanismo de acción nuevo,
- Con un blanco farmacológico conocido,
- Activa a dosis extremadamente bajas,
- Preferiblemente sin efectos colaterales.
- Y anónima, es decir, no publicada, para guardar valiosa información de la competencia, es decir, patentable.

Estas situaciones han sido el origen de dos nuevas ficciones, que se relacionan con los modelos investigativos y con la financiación de la investigación:

8ª Ficción. Hay que investigar/desarrollar productos de acuerdo a los modelos EE.UU.-Europa-Japón

Los requisitos anteriormente mencionados para un candidato a droga no serían preocupantes si no fuera porque el medio académico también los está adoptando; esto ensancha la brecha de la investigación entre países pobres y ricos, pues desde allí se dictan los parámetros mediante los cuales se considera que una investigación es valiosa e importante, y obviamente publicable. Y un investigador sin publicaciones no vale nada. Esas “nuevas características” que debe poseer una sustancia para ser considerada como un hit en el campo de los antiparasitarios y que son desalentadoras para cualquier investigador tercermundista son las siguientes: dosis y concentraciones extremadamente bajas, casi en el nivel de virtuales, frecuencias de aplicación muy reducidas, blanco conocido⁵⁷. Como es apenas obvio, sustancias solamente aislables e identificables con equipos y técnicas

sofisticadas usualmente no disponibles o no operativos en el tercer mundo. Por demás ignoran que pueden existir productos ya conocidos (y abundantes y drogables) no correctamente ni completamente evaluados en el espectro farmacológico.

9ª Ficción. La mayor parte de la inversión en investigación proviene de fondos privados

Es extremadamente lamentable el desconocimiento de la dirigencia de muchos estados en cuanto a que el motor de las sociedades económicamente potentes es alimentado por la investigación científica. Y una parte de esta no siempre es atractiva para el sector privado; por ejemplo, las ciencias básicas (química, física, matemáticas) son las que generan las preguntas-respuestas que técnicos e ingenieros ponen a punto para generar productos apropiables. Y esta investigación básica se reduce escandalosamente en países desarrollados y obviamente está casi en extinción en los países subdesarrollados. Pero también existe la creencia de que la inversión para un producto en investigación proviene de la industria privada. En un potente sector como el farmoquímico esto no siempre es correcto, pues algunas de las mas exitosas drogas (y recientemente el taxol) salieron al mercado gracias a que la investigación básica fue soportada por el estado, mientras que en las fases de desarrollo el aporte lo hizo la industria privada⁵⁸. Y en esa investigación se embarcan los proyectos que permiten la formación de posgraduandos, la generación de una masa crítica de científicos, las bioprospecciones, las evaluaciones, los estudios preliminares, los inventarios, etc. etc.

Ambos pues, académicos e industria, andan caminos muy paralelos pero dispares en la sociedad tercermundista (o en desarrollo), pues su industria es débil y poco innovadora y sus investigadores trabajan con estándares que están más enfocados hacia el desarrollo de un producto farmoquímico industrial, que a la apropiación de un elemento tangible de la biodiversidad para esa misma sociedad.

Por Fin... Ciencia Vs. Sociedad

Un proceso investigativo tiene dos fases bien diferenciadas: la preparativa y la operativa. En la primera de ellas se diseña un proyecto de investigación (supongamos en la búsqueda de sustancias bioactivas), pero en algunos países debe estar acompañado de la incorporación de uno o varios socios nacionales que trabajen en la misma temática (aunque tampoco tengan experiencia ni infraestructura) y/o uno internacional, por supuesto para

darle acceso a la biodiversidad y compartir la propiedad derivada. Para este punto debe firmar un acuerdo, lo que a su vez implica traducirlo y presentarlo a la respectiva autoridad universitaria para su aquiescencia. Además también tiene que valorar cuántos artículos internacionales puede generar y en cuántos eventos se presentarán sus resultados; calcular además el número de estudiantes a incorporar, medir el impacto ambiental, no olvidar todos los nombres y apellidos de los coinvestigadores y finalmente, tramitar un permiso de acceso cuya adjudicación usualmente se otorga cuando el proyecto está muy avanzado (o incluso finalizado). No sobra mencionar que el régimen de acceso por su complejidad, requisitos y trámites hacen mas proclive al solicitante por la ilegalidad de la colecta⁵⁹, y que el Acuerdo 391 de Cartagena, que actúa como marco legal, está en entredicho en la actualidad. Pero además el proyecto debe encajar en las líneas prioritarias de investigación, que pueden ser las ciencias aeroespaciales, la producción de superconductores, el escalamiento de nuevos materiales, los procesos genéticos autocatalíticos, pero de biodiversidad... Por suerte todas las etapas de este modelo no se requieren en algunos países y tal vez por eso van más rápido que nosotros.

10ª Ficción. Con tanta riqueza y ¡no hemos sacado ni un matapulgas!

Supongamos que su proyecto fue seleccionado y comienza la segunda fase, la operativa, y ha detectado una planta que tiene varias sustancias muy activas *in vitro* contra la malaria, por ejemplo, una enfermedad de ribetes dramáticos en su país y en el mundo. Pero surge un problema: la materia prima necesaria para aislar esas moléculas es escasa y el rendimiento es muy bajo. Se plantea por tanto la posibilidad de sintetizar un análogo estructural que tiene una actividad en el rango de la más potente, pero que es relativamente fácil de obtener de una materia prima abundante en reacciones sencillas, contrario a la sustancia más activa, cuya síntesis es más compleja⁶⁰. La problemática ahora es invertir esfuerzos y dinero en tratar de sintetizar esa molécula original y más potente (que hace parte del proyecto oficial), optimizar su síntesis, preparar derivados y someterlos a otra ronda de ensayos *in vitro*. Pero para hacerlo pueden transcurrir varios años y la inversión de mucho dinero y esfuerzo, y lograr además que sus financiadores sigan interesados en esa línea de trabajo y vencer la tediosa espera de varios meses para disponer de un reactivo, desde un proveedor que está a solo dos horas en avión de su laboratorio, pero que la burocracia y el sistema lo ponen allí en tres o cuatro meses. La otra opción es sintetizar una de las sustancias activas de la mezcla, que tiene una actividad en el mismo orden de la más potente, pero cuya síntesis es menos compleja y tiene garantizado el suplemento de materia prima. Sí, indudablemente que hacer esa síntesis podría dar lugar a varias magníficas tesis de posgrado y publicaciones top, pero... ¿dónde quedan ancladas las expectativas de la sociedad en sus cien-

tíficos y en su biodiversidad y hasta cuándo deben esperar para que la ciencia local les revierta esa ganancia social? (Figura 8). Y mientras tanto hay muchísimas personas esperando una alternativa terapéutica contra su malaria.

Como se ve, encontrar magníficas moléculas es un reto científico, pero hallar una fuente adecuada de suplemento para ensayos confirmatorios, derivatización y otros estudios preclínicos y clínicos es otro problema mayúsculo, que en su momento algunos han resuelto por las vías más expeditas: domesticar las plantas y hacer cultivos masivos. Así lo hacen con los alcaloides de la vinca y los alcaloides esteroidales de *Solanum mammosum* o con las prenilcoumarinas de *Calophyllum*. También queda la opción de cultivos de tejidos y transgénesis y como ya se mencionó, la síntesis orgánica, total o parcial, a partir de otros metabolitos secundarios abundantes y fácilmente transformables en un producto de interés, como sucede con el taxol. Este último caso es de especial interés, porque la sustancia activa se encuentra en la corteza y su colecta automáticamente destruiría la planta, como también sucede cuando el metabolito se halla en la raíz. Casi nunca se examinan otros materiales valiosos y abundantes como gomas, resinas, follajes

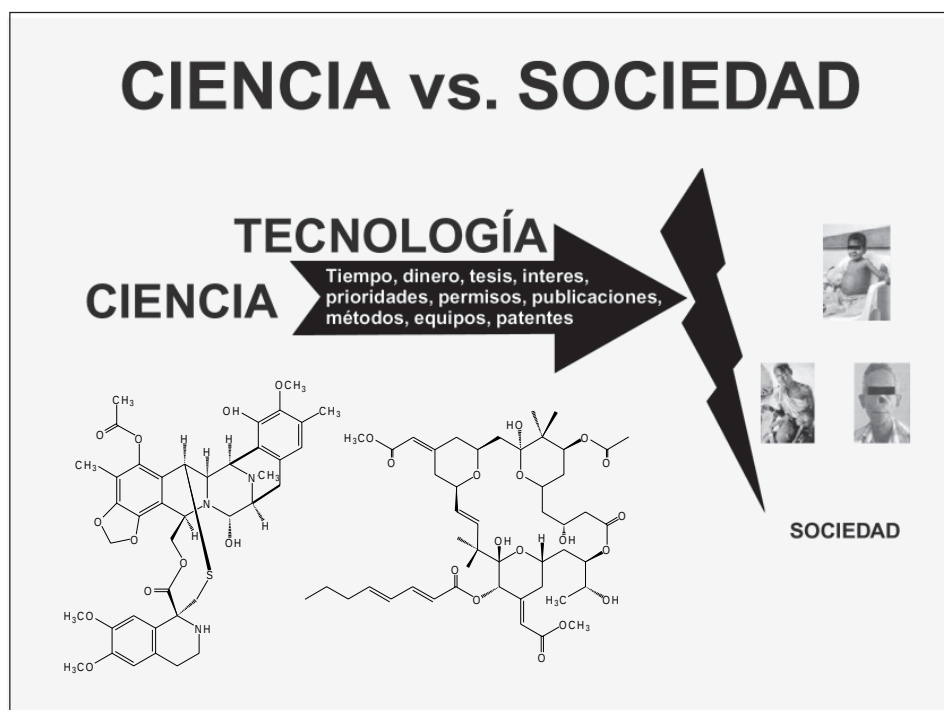


Figura 8. El aporte científico es poco en algunas áreas urgentes para la sociedad del tercer mundo.

y desechos de la agroindustria, subproductos de los aserraderos (cortezas, aserrines), etc. etc. E incluso metabolitos secundarios puros y muy abundantes, por ejemplo la misma cocaína. ¿No será factible también la búsqueda de una molécula bioactiva a partir de la garantía de su disponibilidad, haciendo screenings de actividad sobre una batería de blancos sencillos, cortos y confiables?

Pero asumamos que se ha superado el escollo de la disponibilidad del material; supóngase que se ha logrado producir aquella sustancia activa pero de manera sencilla y barata o que después de invertir tiempo y dinero en sintetizar la sustancia muy activa pero original, se tiene una colección de moléculas para su primeros ensayos *in vitro*. Ahora faltan otros tres componentes muy importantes de la investigación y de su aproximación a un hipotético producto: la toxicología, la absorción y el efecto *in vivo*. Pero los ensayos toxicológicos se reducen a pruebas de citotoxicidad, en las que una célula desnuda, confinada en una caja de petri y sin sistema metabolizante, se enfrenta a una molécula las 24 horas del día a concentraciones muy altas. Y obvio, casi siempre se halla un alto índice de citotoxicidad, por lo cual se abandona el proyecto, debido a los riesgos que supuestamente puede representar ese resultado a futuro. O bien según mandan los cánones de la industria farmoquímica, se procede a derivatizar la molécula otra vez para encontrar un derivado activo, más absorbible o menos tóxico^{61,62}. Y entonces se crea un círculo vicioso, excelente para la academia pero fatal para la sociedad. De hecho, un alto porcentaje de sustancias líderes hits fracasan por algunas de las tres causas anteriormente mencionadas y por su biodisponibilidad, e incluso porque los medicamentos, como cualquier otra mercancía, no se comercializan adecuadamente⁶³.

La verdadera información sobre las perspectivas de una sustancia deriva de su validación en un modelo animal. ¿No será mas práctico y económico a mediano plazo llevar a cabo ensayos confirmatorios en algunos animales, en aras de conocer esas características farmacológicas, antes de emprender síntesis, derivatizaciones y procesamiento de kilos y kilos de material? Pero hay otros escollos, tales como la disponibilidad de bioterios adecuados (no ratoneras ni conejeras) y vencer la recalcitrante posición de algunos comités de bioética acerca de los ensayos en animales, que pueden poner en la misma balanza la vida humana con la de un animal de experimentación.

Para acabar de ajustar con tantos inconvenientes a la vista, todas las situaciones anteriormente planteadas parten de una premisa muy importante: la estructura de la sustancia es conocida, pero regularmente las sustancias bioactivas se hallan en concentraciones extremadamente bajas en los organismos que las contienen y obtener cantidades adecuadas para análisis espectroscópicos (1 mg o más) representa un reto similar a encontrar una

aguja en un pajar, si no se dispone de equipo instrumental moderno y funcional, así como de fondos suficientes. Así que en el mejor de los casos y para tranquilidad con el cronograma de actividades previstas en el proyecto que se desarrolla, es mejor lidiar con vulgares sustancias conocidas (obviamente no publicables) que enfrentarse a gastarse varios meses (o incluso años) asignando la estructura a una molécula muy activa, pero escasa y reluctant a dejarse identificar plenamente. Y se genera en este contexto un fenómeno muy extendido: los proyectos comienzan con la búsqueda bioguiada de una sustancia bioactiva y terminan con el reporte de la actividad de un extracto y en el mejor de los casos con la asignación de estructuras de compuestos conocidos y carentes de cualquier importancia farmacológica: los esfuerzos económicos y logísticos del proyecto se diluyen hacia un enfoque diferente.

Parece ser, pues, necesario modificar la óptica y la operatividad de las investigaciones en los países subdesarrollados, debido a que existen necesidades apremiantes que pueden tener su solución en la materia prima disponible de la biodiversidad, pero que no es usada como tal. Aunque en todos los casos no es posible desarrollar esa dualidad de hacer ciencia y productos apropiables, hay situaciones dramáticas, por ejemplo en la búsqueda de nuevos antiparasitarios. A nadie más le interesan esas llamadas "Enfermedades Huérfanas" como la Malaria, Leishmaniasis, Tripanosomiasis, Tuberculosis y otras parasitosis, y por las cuales cientos de miles de personas mueren anualmente y otro tanto no menor se contagia⁶⁴, a pesar de existir un rico acervo etnomédico y una amplia fuente de extractos y moléculas en la biodiversidad.

Finalmente, se plantea un conflicto ético: ¿el avance de la investigación beneficia el saber tradicional y el acceso de sus detentores hacia alternativas más baratas? Supóngase nuevamente, que se ha logrado aislar la molécula responsable de eliminar las garrapatas del ganado, gracias a los conocimientos de una práctica etnobotánica muy difundida entre los campesinos, quienes emplean decocciones de una maleza para tal fin. Es posible que muchos años después de ese descubrimiento se desarrolle un producto y la respuesta del campesino seguramente será dejar de usar la maleza original y comprar el producto comercial derivado de ella, a un precio alto y que tampoco le reconoce nada a su aporte inicial. En este sentido la sociedad norteamericana está haciendo un sentido reclamo pues con sus impuestos se patrocina la investigación básica, apropiable por la industria para desarrollar sus productos, pero el costo de los medicamentos es muy alto, aun para ellos⁶⁵; y lo que es peor en el caso del taxol, ya que la materia prima proviene en un gran porcentaje de los parques nacionales⁵⁸.

Para finalizar: las expectativas creadas a partir de la Convención por la Diversidad Biológica aún están muy lejos de ser realidad, y no es lo mis-

mo los buenos o regulares proyectos de investigación que hacer bioprospección e incorporar sus resultados a los sistemas sociales sanitarios y productivos. Hasta este punto el panorama no puede ser el más optimista, ya que se ha hecho un enfoque en el que juegan papel determinante las concepciones del investigador. En cuanto a las políticas estatales (si es que existen), ya habrá otra ocasión para discutir las, pero otros, antes que nosotros, ya están tomando la delantera para tratar de solucionar su problemática⁶⁶. Aunque ya lo dijo Murphy: *“Un optimista es un pesimista mal informado”*.

Referencias

1. Cordell GA. 2000. Biodiversity and drug discovery -a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55: 463-480
2. Cragg MG, Newman DJ. 2002. Drugs from nature: past achievements, future prospects. *Advances in Phytomedicine* 1: 23-37.
3. Patwardhan B. 2005. Ethnopharmacology and Drug Discovery. *J Ethnopharmacol* 100: 50-52.
4. Phillipson JD. 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68: 2960-2972.
5. Newman DJ, Cragg MG. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years *J Nat Prod* 70: 461-477.
6. Rishton GM. 2008. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *The American Journal of Cardiology* 101: S43-S49.
7. Convenio sobre la diversidad biológica. <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-un-es.pdf> . Acceso Julio 13 2008.
8. Soejarto DD, et al. 2005. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 15-22.
9. Lista de los recursos naturales empíricos. http://www.invima.gov.co/Invima/consultas/plantas_medicinales.jsp?codigo=362. Acceso julio 13, 2008.
10. Gupta M, Caceres A. 2003. Legislación sobre productos herbarios en Centro América y los Países Andinos. Presentado en ICS-UNIDO training course. Panama City.
11. Anónimo. Lo natural no es tan inofensivo. *El Pulso*, Medellín, Año 5 No. 51, Diciembre 2002.

12. Rodríguez-Fragoso L, Reyes-Esparza J, Burchiel SW, Herrera-Ruiz D, Torres E. 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227: 125-135.
13. Vogel J. (ed.). 2000. El cartel de la biodiversidad: transformación de conocimientos tradicionales en secretos comerciales. CARE, Proyecto SUBIR. Quito. p. 116.
14. Harvey AL. 2007. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 480-484
15. Cragg MG, Newman DJ. 2002. Chemical diversity: a function of biodiversity. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 404-405.
16. Nijkamp P, Vindigni G, Nunes PAD. 2008. Economic valuation of biodiversity: A comparative study. *Ecological Economics* en prensa.
17. Richerzhagen C, Holm-Mueller, K. 2005. The effectiveness of access and benefit sharing in Costa Rica: implications for national and international regimes. *Ecological Economics* 53: 445-460.
18. Maggon K. 2005. Best-selling human medicines 2002-2004 10: 739-742 .
19. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. 2003. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. *Journal of Health Economics* 22: 151-185.
20. Robert J. Nash. 2001. Who benefits from biopiracy? *Phytochemistry* 56: 403-405.
21. Rollinger JM, Stuppner H, Langer T. 2008. Virtual screening for discovery of bioactive natural products. *Prog Drug Res* 65: 211-249.
22. Claude A. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology* 9: 279-286.
23. Peterson I, Anderson EA. 2005. Chemistry: the renaissance of natural products as drug candidates. *Science* 310: 451-453.
24. Rouhi AM. 2003. Betting on natural products for cures. *Chem Eng News* 81: 93-103.
25. Rouhi AM. 2003. Moving beyond natural products. *Chem Eng News* 81: 104-107.
26. Rouhi AM. 2003. Rediscovering natural products, *Chem Eng News* 81: 77: 91.
27. Buss AD, Butler MS 2004. A new model for utilising chemical diversity from natural sources. *Drug Development Research* 62: 362-370.

- 28.Desai MC, Chackalamannil SM. 2008. Rediscovering the role of natural products in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 11: 436-437.
- 29.Harvey AL. 2004. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery?. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 196-198.
- 30.Martin Tulp, Lars Bohlin. 2002. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 225-231.
- 31.Espada A, Molina-Martin M, Dage J, Kuo MS. 2008. Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery. *Drug Discovery Today* 13: 417-423.
- 32.Ma H, Goryanin I. 2008. Human metabolic network reconstruction and its impact on drug discovery and development, *Drug Discovery Today*, 13: 402-408.
- 33.Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins LA. 2006. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5: 993-996.
- 34.Lefevre F, Robe P, Jarrin C, Ginolhac A, Zago C, Auriol D, Vogel T, Simonet P, Nalin R. 2008. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources, *Research in Microbiology* 159: 153-161.
- 35.Mishra KP, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, Sawhney RC. 2008. A review of high throughput technology for the screening of natural products, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62: 94-98.
- 36.Ortholand J-L, A Ganesan A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 271-280.
- 37.Littletona J. 2005. Novel approaches to plant drug discovery based on high throughput pharmacological screening and genetic manipulation *Life Sciences* 78: 467-475.
- 38.Littleton J, Rogers T, Falcone D. 2008. Chemistry strategies in early drug discovery: an overview of recent trends *Drug Discovery Today*, en prensa.
- 39.Colombo M, Peretto I, Espada A, Molina-Martin A, JDage J, Kuo M-S, Wishart DS. 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* 34: D668-D672 Database issue.
- 40.Sanders S. 2004. Landmark agreement between Samoa and UC Berkeley could help search for AIDS cure (http://berkeley.edu/news/media/releases/2004/09/29_samoa.shtml, acceso julio 13, 2008).

41. Verma IM. 2002. Biopiracy: distrust widens the rich-poor divide, *Molecular Therapy* 5: 95.
42. Firm RD. 2003. Bioprospecting - why is it so unrewarding. *Biodiversity Conservation* 12: 207-216.
43. Delgado GC. 2002. Biopiracy and Intellectual Property as the Basis for Biotechnological Development. *International Journal of Politics, Culture and Society* 16: 297-318.
44. Svarstad H, Dhillon SS, Bugge HC. 2000. From Norway to Novartis: cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. *Biodiversity and Conservation* 9: 1521-1541.
45. Benefit-Sharing in the National Parks (<http://www.nature.nps.gov/benefitssharing/>, acceso julio 13, 2008).
46. Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Decker MW, Sullivan JP, Williams M. 2000. Alkaloids from frog skin: the discovery of epibatidine and the potential for developing novel non-opioid analgesics *Nat Prod Rep* 17: 131-135.
47. Wang Y, McNeil B, Harvey LM. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions *Food Research International*, 40: 783-792.
48. Maca: Traditional knowledge, new world <http://www.american.edu/TED/maca.htm>, acceso julio 13, 2008.
49. Viagra natural http://www.legalaffairs.org/issues/November-December-2005/feature_koerner_novdec05.msp.
50. Tupper KW. 2008. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drug Policy*, en prensa.
51. Gruenwald J. 2005. Hoodia: Business Opportunity or Dangerous Business? *Nutraceuticals World* 28-29.
52. Vermeulen S. 2008. From life force to slimming aid: Exploring views on the commodification of traditional medicinal knowledge. *Applied Geography* 28: 224-235.
53. Janssen H-G, Swindells C, Gunning P, Wang W, Grün C, Mahabir K, Maharaj V, Apps P. 2008. Quantification of appetite suppressing steroid glycosides from *Hoodia gordonii* in dried plant material, purified extracts and food products using HPLC-UV and HPLC-MS methods. *Analytica Chimica Acta* 617: 200-207.
54. Dávalos LM, Sears RR, Raygorodetsky G, Simmons BL, Cross H, Grant T, Barnes T, Putzel L, Porzecanski AL. 2003. Regulating access to genetic resources under the Convention on Biological Diversity: an analysis of selected case studies. *Biodiversity Conservation* 12: 1511-1524.

55. Bagla P. 1999. Model indian deal generate payments. *Science* 283: 1614-1615.
56. http://www.novartis.de/download/nitd_folder.pdf. Acceso abril 2006.
57. Nwaka S, Hudson S. 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 941-955.
58. Cockburn I, Henderson R. 1996. Public-private interaction in pharmaceutical research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12725-12730.
59. Gómez D, Nemogá G. 2007. Ilegalidad de la investigación genética en Colombia. *Pensamiento Jurídico* 18: 265-284.
60. Wilson RM, Danishefsky SJ. 2006. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. *J Org Chem* 71: 8329-8351.
61. Sewing A, Winchester T, Carnell P, Hampton D, Keighley W. 2008. Helping science to succeed: improving processes in R&D. *Drug Discovery Today* 13: 227-233.
62. Koehn FE. 2008. High impact technologies for natural product screening. *Prog Drug Res* 65: 177-210.
63. Venkatesh S, Lipper RA. 2000. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal Pharmaceutical Sciences* 89: 145-154.
64. Brooker S, Utzinger J. 2007. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. *Geospatial Health* 2, 141-146; ver también http://www.who.int/neglected_diseases/en/, acceso julio 13, 2008.
65. Morrissey SR. 2003. Maximizing returns. *Chem Eng News* 81: 17-20.
66. Singh S. 2008. India Takes an Open Source Approach to Drug Discovery. *Cell* 133: 201-203.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR ECHEVERRI

En esta conferencia el profesor Fernando Echeverri, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia, presenta una visión crítica y un panorama filosófico amplio sobre la investigación que se hace en Colombia de nuestra biodiversidad como fuente de moléculas bioactivas. El conferencista pone bajo su lupa y juzga como realidad o ficción, desde su conocimiento de químico de productos naturales, algunos argumentos o aspectos que damos por hechos muchos de los investigadores de productos naturales del país.

Algunos de los aspectos analizados fueron los siguientes:

- 1ª Ficción. La farmacia de la selva... "Medicina Tradicional"...*
- 2ª Ficción. "Somos los únicos en poseer... y además somos el país más rico en ..." -*
- 3ª Ficción. Convenio por la Diversidad Biológica vs. "¡Vamos a salir de pobres y pagaremos la deuda externa!" - - - -*
- 4ª Ficción. La biodiversidad es la única fuente de nuevos medicamentos*
- 5ª Ficción. La biodiversidad no vale nada. Es un oro verde que ya no le interesa a nadie*
- 6ª Ficción. La biodiversidad es una riqueza Inalienable, Imprescriptible e Inembargable. Es Eterna*
- 7ª Ficción. La biodiversidad es patrimonio de todos*
- 8ª Ficción. Hay que investigar/desarrollar productos de acuerdo a los modelos EE.UU.-Europa-Japón*
- 9ª Ficción. La mayor parte de la inversión en investigación proviene de fondos privados*
- 10ª Ficción. ¡Con tanta riqueza y no hemos sacado ni un matapulgas!*

Finalmente, el profesor Echeverri se refiere a un aspecto muy importante y que no siempre tienen en cuenta los investigadores: la ciencia que se hace es para la sociedad, la ciencia que se hace en Colombia debe beneficiar a la sociedad colombiana que sufre de muchas dolencias que podrían ser resueltas con un mejor conocimiento de nuestra biodiversidad y con un adecuado aprovechamiento de ella.

Para terminar con esta relatoría nada más conveniente que citar algunas de las ideas finales del conferencista: "Parece ser, pues, necesario modificar la óptica y la operatividad de las investigaciones en los países subdesarrollados, debido a que existen necesidades apremiantes que pueden tener su solución en la materia prima disponible de la biodiversidad, pero que no es usada como tal. Aunque en todos los casos no es posible desarrollar esa dualidad de hacer ciencia y productos apropiables, hay situaciones dramáticas, por ejemplo en la búsqueda de nuevos antiparasitarios. A nadie más le interesan esas llamadas "Enfermedades

Huérfanos” como la Malaria, Leishmaniasis, Tripanosomiasis, Tuberculosis y otras parasitosis, y por las cuales cientos de miles de personas mueren anualmente y otro tanto no menor se contagia, a pesar de existir un rico acervo etnomédico y una amplia fuente de extractos y moléculas en la biodiversidad. Finalmente, se plantea un conflicto ético: ¿el avance de la investigación beneficia el saber tradicional y el acceso de sus detentores hacia alternativas más baratas? Supóngase nuevamente, que se ha logrado aislar la molécula responsable de eliminar las garrapatas del ganado, gracias a los conocimientos de una práctica etnobotánica muy difundida entre los campesinos, quienes emplean decocciones de una maleza para tal fin. Es posible que muchos años después de ese descubrimiento se desarrolle un producto y la respuesta del campesino seguramente será dejar de usar la maleza original y comprar el producto comercial derivado de ella, a un precio alto y que tampoco le reconoce nada a su aporte inicial. En este sentido la sociedad norteamericana está haciendo un sentido reclamo pues con sus impuestos se patrocina la investigación básica, apropiable por la industria para desarrollar sus productos, pero el costo de los medicamentos es muy alto, aun para ellos; y lo que es peor en el caso del taxol, ya que la materia prima proviene en un gran porcentaje de los parques nacionales”.

SECCIÓN 2

*Nuevas fronteras en productos naturales marinos
y terrestres. Microorganismos como fuentes
de compuestos aprovechables por el hombre*

Desarrollo de nuevos antibacterianos contra la vibriosis a partir de las estructuras de los sideróforos aislados de la bacteria patógena *Vibrio anguillarum*

Carlos Jiménez¹

Resumen

Vibrio anguillarum es la bacteria patógena de peces responsable de la vibriosis, una enfermedad que provoca cuantiosas pérdidas económicas en la acuicultura. Vanchrobactina, un nuevo sideróforo del tipo catecol producido por *V. anguillarum* serotipo O2, ha sido aislado a partir de un cultivo deficiente en hierro de esa bacteria y su estructura plana caracterizada a partir de sus datos espectrométricos. Su estereoquímica fue elucidada por electroforesis capilar quirral y síntesis total como *N*-[*N'*-(2, 3-dihidroxibenzoil)-*D*-arginil]-*L*-serina. La síntesis de diversos análogos y su análisis biológico mostró que la mayoría de ellos poseen actividad siderofora y permitió deducir diversas relaciones estructura-actividad. Además, se consiguió encontrar un nuevo análogo sintético con actividad siderofora que posee un grupo funcional adecuado (un grupo amino) para ser usado como vector en la estrategia de Caballo de Troya con el fin de diseñar nuevos antibióticos contra la vibriosis.

Palabras clave: vibriosis, acuicultura, sideróforo, antibiótico, estrategia de Caballo de Troya.

Abstract

Vibrio anguillarum is the causative bacteria agent of vibriosis in fish, a disease that results in considerable economic losses in aquaculture farming

¹ Departamento de Química Fundamental, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, 15071 A Coruña, España. Tel.: +34 981 167000; Fax: +34 981 167065. Correo electrónico: carlosjg@udc.es

worldwide. Vanchrobactin, a new catechol-type siderophore produced by cells of *V. anguillarum* serotype O2, has been isolated from the supernatants of iron-deficient cultures and its planar structure characterized from spectral data. Its stereochemistry was elucidated by chiral capillary electrophoresis analysis and total synthesis as *N*-[*N'*-(2, 3-dihydroxybenzoyl)-D-arginyl]-L-serine. The synthesis of several analogues and their biological evaluation showed that most of them are active as siderophores, allowing us to deduce some structure-activity relationships. Furthermore, we have found an analogue with siderophore activity that has appropriate functionality (an amino group) for use as an antibiotic vector to be employed in a Trojan horse strategy to rationally design new antibiotics against vibriosis.

Key words: vibriosis, aquaculture, siderophore, antibiotic, Trojan horse strategy.

Introducción

Los problemas estructurales de la pesca extractiva a nivel mundial han impulsado de manera notoria el desarrollo de la acuicultura. Se calcula que en la actualidad el 43% de los peces que se consumen en España proceden de la acuicultura, siendo la comunidad gallega en estos momentos uno de los líderes en este campo. Más concretamente, se puede destacar el cultivo del rodaballo que ha crecido de forma exponencial en los últimos años, produciendo el 57% del total mundial y el 87% de la producción española.

El principal problema al que se enfrenta la acuicultura es el de las enfermedades infecciosas que afectan principalmente a los alevines y que provocan cuantiosas pérdidas económicas. Una de las peores infecciones es la vibriosis, una septicemia hemorrágica altamente contagiosa que es causada por la bacteria patógena marina *Vibrio anguillarum* (Toranzo & Barja, 1990). *V. anguillarum* es la única bacteria patógena de peces en la que se ha demostrado claramente que la capacidad de captar el hierro de las transferrinas del huésped es fundamental para su patogenicidad (Wolf & Crosa, 1986). La adquisición de hierro es un proceso indispensable para estas bacterias porque actúa como cofactor en un gran número de enzimas convirtiéndose por tanto en un elemento esencial para su crecimiento. Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, sin embargo, la disponibilidad del hierro +3 es muy limitada debido a su baja solubilidad a pH fisiológico en medio acuoso (10^{-8} M a pH neutro) (Neilands *et al.*, 1987). Con el fin de solventar este problema, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos, siendo el más común la biosíntesis de compuestos quelatantes de bajo peso molecular (300-2000 Da), denominados sideróforos. Estos son secretados al medio de cultivo donde quelatan muy eficazmente

al hierro y luego lo transportan de manera específica al interior de las células a través de receptores específicos de membranas para liberarlo a continuación. La mayoría de los sideróforos aislados hasta la fecha pueden ser clasificados (Figura 1) en función de la estructura de los ligandos que se enlazan al hierro en: catecolatos, hidroxamatos, hidroxil carboxilatos o cetohidroxi-bidentados (Pattus & Abdallah, 2000; Crosa & Walsh, 2002).

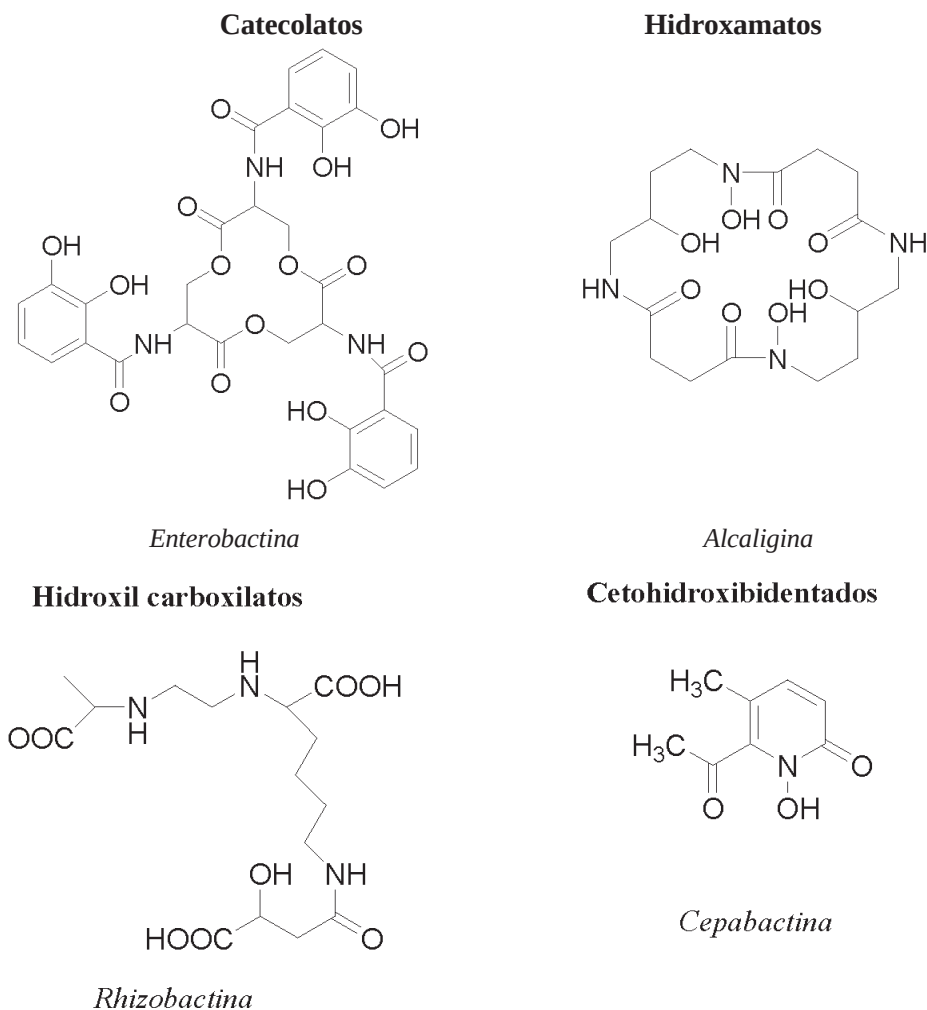


Figura 1. Principales tipos de sideróforos.

El interés del estudio de estos compuestos en la acuicultura radica en que los sideróforos y sus análogos poseen una importante aplicación terapéutica para luchar contra esas bacterias patógenas.

De los más de 23 serotipos distintos que se conocen para *V. anguillarum*, los pertenecientes a los serotipos O1 y O2, y en menor medida el O3, son los principales implicados en estas infecciones. Aunque ya se conoce desde hace tiempo el sideróforo producido por el *V. anguillarum* serotipo O1, anguibactina (Figura 2) (Jalal *et al.*, 1989), el sideróforo producido por el del serotipo O2, bautizado con el nombre de vanchrobactina, al que pertenece sobre todo el *V. anguillarum* que se detecta en el Rodaballo que se cultiva en Galicia, permanecía sin ser caracterizado.

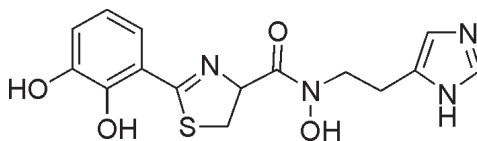


Figura 2. Estructura de anguibactina.

Aislamiento y caracterización de vanchrobactina, sideróforo producido por *Vibrio anguillarum* serotipo O2

Con estos antecedentes nos propusimos en primer lugar el aislamiento y caracterización de vanchrobactina mediante una colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Manuel Lemos del Departamento de Microbiología y del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela, que llevan varios años estudiando a nivel biológico el mecanismo de adquisición de hierro de esta bacteria.

El proceso de aislamiento y caracterización del sideróforo atravesó diversas etapas:

En primer lugar, se buscaron las óptimas condiciones de cultivo con el fin de maximizar la producción del sideróforo por parte de la bacteria *V. anguillarum* serotipo O2 cepa RV22. Se encontró que con un medio de cultivo CM9 con deficiencia de hierro, mediante la adición de un agente quelatante como la 2, 2'-dipiridina, se lograba aumentar la producción del sideróforo.

El fraccionamiento bioquímico se llevó a cabo empleando tres bioensayos diferentes: el ensayo de Arnow que indica la presencia de catecoles (estudios previos mostraron que vanchrobactina poseía este grupo), el ensayo de CAS (Chromo-Azurol S) que detecta la capacidad de quelatar hierro y el bioensayo que detecta la presencia del sideróforo por la capacidad de reiniciar el crecimiento de la bacteria en un medio deficiente de hierro.

La siguiente etapa consistió en su extracción y aislamiento. Después de ensayar diversos métodos, se encontró que la resina lipofílica XAD-7 era la más eficaz para extraerla del medio de cultivo. De esta forma, 17 litros del cultivo

de esta bacteria, una vez filtrados, se pasaron a través de una resina XAD-7 que se lavó con agua para eliminar las sales, eluyéndose el sideróforo con MeOH. La mezcla compleja obtenida se disolvió en agua y se extrajo con diclorometano y n-butanol, quedando la actividad en la fracción acuosa, indicando la elevada polaridad que debía poseer el sideróforo. La fase acuosa fue concentrada y fraccionada seguidamente a través de una columna de Sephadex LH20 que fue eluida con una mezcla de MeOH/H₂O 1: 9. El estudio de la fracción activa por LC-MS reveló la presencia de un producto mayoritario de peso 397 (Figura 3) que también dio positivo a los bioensayos de actividad siderófora. Sucesivas separaciones por HPLC de la mencionada fracción permitieron el aislamiento y purificación de 0,8 mg de vanchrobactina (Figura 4).

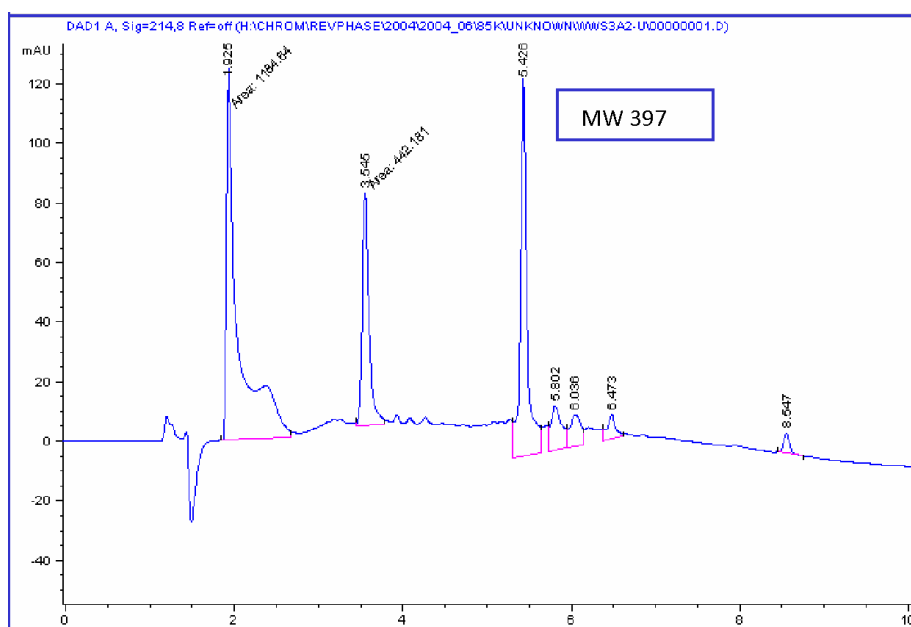


Figura 3. Cromatograma de HPLC de la fracción activa separada por Sephadex LH20.

La caracterización estructural se basó en los datos a partir de espectros de IR, RMN mono y dimensional y ESIMS que indicaban la presencia del grupo 2, 3-dihidroxibenzoilo y los aminoácidos arginina y serina. La final conexión de estos fragmentos se realizó a través de un experimento de HMBC (Figura 5) que permitió determinar su estructura plana (Soengas *et al.*, 2006).

La estructura deducida coincidió con los datos obtenidos en los estudios genéticos sobre la bacteria realizados por el grupo de Microbiología, ya que la caracterización de los genes involucrados en la biosíntesis de vanchrobactina confirmaron no solo los aminoácidos arginina y serina que incorporaba, sino que además lo hacían en el mismo orden en que se unen

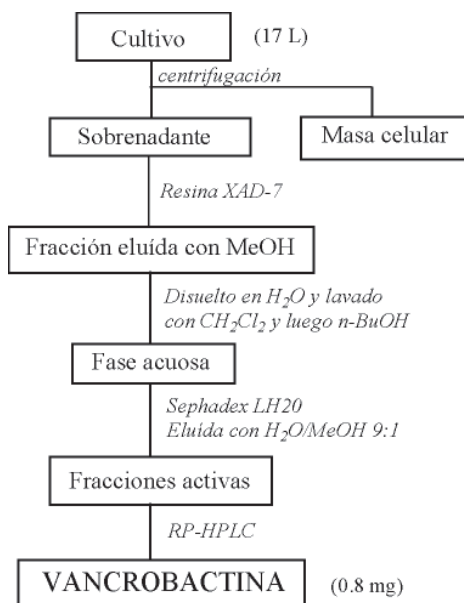


Figura 4. Procedimiento de aislamiento de vancrobactina a partir de *V. anguillarum* serotipo O2 cepa RV22.

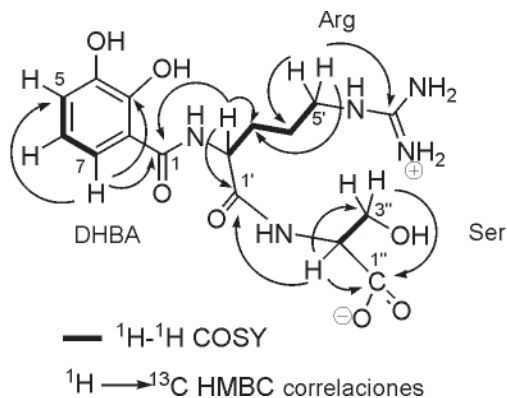


Figura 5. Correlaciones COSY y HMBC observadas en vancrobactina.

al grupo 2, 3-dihidroxibenzoilo (DHBA), es decir, primero arginina y después serina (Balado *et al.*, 2006).

Dado que la estereoquímica de la vancrobactina no pudo ser elucidada por análisis espectroscópico, se tuvo que recurrir a su síntesis total a partir de los aminoácidos enantioméricamente puros para lograr la determinación de su configuración absoluta.

Se planteó en primer lugar la síntesis de dos de los cuatro posibles estereoisómeros, los compuestos DHBA-L-Arg-D-Ser (**1a**) y DHBA-L-Arg-L-Ser (**1b**). Se usó como materiales de partida el ácido dihidroxibenzoico, L-ornitina, y los enantiómeros de la serina, la D-serina y L-serina, y se introdujo la función guanidinio al final de la síntesis siguiendo la secuencia sintética mostrada en el esquema 1.

La comparación por HPLC de estos dos estereoisómeros con el producto natural usando una columna aquiral en fase reversa (Discovery[®] HS F5) mostró que el derivado DHBA-L-Arg-D-Ser (**1a**) tenía el mismo tiempo de retención que vanchrobactina, por tanto su estereoquímica absoluta tendría que corresponderse con la del isómero L, D o bien con la de su enantiómero D, L (ver Figura 6).

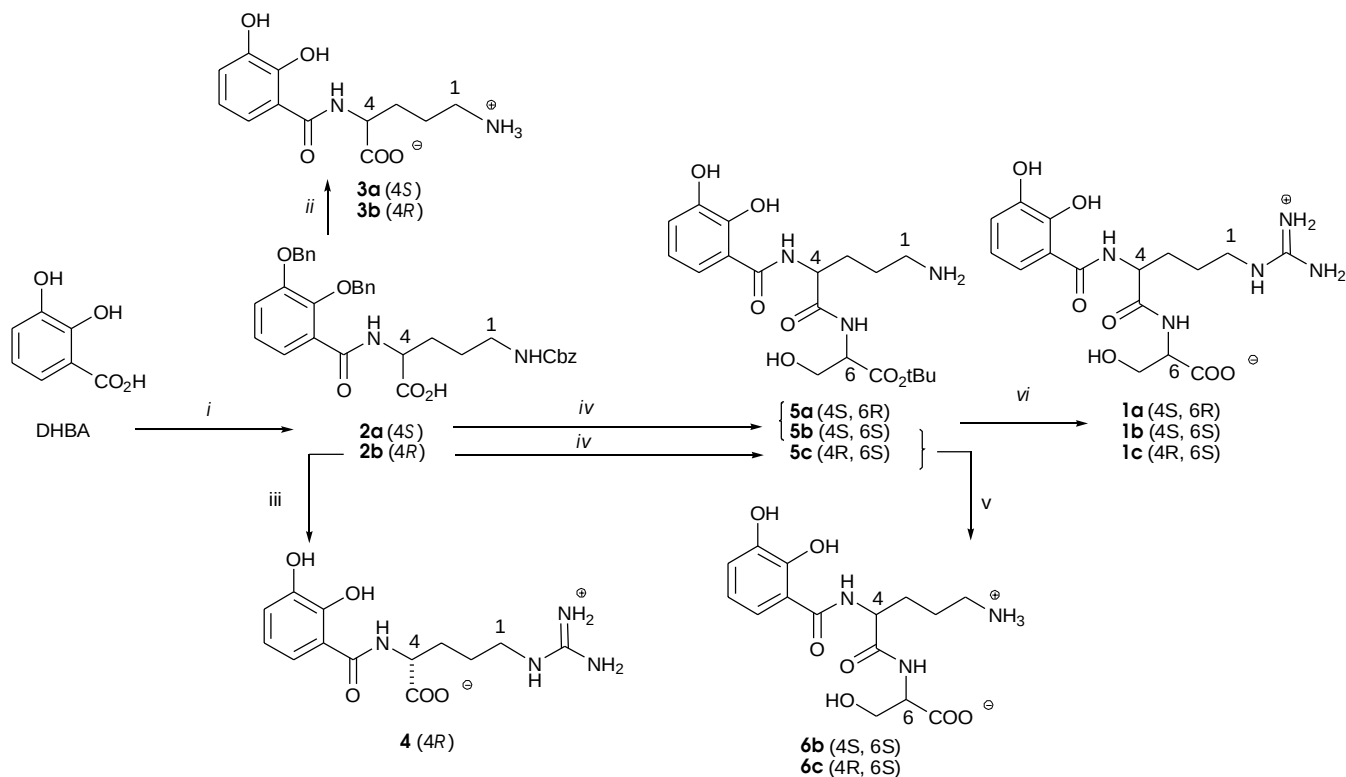
Sin embargo, el análisis por electroforesis capilar quiral de ese estereoisómero (el L, D) por comparación con el producto natural, indicó que los tiempos de retención eran diferentes (ver Figura 7) y por lo tanto, vanchrobactina debería ser su enantiómero (el derivado D, L).

Para confirmar esta hipótesis, llevamos a cabo la síntesis de ese estereoisómero con los aminoácidos D-ornitina y L-serina siguiendo la estrategia sintética descrita y que se muestra en el esquema 1. Ahora, la comparación del estereoisómero sintético DHBA-D-Arg-L-Ser (**1c**) con el producto natural por electroforesis capilar quiral mostró que ambos tenían el mismo tiempo de retención. Además, coeluyeron juntos cuando se inyectó una mezcla de ambos compuestos (ver Figura 7).

Los espectros de RMN del compuesto sintético resultaron ser prácticamente idénticos a los de vanchrobactina, aunque se detectaron ligeras diferencias en los desplazamientos químicos que fueron achacadas a la fuerte dependencia del pH de los desplazamientos químicos de los aminoácidos en disolución de D₂O. La configuración absoluta se confirmó con el valor de $[\alpha]_D$ de -16,4 (c 0,7, MeOH) de la muestra sintética **1c** que es similar al de la vanchrobactina $[\alpha]_D$ -13,6 (c 25×10^{-3} , MeOH). Finalmente, la actividad siderófora y la función biológica del compuesto sintético fue confirmada mediante ensayos de promoción del crecimiento bacteriano. En base a estos datos, la estructura absoluta de la vanchrobactina (Figura 8) fue establecida como N-[N'-(2,3-dihidroxibenzoil)-D-arginil]-L-serina (Soengas *et al.*, 2007).

Síntesis de análogos de vanchrobactina

Una vez confirmada la estructura de la vanchrobactina y aprovechando la estrategia sintética desarrollada, se propuso la obtención de otros análogos con el objetivo de evaluar su actividad como sideróforos y estudiar las



Esquema 1

Condiciones: i: 1. $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$ (89%); 2. $\text{BnBr}/\text{K}_2\text{CO}_3$ (99%); 3. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50 °C, 12 h, cuant.; 4. $N^d\text{-Cbz-L-ornitina-OMe}$ or $N^d\text{-Cbz-D-ornitina-OMe}$, TBTU, Et_3N , DMF, rt, 16 h (78% y 79%, respectivamente); 5. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50 °C, 16 h, cuant.; ii: H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 3 h, cuant.; iii: 1. $t\text{-BuOAc}$, HClO_4 ; 2. H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 3 h, (48%); 3. $(\text{NHBoc})_2\text{NTf}$, Et_3N , CHCl_3 , ta, 1 h (73%); 4. TFA/DCM 3: 7, ta, 16 h, cuant.; iv: 1. L-Ser-OⁱBu or D-Ser-OⁱBu, TBTU, Et_3N , DMF, ta, 16 h; 2. H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 3 h (28%, 29% y 82%); v: TFA/DCM 3: 7, ta, 16 h, cuant.; vi: 1. $(\text{NHBoc})_2\text{NTf}$, Et_3N , CHCl_3 , ta, 1 h (73%, 62% y 61%); 2. TFA/DCM 3: 7, ta, 16 h, cuant.

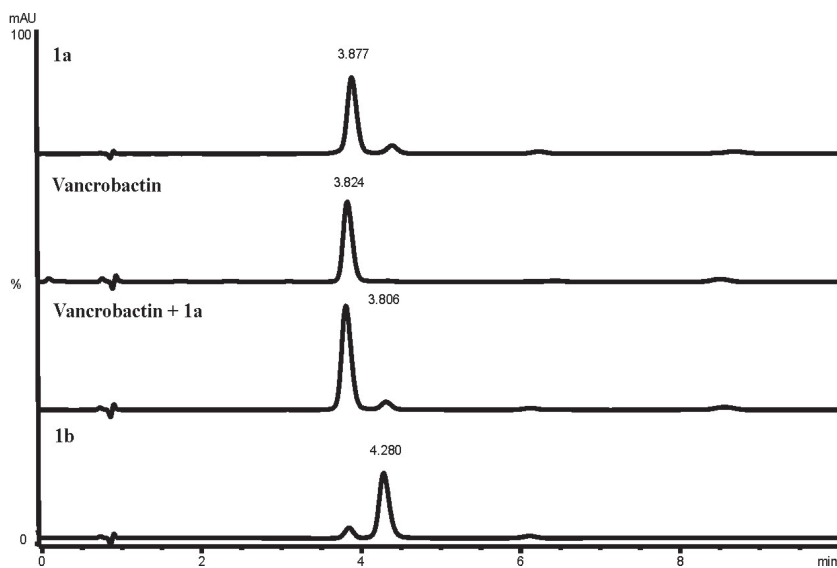


Figura 6. Cromatogramas de UV_{214 nm} (de arriba a abajo) de **1a**, vanchrobactina, vanchrobactina + **1a** y **1b**. Columna 4,6 × 50 mm, 3 µm; fase móvil, H₂O 0,05% TFA y MeCN 0,05% TFA (90/10); flujo, 1,0 mL/min.

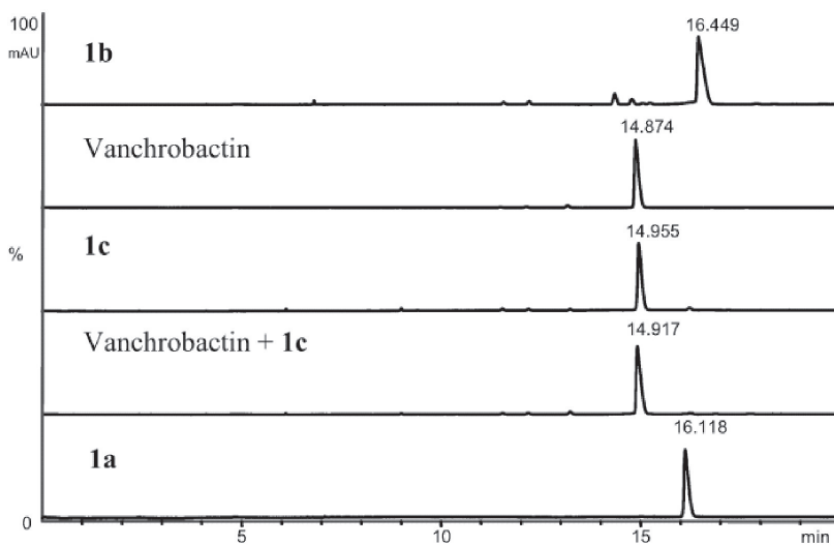


Figura 7. Electroforegramas UV_{214nm} (de arriba a abajo) del **1b**, vanchrobactina, **1c**, vanchrobactina + **1c** y **1a**. Dimensión capilaridad, 50 µm i.d., 363 µm o.d.; longitud de capilaridad total, 38,5 cm; longitud del detector, 30 cm; tampón, 5% gamma-HS-CD, tampón de fosfato 25 mM pH 2,5; inyección hidrodinámica, 60 mbars.

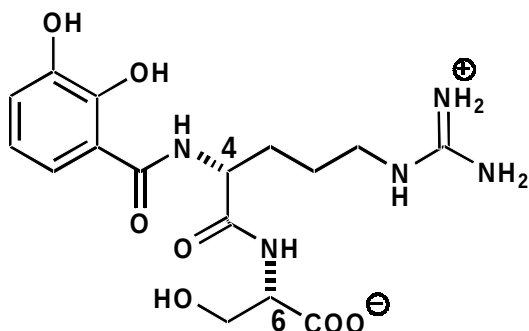


Figura 8. Estructura de vanchrobactina.

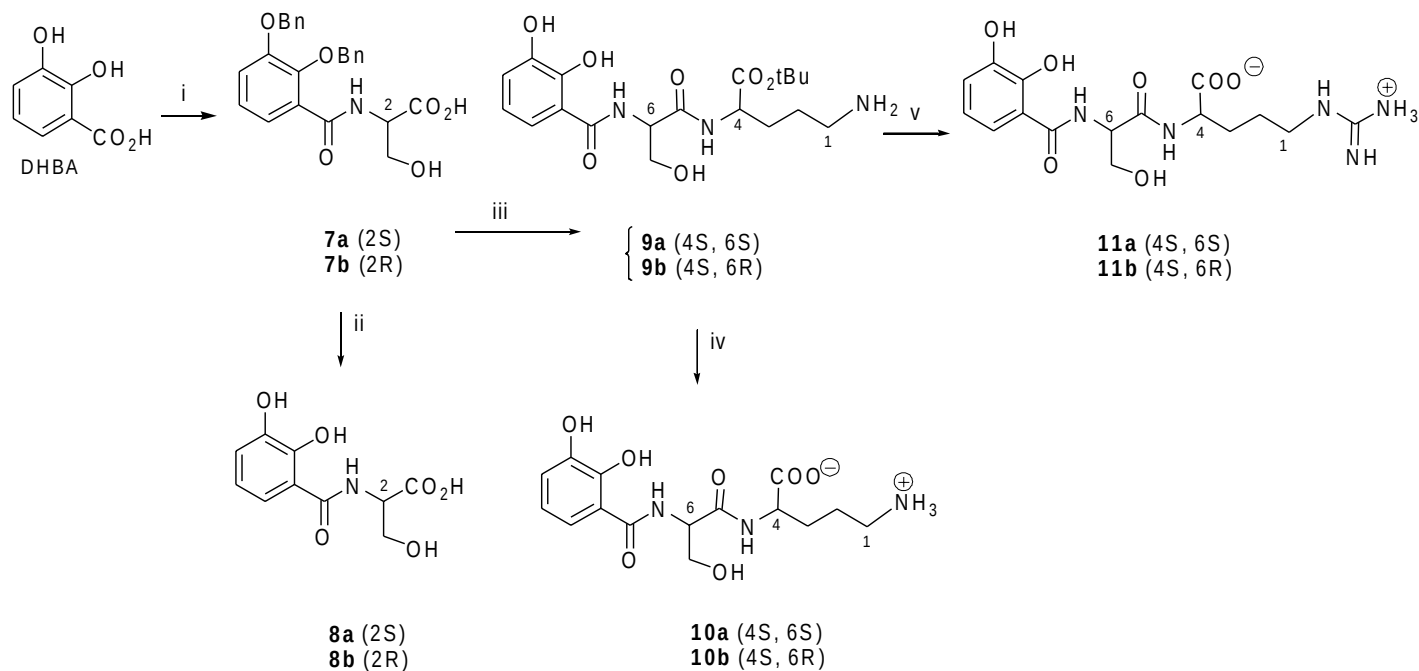
relaciones estructura- actividad. Teniendo en cuenta su posible aplicación en el desarrollo de nuevos antibióticos, otro objetivo fue el de buscar un análogo adecuado que pueda ser aplicado en la estrategia denominada “Caballos de Troya”. Esta consiste en formar un conjugado mediante la unión de un compuesto que tenga actividad siderófora y agentes antibacterianos conocidos a través de un espaciador (Figura 9), que sea capaz de introducir el antibiótico de una forma más efectiva dentro de la bacteria (Millar & Malouin, 1993; Ghosh *et al.*, 1996; Budzikiewicz, 2001).

Los análogos de vanchrobactina preparados se agruparon en dos grandes grupos. Los que tenían el DHBA unido directamente a la Orn/Ar y después la Ser (compuestos 1, 3, 4 y 6, ver Esquema 1), y un segundo grupo en el que la Ser se encuentra enlazada directamente a DHBA y después a la Orn/Ar (compuestos 8, 10 y 11, ver Esquema 2).

Para estudiar la actividad siderófora de los compuestos sintetizados se empleó la promoción del crecimiento en un medio deficiente de Fe (III) de diversas bacterias de las que se sabe que son capaces de biosintetizar sideróforos. Las bacterias ensayadas fueron las siguientes: *Vibrio anguillarum* 775 (serotipo 01), *V. anguillarum* RV22 (serotipo 02), *Erwinia chrysanthemi* PPV20, *Vibrio alginolyticus* TA15 y *Salmonella enterica* EMB1. Además se sometieron al ensayo CAS. Los resultados biológicos mostraron que la estereoquímica de los aminoácidos no influye en la actividad siderófora en ambos serotipos de *V. anguillarum*. La actividad que mostraron en la *Erwinia chrysanthemi* PPV20 fue consistente con la naturaleza de catecol amino de chrysobactin, el sideróforo biosintetizado por esa bacteria.



Figura 9. Estrategia de “Caballos de Troya”..



Esquema 2

Condiciones: i: 1. $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$ (89%); 2. $\text{BnBr}/\text{K}_2\text{CO}_3$ (99%); 3. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50°C , 12 h, cuant.; 4. L-Ser-OMe o D-Ser-OMe, TBTU, Et_3N , DMF, ta, 16 h (84% y 82% respectivamente); 5. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , 50°C , 16 h., cuant.; ii: H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 3 h, cuant.; iii: $N^d\text{-Cbz-L-ornitina-O}^t\text{Bu}$, TBTU, Et_3N , DMF, rt, 16 h (81% y 93% respectivamente); iv: 1. H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 3 h, cuant.; 2. TFA/DCM 3: 7, ta, 16 h, cuant.; v: 1. $(\text{NH}(\text{Boc})_2\text{NTf})$, Et_3N , CHCl_3 , ta, 1 h (71% y 79% respectivamente); 2. TFA/DCM 3: 7, ta, 16 h, cuant.

Los resultados obtenidos (Tabla 1) confirmaron también los trabajos previos en el sentido de que los microorganismos no suelen ser muy específicos en el uso de sideróforos y que puedan usar diferentes estructuras para suministrar hierro a la célula. La falta de especificidad puede ser debida a la adaptación evolutiva de las bacterias patógenas para incrementar el número de posibilidades para obtener hierro del medio. En relación con los valores CAS, prácticamente todos ellos mostraron cierto poder quelatante dentro del rango $-0,353$ a $-0,788$, que se correlacionan perfectamente con los obtenidos en la evaluación de la promoción del crecimiento. Pero una de las conclusiones más relevantes que se deducen de este estudio es el descubrimiento de un análogo con actividad siderófora que posee un grupo funcional adecuado (un grupo amino terminal en vez de un grupo guanidinio) para ser conjugado con otros agentes bioactivos mediante la estrategia de Caballos de Troya (Soengas *et al.*, 2008). En estos momentos se están preparando diferentes conjugados de estos análogos activos con antibióticos conocidos empleando distintos espaciadores que serán sometidos a ensayos biológicos como antibacterianos frente a los dos serotipos de *V. anguillarum*.

Adicionalmente se han realizado medidas espectrofotométricas y potenciométricas que permitieron la caracterización del comportamiento

Tabla 1. La promoción del crecimiento se muestra por el diámetro del halo de crecimiento representado de la siguiente forma: -, crecimiento nulo; +, halo <12 mm; ++, halo 12-14 mm; +++, halo 15-17 mm; +++, halo >17 mm. El ensayo CAS da valores negativos: cuanto mayor sea el número mayor será su capacidad de quelatación.

Análogos	V. anguillarum	V. anguillarum	Erwinia	Vibrio	Salmonella	Ensayo CAS
	RV22	775	chrysanthemi	alginolyticus	enterica enb-1	
	(serotipo O2)	(serotipo O1)	PPV20	TA15		
Serie Orn(Arg)-Ser						
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (control)	+++	++++	++++	++++	++	
DHBA-L-Arg-D-Ser (1a)	+++	++	+	–	–	–0.655
DHBA-L-Arg-L-Ser (1b)	+++	++	++	–	–	–0.736
DHBA-D-Arg-L-Ser (1c)	++++	++	+++	–	+	– 0.714
DHBA-L-Orn (3a)	–	–	–	–	–	–0.353
DHBA-D-Orn (3b)	++	+++	+	–	++	– 0.672
DHBA-D-Arg (4)	++++	++	++	–	+	– 0.476
DHBA-L-Orn-L-Ser (6b)	++	+	+	–	++	– 0.621
DHBA- D -Orn- L -Ser (6c)	++	++	++	–	+	–0.679
Serie Ser-Orn(Arg)						
DHBA-L-Ser (8a)	++	+++	–	–	–	–0.589
DHBA-D-Ser (8b)	++	+++	–	–	–	–0.788
DHBA-L-Ser-L-Orn (10a)	++	+	+	–	+++	–
DHBA-L-Ser-D-Orn (10b)	++	+	+	–	+++	–
DHBA-L-Ser-L-Arg (11a)	++	+	–	–	–	– 0.476
DHBA-L-Ser-D-Arg (11b)	++	+	+	–	+	– 0.547

ácido-base de vanchrobactina libre así como de sus propiedades en la coordinación con hierro (III). Los resultados obtenidos indican que las funciones catecol, catecolato y salicílico presentes en vanchrobactina son los puntos de quelatación efectivos en su coordinación con el metal. La mayor estabilidad de los complejos férricos se observó para los grupos enlazantes salicílico y catecolato de estequiometría Metal: Ligando (1: 2), cuya formación muestra cinéticas lentas. El cambio drástico de color del complejo férrico al pasar del rojo en medio básico (λ_{max} menor de 520 nm) a azul en medio ácido ($\lambda_{\text{max}} \sim 600$ nm) es asociado a un cambio en la estructura del complejo.

Agradecimientos

En la realización de estos trabajos también han intervenido Raquel G. Soengas, Marta Larrosa, Jaime Rodríguez, Rosa Nieto y Emilia Iglesias por la Universidad de A Coruña, Miguel Balado y Manuel L. Lemos por la Universidad de Santiago de Compostela y Cristina Anta y Alfonso Espada de Lilly S.A. Se agradece a la Xunta de Galicia (PGIDIT05RMA10302PR) por la financiación aportada.

Referencias

- Balado M, Osorio CR, Lemos ML. 2006. *Microbiology* 152: 3517-3528.
- Budzikiewicz H. 2001. *Curr Top Med Chem* 1: 73-82.
- Crosa JH, Walsh CT. 2002. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 223-249.
- Ghosh A, Ghosh M, Niu C, Malouin F, Moellmann U, Miller MJ. 1996. *Chem Biol* 31: 1011-1019.
- Jalal MAF, Hossain MB, Crosa JHJ. 1989. *Am Chem Soc* 111: 292-296.
- Miller MJ, Malouin F, 1993. *Accts Chem Res* 26: 241-249.
- Neilands JB, Konopka K, Bagg A. 1987. *Iron transport in Microbes, Plants and Animals* 3-33.
- Pattus F, Abdallah MAJ. 2000. *Chin Chem Soc* 47: 1-20.
- Soengas RG, Anta C, Espada A, Paz V, Ares IR, Balado M, Rodríguez J, Lemos ML, Jiménez C. 2006. *Tetrahedron Lett* 47: 7113-7116.
- Soengas RG, Anta C, Espada A, Nieto RM, Larrosa M, Rodríguez J, Jiménez C. 2007. *Tetrahedron Lett* 48: 3021-3024.
- Soengas RG, Larrosa M, Balado M, Rodríguez J, Lemos ML, Jiménez C. 2008. *Org Biomol Chem* 6: 1278-1287.
- Toranzo AE, Barja JL. 1990. *Dis Aquat Org* 9: 73-82.
- Wolf MK, Crosa JHJ. 1986. *Gen Microbiol* 132: 2949-2952.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR JIMÉNEZ

*El conferencista, profesor Carlos Jiménez de la Universidad de La Coruña, España, nos habló sobre uno de los principales problemas que enfrenta la acuicultura, el de las enfermedades infecciosas que afectan principalmente a los alevinos y que provocan cuantiosas pérdidas económicas. Una de las peores infecciones es la vibriosis, una septicemia hemorrágica altamente contagiosa que es causada por la bacteria patógena marina *Vibrio anguillarum*. Esta es la única bacteria patógena de peces en la que se ha demostrado claramente que la capacidad de captar el hierro de las transferrinas del huésped es fundamental para su patogenicidad. Con el fin de solventar este problema, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos, siendo el más común la biosíntesis de compuestos quelatantes de bajo peso molecular (300-2000 Da), denominados sideróforos. Estos son secretados al medio de cultivo donde quelatan muy eficazmente al hierro y luego lo transportan de manera específica al interior de las células a través de receptores específicos de membranas para liberarlo a continuación.*

*En el trabajo presentado se mencionó el aislamiento de vanchrobactina, un nuevo sideróforo del tipo catecol producido por *V. anguillarum* serotipo O2, a partir de un cultivo deficiente en hierro de esa bacteria. La síntesis de diversos análogos y su análisis biológico mostró que la mayoría de ellos poseen actividad siderófora y permitió deducir diversas relaciones estructura-actividad. Además, se consiguió encontrar un nuevo análogo sintético con actividad siderófora que posee un grupo funcional adecuado (un grupo amino) para ser usado como vector en la estrategia de Caballo de Troya con el fin de diseñar nuevos antibióticos contra la vibriosis.*

Claramente este trabajo demuestra que la investigación tradicional en microorganismos marinos no es el único camino para la obtención de compuestos antimicrobianos.

Organismos marinos: fuente asombrosa de compuestos útiles para la humanidad

Carmenza Duque B¹.

Resumen

La química de productos naturales marinos ha demostrado en los últimos cuarenta años que la fauna y la flora marina son una fuente asombrosa de compuestos útiles para el hombre; por ejemplo: medicamentos, cremas cosméticas, complementos nutritivos, reactivos para biología molecular, insecticidas, herbicidas, antifúngicos, entre otros. En Colombia en los últimos cinco años, las investigaciones en este campo se han centrado en el estudio del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae*, habitante del archipiélago de San Andrés y Providencia, como fuente de seis nuevas sustancias las pseudopterósinas (PsP-PsV) y de la también nueva *seco*-pseudopterósina K, compuestos con una excelente actividad antiinflamatoria, comparable y en muchos casos superior a drogas antiinflamatorias comerciales. Por otro lado, también se han estudiado en Colombia otros corales blandos del género *Eunicea*, por ej. *Eunicea knighti* como fuente de compuestos tipo cembranólido, los cuales mostraron en nuestros ensayos *antifouling* de laboratorio ser compuestos promisorios como aditivos en recubrimientos *antifouling* ambientalmente amigables.

Palabras clave: productos naturales marinos, compuestos marinos útiles, drogas marinas, compuestos antiinflamatorios, compuestos *antifouling*, corales blandos, *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Eunicea knighti*, pseudopterósinas, *seco*-pseudopterósinas, cembranólidos.

Abstract

During the last forty years, marine natural products chemistry has shown the fauna and flora marina as an amazing source of useful compounds for

¹ Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Bogotá, Colombia.

mankind i. e. drugs, cosmetics, nutraceuticals, reagents for molecular biology, insecticides, herbicides and fungicides. In Colombia, during the last five years, the scientific research performed by our group has been focused on the study of the soft coral *Pseudopterogorgia elisabethae* from the San Andres and Providencia Islands as a source of novel pseudopterosins (PsP-PsV) and of the also new *seco*-pseudopterosin K, compounds with excellent antiinflammatory activity, comparable or even superior to that shown by the commercial drug indomethacine. On the other hand, we have studied several soft corals of the *Eunicea* genus as well, particularly *Eunicea knighti*, which has been showed to be a good source of cembranolidés, compounds with promising antifouling activity in our laboratory bioassays. Based on those results the cembranolidés could be considered as good candidates in environmentally-friendly antifouling coatings.

Key words: marine natural products, useful marine compounds, marine drugs, antiinflammatory compounds, *antifouling* compounds, soft corals, *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Eunicea knighti*, pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins, cembranolidés.

Introducción

Aunque las investigaciones en la química de productos naturales marinos son aún muy jóvenes (podría decirse que éstas empezaron en forma en 1970), ya hay entre los aproximadamente 15.000 compuestos aislados (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 2008), numerosos productos que están en el mercado (Figura 1), por ejemplo algunas drogas antivirales como Ara A, comercializada por Glaxo Smith Kline, y AraC, comercializada por Pharmacia; drogas anticáncer como AraC, YondelisTM, producida y comercializada para Europa por Pharmamar (filial del grupo Zeltia) y comercializada en Estados Unidos por Johnson & Johnson y Bristolatina, droga que se usa en mezcla con otras para quimioterapia de cáncer y ha sido licenciada a nombre de GPC Biotech y de Bristol Mayers Squibb; drogas contra el dolor como PrialtTM o ziconotide aprobada por la FDA y por la Comisión Europea, y comercializada en Europa por Eisai; aditivos (pseudopterosinas) en cremas cosméticas comercializadas por Estée Lauder; suplementos nutritivos (FormulaidTM); reactivos en Biología Molecular, etc. (Pomponi, 1999; Proksch *et al.*, 2002; Proksch *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Kijjoa & Sawangwong, 2004; Newman & Cragg, 2004; Newman & Cragg, 2007; Butler, 2008).

Vale la pena mencionar que existen también numerosas patentes particularmente en los países desarrollados, protegiendo la propiedad y el futuro de muchos compuestos marinos y que están a la espera del momento y oportunidad adecuados para su explotación. Las dedicadas al sector salud revis-

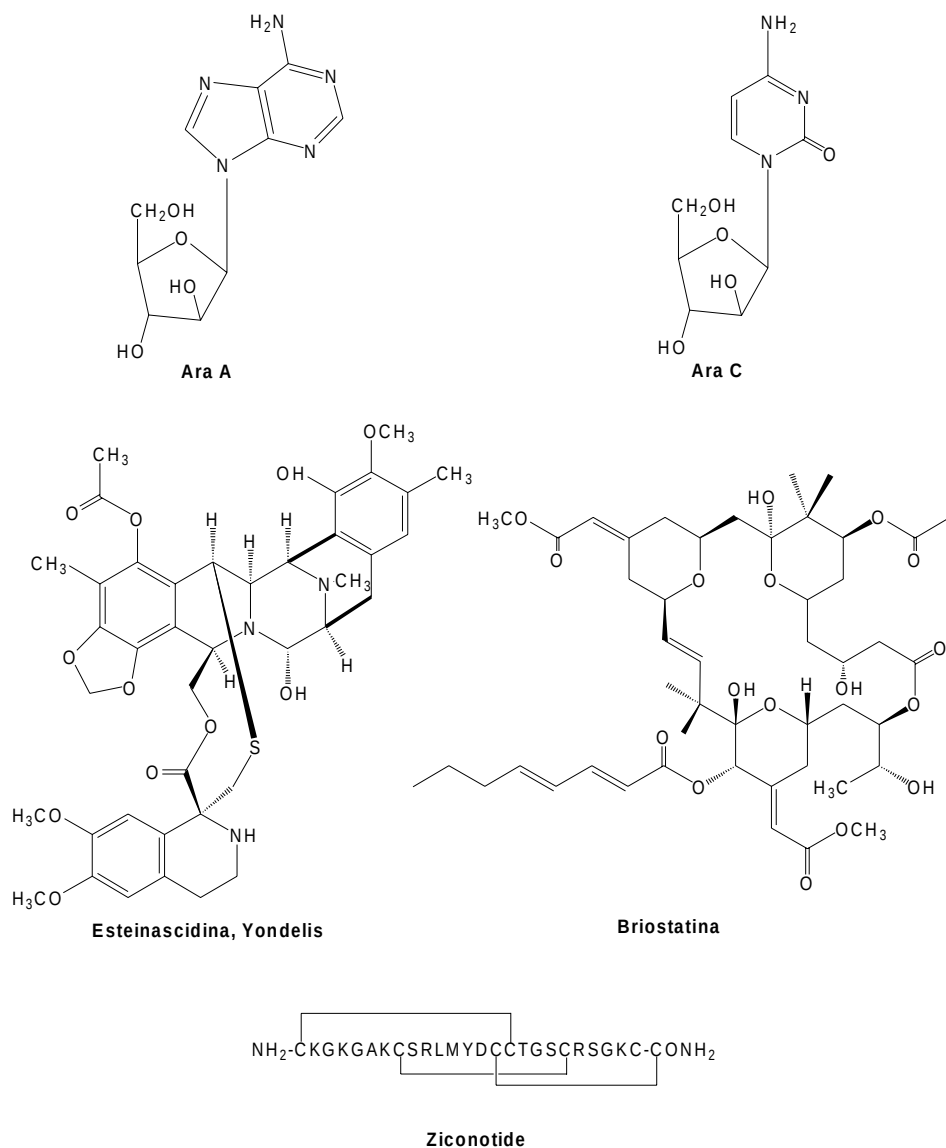


Figura 1. Algunas drogas de origen marino, actualmente comercializadas.

ten particular importancia, por los beneficios que el desarrollo de nuevos medicamentos puede traer a la especie humana (Shu, 1998), especialmente en tratamientos anticancerígenos, antivirales, antimicrobianos, antimicóticos, antiparasitarios, antibióticos, antiinflamatorios, analgésicos, en el tratamiento de enfermedades neurológicas, cardiovasculares, contra el Alzheimer

(Proksch *et al.*, 2002; Newman *et al.*, 2003; Kijjoa & Sawangwong, 2004; Newman & Cragg, 2004; Newman & Cragg, 2007; Butler, 2008).

También algunos de los compuestos de origen marino han mostrado actividades insecticidas, herbicidas y antifúngicas convirtiéndose en excelentes candidatos para ser transformados en agentes agroquímicos (Peng *et al.*, 2003). De igual forma el campo de productos naturales marinos como principios activos de recubrimientos *antifouling* ambientalmente amigables es una perspectiva reciente que bien vale la pena ser explorada (Omae, 2003; Yebra *et al.*, 2004; Fusetani & Clare (eds), 2006).

En Colombia el estudio de aislamiento e identificación de sustancias bioactivas o aprovechables industrialmente de organismos marinos, particularmente de los que viven en el Caribe colombiano, está aún en su infancia, a pesar de los esfuerzos que algunos pocos investigadores hemos venido haciendo. El grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia”, de la Universidad Nacional de Colombia, ha sido el pionero en la investigación química de organismos tales como esponjas, octocorales, zoantídeos, estrellas de mar, ofiuros y erizos de mar, entre otros, concentrando los esfuerzos en el estudio de aquellas especies que no han sido estudiadas en otras partes del mundo, pero que en nuestros bioensayos han probado ser fuente de compuestos novedosos y de interés farmacéutico e industrial en general (Duque *et al.*, 2003). En el presente trabajo se describirán únicamente los resultados de las investigaciones que hemos venido realizando durante los últimos cinco años en compuestos de origen marino con actividad antiinflamatoria y con actividad *antifouling*, y se resaltarán algunas de las enormes perspectivas que este tema de investigación ofrece.

Compuestos con actividad antiinflamatoria aislados del gorgónido *Pseudopterogorgia elisabethae* de las islas de San Andrés y Providencia

Una de las especies más estudiadas por nosotros en los últimos años y por otros científicos es *Pseudopterogorgia elisabethae*, descrita por Bayer en 1961, la cual ha mostrado ser fuente de un amplio número de terpenos bioactivos, entre los cuales se destacan las pseudopterósinas y las *seco*-pseudopterósinas por sus potentes propiedades antiinflamatorias, analgésicas y citotóxicas en pruebas *in vitro* e *in vivo*, mostrando que estos compuestos son más eficaces que algunos de los fármacos existentes (Look *et al.*, 1986a; Mayer *et al.*, 1998).

Las pseudopterósinas son diterpenos glicosidados tipo amflectano que se diferencian principalmente entre ellas en la posición de la glicosidación

(C-9 ó C-10), el azúcar (generalmente con D-xilosa, D-arabinosa y L-fucosa) y en la posición del sustituyente acetilo en el azúcar, cuando este existe, así como también en la estereoquímica de la aglicona. Interesantemente, diferentes miembros de la familia de pseudopterósinas han sido aisladas de *P. elisabethae* recolectada en distintas locaciones geográficas. Así, por ejemplo, las PsA-D, PsK, PsL, PsX y PsY fueron identificadas en ejemplares recolectados en las Islas Bahamas (Look *et al.*, 1986a; Look *et al.*, 1986b; Fenical, 1987; Roussis *et al.*, 1990; Ata *et al.*, 2004), las PsE-J fueron aisladas de ejemplares recolectados en la Isla Bermuda (Roussis *et al.*, 1990) y las PsM-O aisladas de especímenes de cayos de la Florida (Ata *et al.*, 2003). Las pseudopterósinas reportadas más recientemente en la literatura, las PsP-W, y las 3'-O-acetil-PsQ, 2'-O-acetil-PsQ, 3'-O-acetil-PsU y 2'-O-acetil-PsU, fueron aisladas de especímenes de la Isla Providencia (Duque *et al.*, 2004; Puyana *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2006).

Las *seco*-pseudopterósinas, compuestos estructuralmente relacionados con las pseudopterósinas, son diterpenos con esqueleto tipo serrulato glicosidado, se diferencian entre ellas principalmente en la posición de la glicosidación (C-7 ó C-8), el azúcar (arabinosa y L-fucosa) y la posición del sustituyente acetilo en el azúcar cuando existe acetilación. Las *seco*-PsA-D fueron encontradas por primera vez en ejemplares de *Pseudopterogorgia kallos*, recolectados en los cayos de la Florida (Look & Fenical, 1987). En ejemplares de *P. elisabethae* del mismo sitio se identificaron las *seco*-PsE-G (Ata *et al.*, 2003). Las últimas *seco*-pseudopterósinas reportadas fueron las *seco*-PsH-I aisladas de especímenes de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés (Rodríguez *et al.*, 2004) y las *seco*-PsJ-K a partir de especímenes de la Isla de Providencia (Duque *et al.*, 2006). La *seco*-PsJ también fue aislada en especímenes de la Florida (Ferns & Kerr, 2005).

A pesar de todo el trabajo publicado, a las PsP-V y *seco*-PsK, descubiertas por primera vez por nosotros, no se les ha determinado su acción biológica. Por esta razón decidimos emprender este trabajo.

Extractos crudos de diclorometano-metanol (1/1) de *P. elisabethae* recolectada en las islas de Providencia (quimiotipo 1) y de San Andrés (quimiotipo 2) fueron fraccionados en cromatografía repetitiva en columna sobre sílica gel y CLAE para obtener tres fracciones: F-1 con las pseudopterósinas (PsQ, PsS y PsU), F-2 con las amfilectosinas A y B, pseudopterósinas (PsG, PsK, PsP y PsT) y *seco*-pseudopterósinas (*seco*-PsJ y *seco*-PsK) y F-3 con dos diterpenos no glicosidados en equilibrio, los 10-acetoxi-9-hidroxi- y 9-acetoxi-10-hidroxi-amfilecta-8, 10, 12, 14-tetraenos (Duque *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2006; Correa, 2008; Correa *et al.*, 2008). Usando CLAE en fase reversa preparativa fue posible separar los compuestos anteriores y por medio de estudios espectroscópicos exhaustivos (CL-EM en modo APCI, EM de alta y baja reso-

lución, RMN (mono- y bidimensional)) y algunos métodos de transformación química se logró la identificación de las pseudopterosinas, de las amflectosinas A y B, de las *seco*-pseudopterosinas J y K y de la mezcla en equilibrio de los dos diterpenos no glicosidados (Figura 2). Los estudios de actividad antiinflamatoria fueron hechos solo con aquellos compuestos que obtuvimos en cantidad suficiente para someter a los ensayos seleccionados.

La propiedades antiinflamatorias de los dos extractos crudos y de las fracciones F-1, F-2 y F-3 fueron evaluadas “*in vivo*” usando el ensayo del “edema de oreja de ratón inducido por TPA” (De Young *et al.*, 1989), encontrando bajos niveles de inhibición de la inflamación para los extractos crudos, pero niveles comparables a indometacina (droga usada como control positivo) para las fracciones. Adicionalmente, se midió la liberación de MPA al sitio de la inflamación encontrando una marcada inhibición de la actividad de la enzima por todos los extractos y fracciones evaluadas, con niveles de potencia superiores a los mostrados por la indometacina. Además las fracciones y los compuestos puros ensayados fueron evaluados en ensayos “*in vitro*” para evaluar sus propiedades como agentes antiinflamatorios. En el ensayo de inhibición de MPO (liberado por neutrófilos humanos) (Klebanoff, 2005; Witko *et al.*, 2000), F-3 (92%), PsQ (59%), PsS (49%), PsT (52%) y PsU (52%) exhibieron niveles altos de inhibición comparados con dexametasona (control positivo) y niveles similares de actividad cuando se compararon con indometacina.

En la liberación “*in vitro*” de NO (usando como fuente células J-774) (Bogdan, 2001), los compuestos PsP y PsT mostraron la mayor potencia con niveles de inhibición entre 58-52% a 10 μ M y 50-38% a 1 μ M, respectivamente. Las PsG, PsK, PsQ, PsS, PsU y *seco*-PsK mostraron baja actividad (aprox. 25%) aún a la concentración más alta (10 μ M).

Finalmente, en el ensayo de captación de NO las PsG, PsP y *seco*-PsK no mostraron actividad sugiriendo que posiblemente estos compuestos inhiban las rutas de iNOS u otras rutas que también la influncien. En contraste, las PsG, PsQ, PsS, PsT y PsU mostraron actividad moderada pero suficiente para confirmarnos que estos compuestos inhiben la liberación de NO por las células macrófagos debido a la acción scavenger. Todos estos datos obtenidos nos permitieron hacer algunas relaciones de estructura-actividad antiinflamatoria para estos compuestos.

Perspectivas en el estudio de *P. elisabethae*

Investigaciones recientes (Mydlarz *et al.*, 2003) han venido demostrando que las pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas en *P. elisabethae* del Caribe

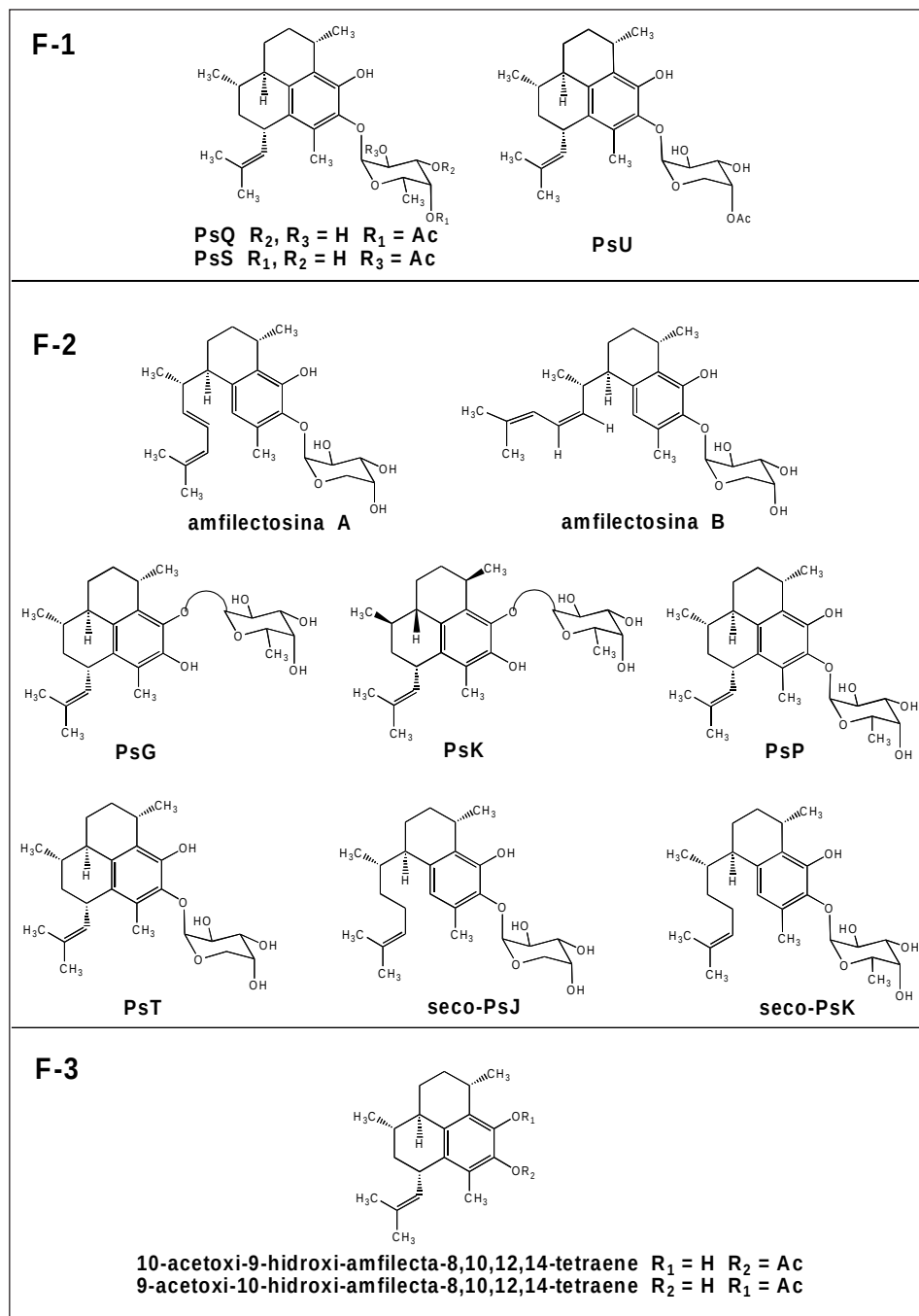


Figura 2. Compuestos aislados de *P. elisabethae* (quimotipos 1 y 2) ensayados como antiinflamatorios.

norte son producidas por los simbioses de este coral blando. Este descubrimiento explicaría por qué existe tanta variabilidad de producción de estos compuestos entre individuos y localidades (incluso en sitios tan cercanos como en las islas de San Andrés y Providencia, hemos encontrado un quimiotipo distinto para cada una de estas islas) (Puyana *et al.*, 2004). Estos resultados constituyen una pieza importante dentro del proceso de bioprospección de esta especie; así, una vez determinado su potencial los siguientes pasos para su explotación sustentable tienen que ver con la consecución de cantidades apreciables de estos metabolitos activos que aseguren la continuación de los estudios de determinación de su potencial biológico, que permitan establecer los procesos de la fabricación de productos y por último que permitan seguridad en su comercialización.

En el caso de esta especie su extracción directa del medio donde vive no es posible debido a su baja densidad poblacional por lo que se hace necesario buscar alternativas para el suministro sustentable de la materia prima (extractos crudos de pseudopterinas y *seco*-pseudopterinas). Uno de los caminos que creemos será de gran ayuda es la caracterización de los simbioses de los especímenes que viven en Colombia, tendientes al establecimiento de cuál de ellos (dinoflagelados, bacterias, hongos, etc) es el responsable de la producción de estos compuestos. Por supuesto que cultivar un microorganismo es un proceso muchísimo más fácil que cultivar el macroorganismo.

Compuestos con actividad *antifouling* aislados del coral blando *Eunicea Knighi* recolectado en la bahía de Santa Marta

La palabra *fouling* es aplicada al proceso natural de deposición de material biótico sobre superficies vivas o inanimadas sumergidas. De este modo, cualquier organismo vivo sin suficientes defensas contra epibiosis o cualquier estructura sólida inmersa en agua, ya sea natural como rocas, esqueletos coralinos, cascajo y cantos o bien estructuras creadas por el hombre como pilotes de concreto, muelles, plataformas para extracción de petróleo y gas y tuberías de diversas clases, o la obra viva de embarcaciones serán espacios potencialmente aprovechables para el asentamiento de numerosos organismos marinos. Sin embargo, la rapidez y el grado de desarrollo del *fouling* dependerá de las variables fisicoquímicas del sustrato y del agua circundante, la oferta de organismos potencialmente incrustantes y la interacción de todos estos factores.

Como puede apreciarse, este fenómeno es de especial importancia para el hombre porque la acumulación de organismos incrustantes sobre las superficies sumergidas que hemos fabricado, las deteriora por los procesos

de corrosión que se originan, causando incalculables pérdidas económicas no solo por los costos de reemplazo de tales estructuras, sino también por los costos del mantenimiento periódico o “limpieza” a la que deben someterse tales superficies, además de los costos del recubrimiento (películas *antifouling*) que normalmente se usa para protegerlas. Se calcula que los costos anuales del *fouling* son del orden de billones de dólares considerando solo lo que atañe a la industria naval.

El proceso de *fouling* implica una compleja interacción de fenómenos biológicos, físicos y químicos, tanto orgánicos como inorgánicos. Tradicionalmente este proceso se ha descrito de forma sucesional (Figura 3) (Davis *et al.*, 1989; Wahl, 1989; Fusetani & Clare, 2006) en cuatro etapas: a) adsorción de macromoléculas orgánicas (polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, etc.): ocurre casi inmediatamente es sumergida la superficie; b) adhesión de bacterias y formación de *biofilms* sobre la capa anterior, así como colonización por procariotes (diatomeas y protistas): ocurre durante la hora siguiente a la inmersión; c) colonización por eucariotes unicelulares (larvas de invertebrados o esporas de algas); d) colonización por macroorganismos (ascidias, esponjas, cirripedios, ostras, briozoos, hidroides, etc.).

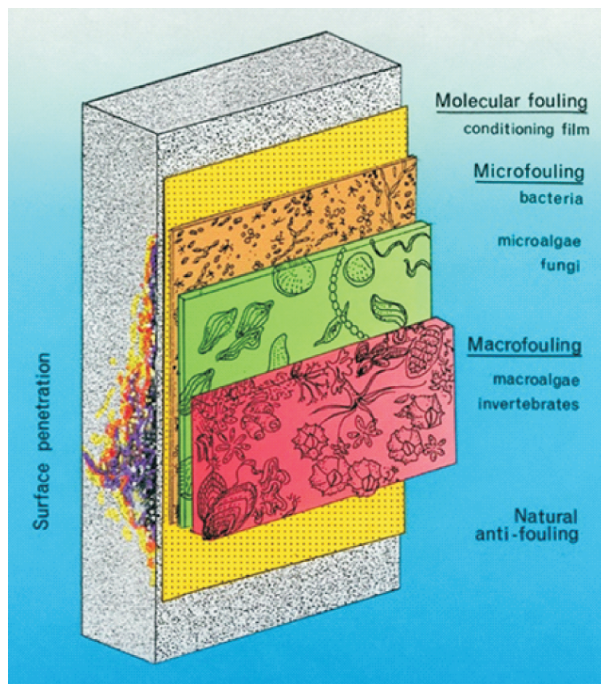


Figura 3. *Fouling*, proceso sucesional.

El uso de recubrimientos con propiedades *antifouling*, basados en agentes biocidas (Omae, 2003), es la medida de control más ampliamente utilizada hasta el momento con el fin de evitar o retardar el proceso del *fouling*, especialmente sobre cascos de embarcaciones. La función de los agentes biocidas es repeler o disuadir la fijación de organismos indeseados, o bien tener un efecto letal previo o posterior a la fijación, eliminando los organismos que se concentran cerca de la superficie tratada con uno de estos productos e impidiendo que éstos se fijen y adhieran sobre ésta (Benítez & Pereyra, 2003). La liberación del agente biocida ocurre mediante lixiviación o por hidrólisis y posterior disolución de la pintura en el agua de mar; así, todos los componentes de la pintura (matrices, ligantes, pigmentos, etc.) y no solamente los agentes biocidas son liberados al medio marino (Watermann *et al.*, 2001). Las pinturas actualmente utilizadas están hechas bien con estaño, o con cobre, o con cobioicidas (compuestos orgánicos sintéticos), o con sustancias poliméricas no tóxicas, o con extractos o compuestos naturales como principios activos.

Sin embargo, la tendencia actual en investigación en este campo es imitar lo que hacen algunos organismos sésiles que tienen su superficie limpia (sin colonización aparente, en este contexto sin *fouling*), a través de mecanismos químicos complejos que involucran el uso de compuestos producidos por ellos o por sus microorganismos epibiontes para disuadir el asentamiento de macroorganismos. Si se logran encontrar estos compuestos químicos que la naturaleza está usando como antifoulants naturales, podremos incorporarlos en recubrimientos que serán sin lugar a dudas disuasores de asentamiento, no biocidas, y por lo tanto ambientalmente amigables.

En general los bioensayos utilizados por quienes trabajan en esta área de estudio (Fusetani & Clare, 2006) están dirigidos a probar (actividad disuasora, tóxica o letal) los extractos o compuestos aislados de organismos marinos con superficies limpias, contra los organismos que usualmente componen el *fouling*; por ejemplo: ensayos contra larvas *cypris* de cirripedios, contra hidroides, inhibición del crecimiento de hongos marinos, de bacterias marinas, de fitoplancton, de algas, etc.

Estudios en Colombia

La importancia científica y comercial del *fouling* así como la diversidad de organismos existentes en el lecho del Caribe Colombiano y la complejidad de interacciones entre ellos, nos ha dado suficientes razones para incursionar en este área de trabajo y también en la búsqueda de bioensayos que nos permitan determinar el modo de interacción (físico o químico) en-

tre micro y macroorganismos (micro- y macrofouling). Así, recientemente el grupo de investigación, que dirijo desde hace unos 25 años, ha venido evaluando numerosas especies de invertebrados del Caribe que se destacan por tener una superficie relativamente limpia, pese a estar inmersas en un medio donde existe una gran diversidad de organismos buscando donde asentarse, midiendo primero la actividad *antifouling* de muchos extractos de invertebrados marinos del Caribe colombiano, usando ensayos de inhibición contra bacterias asociadas a superficies con *fouling* marino (Mora *et al.*, 2008; Tello, 2008) y ensayos de inhibición del asentamiento de larvas *cypripis* del cirripedio cosmopolita *Balanus amphitrite* (Rittschof *et al.*, 2003), especie ampliamente distribuida en el Caribe colombiano y muy abundante en la Bahía de Cartagena, y luego aislando e identificando los compuestos responsables de las propiedades *antifouling* mostradas por los extractos.

Los resultados del screening inicial (Mora *et al.*, 2008) nos permitieron seleccionar al coral blando *Eunicea knighti* como una de las fuentes importantes de compuestos *antifouling*. Así, el extracto MeOH-DCM (1: 1) del octocoral *Eunicea knighti*, recolectado en la bahía de Santa Marta, Caribe colombiano, fue fraccionado de manera bioguiada usando el bioensayo de bacterias marinas asociadas a superficies altamente colonizadas, logrando aislar mediante métodos cromatográficos dos nuevos cembranólidos (knightol y acetato de knightol) y dos anteriormente descritos (asperdiol y acetato de asperdiol), los cuales fueron identificados por extensos estudios espectroscópicos, particularmente Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear usual (mono- y bidimensional), RMN de correlación espacial (NOEDIFF y ROESY) y aplicación del método de Mosher, cuando fue necesario (obtención de ésteres *R* y *S*-MPA).

Los compuestos identificados (Figura 4) fueron: el (-) knightol: (1*S*, 7*R*, 8*R*, 3*E*, 11*E*)-7, 8-epoxicembra-3, 11, 15(17)-trien-18-ol); el (-) acetato de knightol: (acetato de 1*S*, 7*R*, 8*R*, 3*E*, 11*E*)-7, 8-epoxicembra-3, 11, 15(17)-trien-18-ol); el (-) asperdiol y el (-) acetato de asperdiol (Tello, 2008; Tello *et al.*, 2008). Para la determinación de la estereoquímica absoluta de estos compuestos fue necesario realizar transformaciones químicas mediante las cuales se obtuvieron los compuestos 2, 18-diacetato de asperdiol, (2*S*, 7*R*, 3*E*, 11*E*)-2, 18-diacetoxicembra-3, 8(19), 11, 15(17)-tetraen-7-ol, (2*S*, 7*R*, 3*E*, 8*E*, 11*E*)-2, 18-diacetoxicembra-3, 8, 11, 15(17)-tetraen-7-ol, (2*S*, 7*R*, 3*E*, 8*Z*, 11*E*)-2, 18-diacetoxicembra-3, 8, 11, 15(17)-tetraen-7-ol, y (2*S*, 7*R*, 3*E*, 11*E*)-8-cloro-2, 18-diacetoxicembra-3, 11, 15(17)-trien-7-ol, reportados aquí por primera vez (Tello, 2008; Tello *et al.*, 2008). Todos los compuestos (naturales y sintéticos, Figura 4) fueron sometidos a valoración *antifouling* contra bacterias marinas aisladas por nosotros (Gram (-): *Ochrobactrum* sp, *Ochrobactrum* sp2, *Alteromonas* sp2; Gram (+): *Bacillus* sp, *Bacillus* sp2, *Kocuria* sp), exhibiendo una alta actividad contra las bacterias Gram (+) aisladas; sin embargo, los

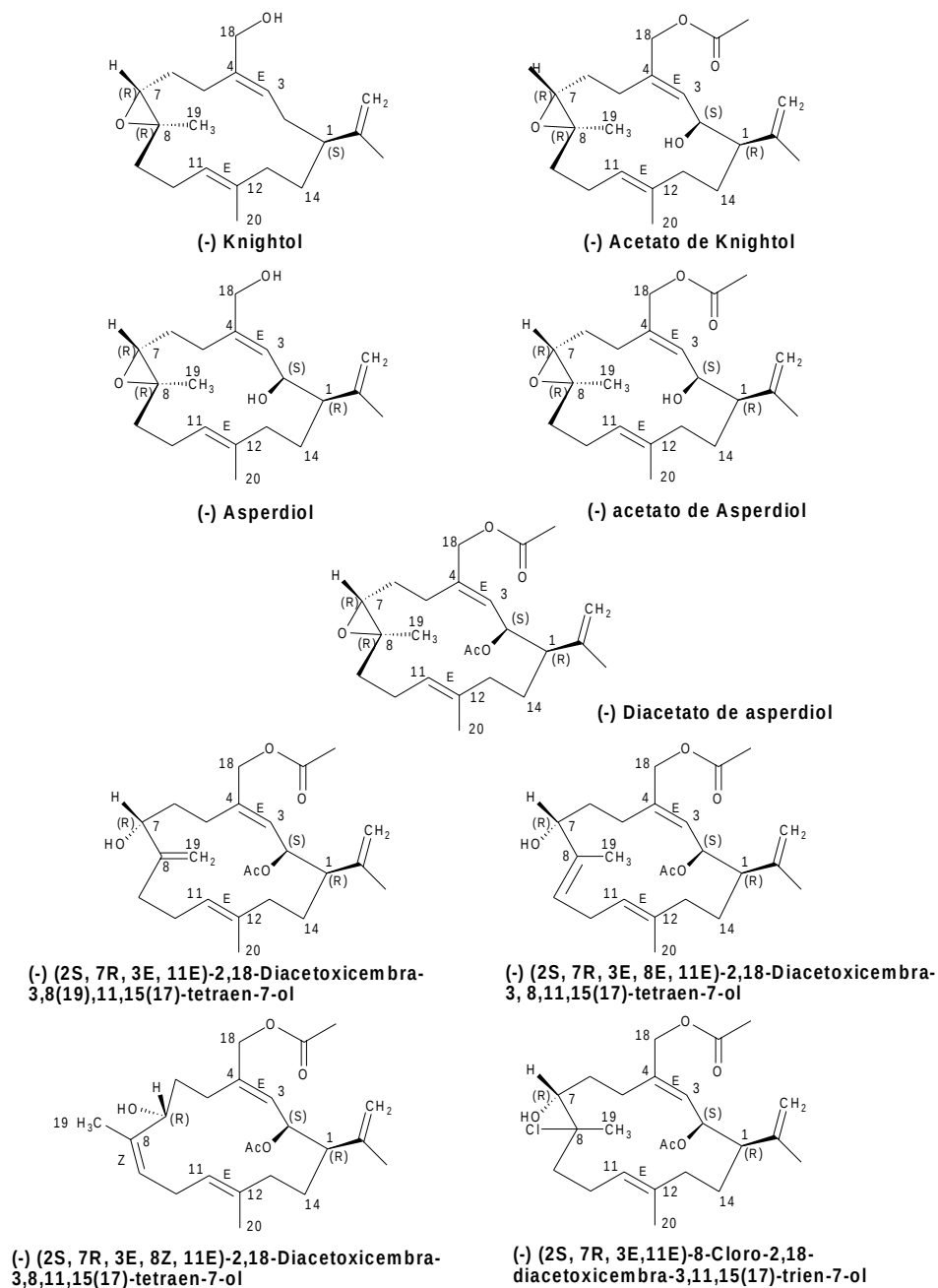


Figura 4. Compuestos aislados del coral blando *E. knighti* y compuestos obtenidos por transformación química a partir de los naturales, ensayados en pruebas *antifouling*.

compuestos semi-sintéticos también inhibieron las Gram (-). Entre todos los compuestos ensayados el Knightol mostró la mejor actividad antibacteriana y la mejor potencia, aunque su especificidad fue contra Gram (+). Los otros tres compuestos naturales (acetato de knightol, asperdiol y acetato de asperdiol) exhibieron actividad contra *Ochrobactrum* sp2 y *Bacillus* sp2, pero fue el acetato de asperdiol el que mostró halos de inhibición mayores. En el caso de los compuestos (2S, 7R, 3E, 8E, 11E)-2, 18-diacetoxicembra-3, 8, 11, 15(17)-tetraen-7-ol, (2S, 7R, 3E, 8Z, 11E)-2, 18-diacetoxicembra-3, 8, 11, 15(17)-tetraen-7-ol, el primero mostró un espectro amplio de actividad, lo que no sucedió con el segundo. Este hecho sugiere que la estereoisomería *E* para el C-8 favorece la actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-). Ensayos de campo para valoración *antifouling* se están llevando a cabo en el momento.

Perspectivas en la línea de estudio *antifouling*

Como se dijo anteriormente, la formación de biofilms microbianos es la primera etapa del proceso de colonización (*fouling*) tanto de micro- como de macroorganismos, pero es poco lo que se sabe de estas estructuras formadas por organismos microbianos eucariotes. Sin embargo, sí se sabe que la formación de estos biofilms es un prerequisite para el *fouling* de la mayoría de las larvas de organismos colonizadores y que las bacterias son unos de los microorganismos importantes en ellos. También hay ejemplos reportados en literatura sobre cepas bacterianas marinas que atraen larvas de organismos colonizadores y de otras que inhiben la colonización de la superficie donde ellas se encuentran, a través de señales químicas. Así, es claro en este momento que uno de los caminos para encontrar agentes *antifouling* naturales es el estudio de las bacterias involucradas en biofilms, particularmente en biofilms de animales con superficies limpias (sin *macrofouling*). Adicionalmente, el estudio de las estrategias que estén utilizando los invertebrados marinos y su relación con el simbiote son puntos claves del proceso.

Agradecimientos

C. D. agradece a Colciencias y a la Fundación para la Ciencia y la Tecnología del Banco de la República por la financiación de las investigaciones presentadas, así como a Coralina por el permiso para la recolección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* y al Ministerio del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por el permiso de investigación y recolección de muestras para los trabajos en *antifouling*. Así mismo es importante

mencionar que los anteriores resultados fueron el fruto de un trabajo conjunto del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y frutas de Colombia” en el cual intervinieron también los investigadores: Mónica Puyana, Leonardo Castellanos, Oscar Osorno, Luis Fernando Ospina, Catalina Arévalo, y Freddy Ramos; y los estudiantes de posgrado: Hebelín Correa, Edison Tello, Alba Lucía Valenzuela y Jennyfer Mora, y las estudiantes de pregrado: Ginna Narváez y Andrea Arias.

Referencias

- Ata A, Win HY, Holt D, Holloway P, Segstro EP, Jayatilake GS. 2004. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helv Chim Acta* 87: 1090-1098.
- Benítez CA, Pereyra A. 2003. Pinturas para controlar la incrustación en estructuras externas. Evaluación de desempeño. INPRA LATINA pp. 1-6.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology* 2: 907-916.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. 2008. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 25, 35-94 y las anteriores revisiones que aparecieron bajo el mismo título, por el grupo de investigación del Prof. Blunt y Prof. Munro, desde el año 2003, en la revista *Natural Product Reports*.
- Butler MS. 2008. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trial. *Nat Prod Rep* 25: 475-516.
- Correa C. 2007. Estudios de bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias antiinflamatorias, analgésicas y citotóxicas. Tesis de Maestría en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Correa H, Valenzuela AL, Ospina LF, Duque C. 2009. Antiinflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andres (SW Caribbean). *J. Inflamm*, In press.
- Davis AR, Targett NM, McConnell OJ, Young CM. 1989. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. En *Bioorganic Marine Chemistry*, Scheuer PJ, Ed.; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg pp. 85-114.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. 1989. Oedema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Inflamm Res* 26: 335-341.

- Duque C, Puyana M, Osorno O, Zea S. 2003. Visión retrospectiva de las investigaciones en productos naturales marinos en Colombia durante los últimos quince años. En: El Mundo Marino de Colombia: Investigación y desarrollo de territorios olvidados. Unibiblos, Bogotá.
- Duque C, Puyana M, Narvaez G, Paz A, Osorno O, Hara N, Fujimoto Y. 2004. Pseudopterosins P-V, new compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* 60: 10627-10635.
- Duque C, Puyana M, Castellanos L, Arias A, Correa H, Osorno O, Asai T, Hara N, Fujimoto Y. 2006. Further studies on the constituents of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean: Isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiaene. *Tetrahedron* 62: 4205-4213.
- Fenical W. 1987. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in biotechnology* 15: 339-341.
- Ferns TA, Kerr RG. 2005. Identification of amphilectosins as key intermediates in pseudopterosin biosynthesis. *J Org Chem* 70: 6152-6157.
- Faulkner DJ. 2002. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 19: 1-48 y todas las revisiones anteriores del mismo autor citadas en esta referencia (1977, 1984, 1986-2001).
- Fusetani N, Clare AS. (eds). 2006. Antifouling compounds. Springer ed. Berlin, Heidelberg 225 pp.
- Kijjoa A, Sawangwong P. 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs* 2: 73-82.
- Klebanoff SJ. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leuk Bio* 77: 598-625.
- Look SA, Fenical W. 1987. The *seco*-pseudopterosins: new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron* 43: 3363-3370.
- Look SA, Fenical W, Matsumoto GK, Clardy J. 1986a. The pseudopterosins: a new class of antiinflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). *J Org Chem* 51: 5140-5145.
- Look SA, Fenical W, Jacobs RS, Clardy J. 1986b. The pseudopterosins: antiinflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6238-6240.
- Mayer AMS, Jacobson PB, Fenical W, Jacobs RS, Glaser KB. 1998. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: Novel

- antiinflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. Life Sci 62: PL401-PL407.
- Mydlarz LD, et al. 2003. Chemistry & Biology 10: 1051-1056.
- Mora J, Tello E, Arévalo C, Ramos FA, Castellanos L, Osorno O, Zea S, Duque C. 2008. Evaluación de la actividad *antifouling* de extractos de invertebrados marinos del Caribe Colombiano mediante la inhibición de la susceptibilidad bacteriana usando bacterias marinas promotoras del *fouling*. En preparación.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod 66: 1022-1037.
- Newman DJ, Cragg GM. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical an advanced preclinical trials. J Nat Prod 67: 1216-1238.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod 70: 461-477.
- Omae I, 2003. General aspects of tin-free antifouling paints. Chem Rev 103: 3431-3458.
- Peng J, Shen X, El Sayed KA, Dunbar C, Perry TL, Wilkins SP, Hamann MT, Babzin S, Huesing J, Camp R, Prinsen M, Krupa D, Wideman MA. 2003. Marine natural products as prototype agrochemical agents. J Agric Food Chem 51: 2246-2252.
- Pomponi SA. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. J Biotechnol 70: 5-13.
- Proksch P, Edrade RA, Ebel R. 2002. Drugs from the seas. Current status and microbioloical implication. Appl. Microbiol. Biotechnol 59: 125-134.
- Proksch P, Edrade RA, Ebel R. 2003. Drugs from the sea. Opportunities and obstacles. Marine Drugs 1: 5-17.
- Puyana M, Narváez G, Osorno O, Duque C. 2004. Pseudopterosin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the islands of San Andres and Providencia (SW Caribbean). J Chem Ecol 30(6): 1183-1201.
- Rittschof D, Clare AS, Gerhart DJ, Avelin SM, Bonaventura J. 1992. Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite* Darwin. Biofouling 6: 115-122.
- Rodríguez II, Shi Y-P, García OJ, Rodríguez AD, Mayer AMS, Sánchez JA, Ortega-Barria E, González J- 2004. J Nat Prod 67: 1672-1680.

- Roussis V, Wu Z, Fenical W. 1990. New antiinflammatory pseudopterosins from the marine octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. J Org Chem 55: 4916-4922.
- Shu Y-Z. 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. J Nat Prod 61: 1053-1071.
- Tello E. 2008. Valoración de las propiedades antifouling del coral blando *Eunicea Knighti* del Caribe Colombiano. Tesis de Maestría en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Tello E, Castellanos L, Arevalo C, Duque C. 2008. Stereochemical determination of knightol and knightol acetate, new cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*. J Nat Prod, Submitted to.
- Wahl M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and anti fouling. Mar Ecol Prog 58: 175-189.
- Watermann B, Daehne B, Michaelis H, Sievers S, Dannenberg R, Wiegemann M. 2001. Performance of biocide-free anti fouling paints. Summary of Vol. 1-Application of test paints and inspections of 2000. Wold Wildlife Fund. Germany, p. 89.
- Witko V, Rieu P, Descamps B, Lesavre P, Halbwachs L. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest 80: 617-653.
- Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Progress in Organic Coatings 50: 75-104.

COMENTARIO AL TRABAJO DE LA PROFESORA DUQUE

En esta conferencia la profesora Carmenza Duque, de la Universidad Nacional de Colombia, quiso mostrar en un escenario comparativo la química de productos naturales marinos a nivel internacional y la química de productos naturales marinos que se hace en Colombia, particularmente mostrando los resultados de los últimos cinco años del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, grupo pionero en estos estudios en el país.

*Así, se mencionó cómo la química de productos naturales marinos ha demostrado en los últimos 40 años que la fauna y la flora marina son una fuente asombrosa de compuestos útiles para el hombre; por ejemplo: medicamentos, cremas cosméticas, complementos nutritivos, reactivos para biología molecular, insecticidas, herbicidas, antifúngicos, entre otros. En Colombia en los últimos cinco años, las investigaciones en este campo se han centrado en el estudio del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae*, habitante del archipiélago de San Andrés y Providencia, como fuente de seis nuevas sustancias, las pseudopterósinas (PsP-PsV) y de la también nueva seco-pseudopterósina K, compuestos con una excelente actividad antiinflamatoria, comparable y en muchos casos superior a drogas antiinflamatorias comerciales. Por otro lado, también se han estudiado en Colombia otros corales blandos del género *Eunicea*, por ejemplo *Eunicea Knighti* como fuente de compuestos tipo cembranólido, los cuales mostraron en nuestros ensayos antifouling de laboratorio ser compuestos que podrían usarse como aditivos en recubrimientos antifouling ambientalmente amigables.*

*Puede decirse sin lugar a equivocarse que los resultados aquí presentados sobre el coral blando *P. elisabethae*, constituyen una pieza importante dentro del proceso de bioprospección de esta especie; así, una vez determinado su potencial antiinflamatorio, los siguientes pasos para su explotación sustentable tienen que ver con la consecución de cantidades apreciables de estos metabolitos activos que aseguren la continuación de los estudios de determinación de su potencial biológico, que permitan establecer los procesos de la fabricación de productos y por último que permitan seguridad en su comercialización.*

En relación con los estudios de compuestos antifouling es claro en este momento que uno de los caminos para encontrar agentes antifouling naturales es el estudio de organismos marinos con superficies limpias (sin macrofouling) y que el desarrollo de bioensayos adecuados impulsará a Colombia en el camino de encontrar aditivos eficaces para recubrimientos antifouling ambientalmente amigables.

SECCIÓN 3

*Métodos de producción en gran escala
de compuestos naturales para su desarrollo
industrial. Síntesis química*

Modernas estrategias en la síntesis de productos naturales bioactivos

Alejandro Fernández Barrero¹

Resumen

En primer lugar, se presentan los trabajos para la obtención a escala de multigramos de productos naturales como el monoterpeno lavandulol, los sesquiterpenos germacrona y ácido ilícico o los diterpenos ácidos comúnicos desde distintas plantas. Se emplearon especies recolectadas en su medio natural y otras que se cultivaron y sobre las que se realizaron estudios de optimización, para la máxima producción de metabolitos de interés. Algunas de estas moléculas se emplean por primera vez en la síntesis de compuestos bioactivos; así se ha preparado el antitumoral β -elemeno o el agente antimigraña α -eudesmol. Una segunda estrategia estriba en la puesta a punto de métodos para la construcción de anillos de diferentes tamaños, mediante ciclaciones biomiméticas radicalarias. Se utilizan aperturas de monoepoxipoliprenos con Ti(III) en procesos de monociclación u otros que desarrollan cascadas de ciclaciones hacia policiclos. La utilización conjunta de materiales de partida naturales adecuados y de ciclaciones radicalarias constituye una poderosa herramienta sintética que se ha aplicado a distintas síntesis de terpenoides naturales.

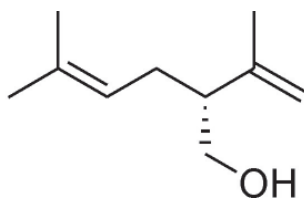
Resultados y discusión

En los últimos años el incremento constante del precio de los productos químicos, como consecuencia de la subida de los precios del petróleo, ha reforzado el papel de los productos naturales no sólo como combustibles, sino también como materia prima para la síntesis química de productos de interés. En este sentido nuestro grupo viene empleando distintos terpenoides

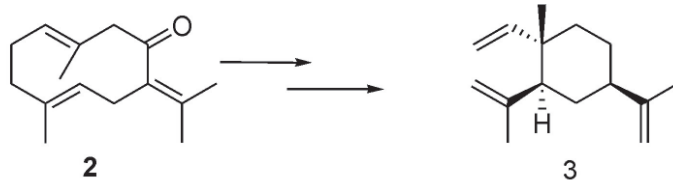
¹ Dpto. de Química Orgánica, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Avda. de Fuentenueva s/n, 18071 Granada (España). Correo electrónico: afbarre@ugr.es

naturales en síntesis, además en los últimos años hemos tratado de poner en marcha cultivos sostenibles de plantas endémicas de la Península Ibérica seleccionadas por sus características fitoquímicas.

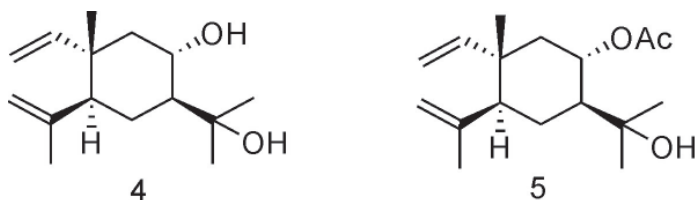
Lavandula lanata Boiss (Labiatae) es una planta endémica del Sureste de la Península Ibérica que se desarrolla principalmente en los espacios protegidos del Parque Natural de Sierra Nevada (Granada, España) (Figura 1, izquierda). Hemos detectado que contiene un aceite esencial cuyo componente mayoritario es el monoterpeno de interés en Perfumería, lavandulol **1**. Además, un estudio de la variación en la composición química según las distintas condiciones de desarrollo de la planta, puso de manifiesto que en plena floración las flores presentan un máximo porcentaje de lavandulol. Al objeto de intentar producir de manera sostenible esta molécula algunos ejemplares se multiplicaron y cultivaron en parcelas experimentales (Figura 1, derecha) donde se alcanzan rendimientos cerca del 1% en aceite esencial con un 35% de lavandulol **1**.

**1****Figura 1**

Germacrona **2** es una cetona sesquiterpénica aislada en cantidades importantes de la Asterácea boliviana *Baccharis latifolia*². En el seno del proyecto IV.12 del programa CYTED hemos estudiado la reactividad de esta molécula frente a reordenamientos y ciclaciones tranasanulares. El conocimiento de su química nos ha movido a usarla como producto de partida para la síntesis del antitumoral β -elemento **3** en sólo cinco etapas



y un 16% de rendimiento global³. La apertura de esta ruta permite aprovecharla hacia la síntesis de un amplio conjunto de elementos naturales entre los cuales merece la pena destacar 8a-hidroxielemol **4** y su derivado acetilado en el hidroxilo secundario **5**, que han sido aislados de especies de *Juniperus* y presentan actividad antifúngica contra hongos que causan eccemas⁴.

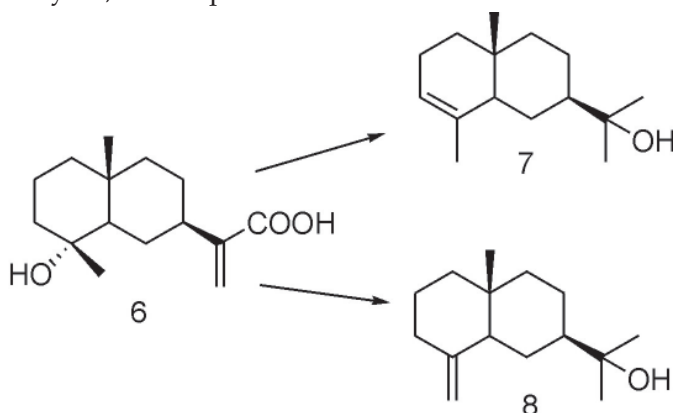


La planta *Inula viscosa* (Figura 2), conocida popularmente como “Olivarda”, es una asterácea que crece en todo el arco mediterráneo y muy abundantemente en el Sur y Este de la Península Ibérica.

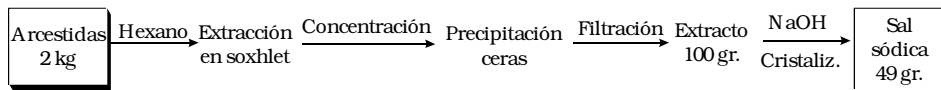


Figura 2

Su composición química ha sido objeto de numerosos trabajos destacando la presencia de sesquiterpenos de esqueleto eudesmano y farnesano⁵ y flavonoides⁶. La presencia de ácido ilícico **6** llamó nuestra atención pues se puede considerar un material de partida adecuado para la síntesis de terpenos bioactivos como α -eudesmol **7**, un agente antimigraña⁷ y su isómero β -eudesmol **8**, prometedor candidato contra el Alzheimer⁸. Con esta idea se han estudiado diferentes métodos de extracción de la planta, fraccionamientos y aislamiento de su ester metílico **9**, alcanzándose optimizaciones que permiten obtenerlo con un rendimiento del 0,90% sobre peso de planta. Se aborda entonces la síntesis de los eudesmoles que se consigue en ambos casos en seis etapas con rendimientos del 17% y 24,6 % respectivamente.

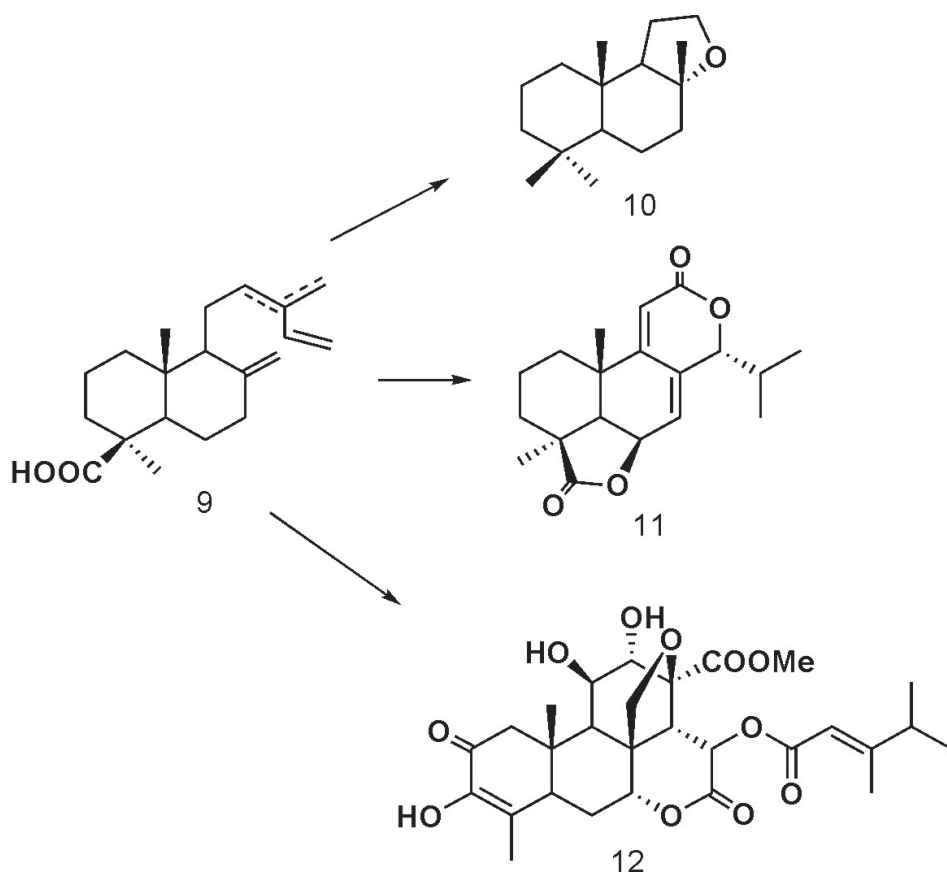


Los ácidos comúnicos **9** son diterpenos que están presentes en muchas resinas de coníferas y en ocasiones su proporción alcanza valores interesantes para su utilización como materiales de partida. Aunque inicialmente hemos empleado las bayas de enebro (*Juniperus communis*) para su obtención, después usamos otros *Juniperus* y bayas de ciprés (*Cupressus sempervirens*). Estas últimas constituyen una excelente fuente de ácido transcomúnico, pues se pueden separar cantidades de multigramos sin necesidad de separaciones cromatográficas, como puede verse en el esquema 1.



Esquema 1

Los ácidos comúnicos los utilizamos en síntesis de distintos compuestos de interés, fijadores de Perfumería como ambrox **10**⁹, podolactonas **11** alelopáticas y con potente actividad antimicrobiana¹⁰ y en síntesis formales de quasinoídes bioactivos **12**¹¹ (Esquema 2).

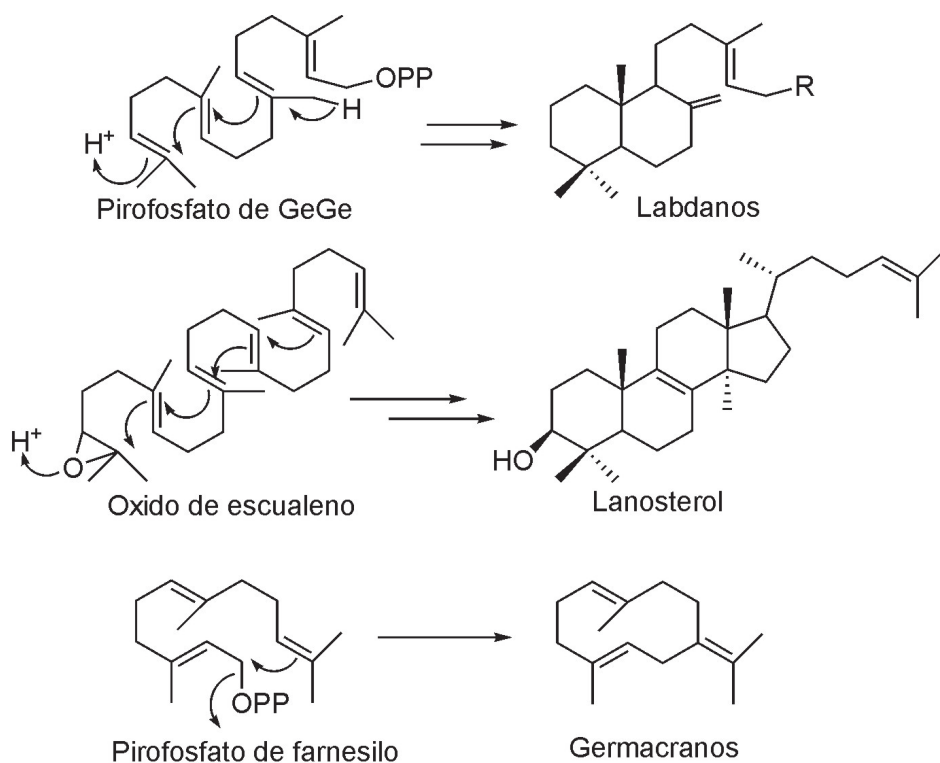


Esquema 2

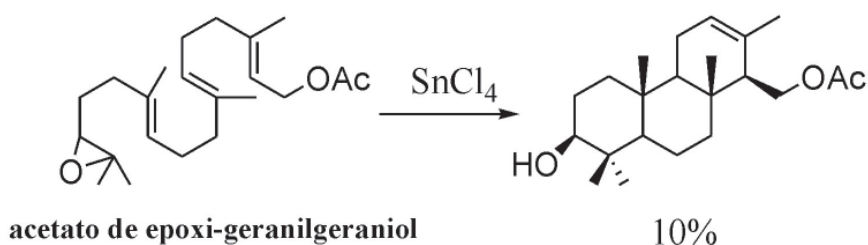
Otra estrategia que estamos empleando en síntesis de compuestos bioactivos está centrada en “ciclaciones biomiméticas”¹². La biosíntesis de terpenoides cíclicos presenta como etapas clave procesos de ciclación de poliprenos acíclicos a través de carbocationes como puede verse en el esquema 3.

La imitación en el laboratorio de este tipo de procesos naturales de ciclación se ha llevado a cabo usualmente desde mediados del siglo XX, generando carbocationes en el laboratorio; por ejemplo, usando epóxidos de poliprenos con ácidos de Lewis¹³ (Esquema 4).

Las ciclaciones inducidas mediante la generación de un radical carbonado, se han empleado menos frecuentemente y en este terreno hemos desarrollado una metodología general. Esta emplea monoepóxidos de poliprenos y Cp_2TiCl

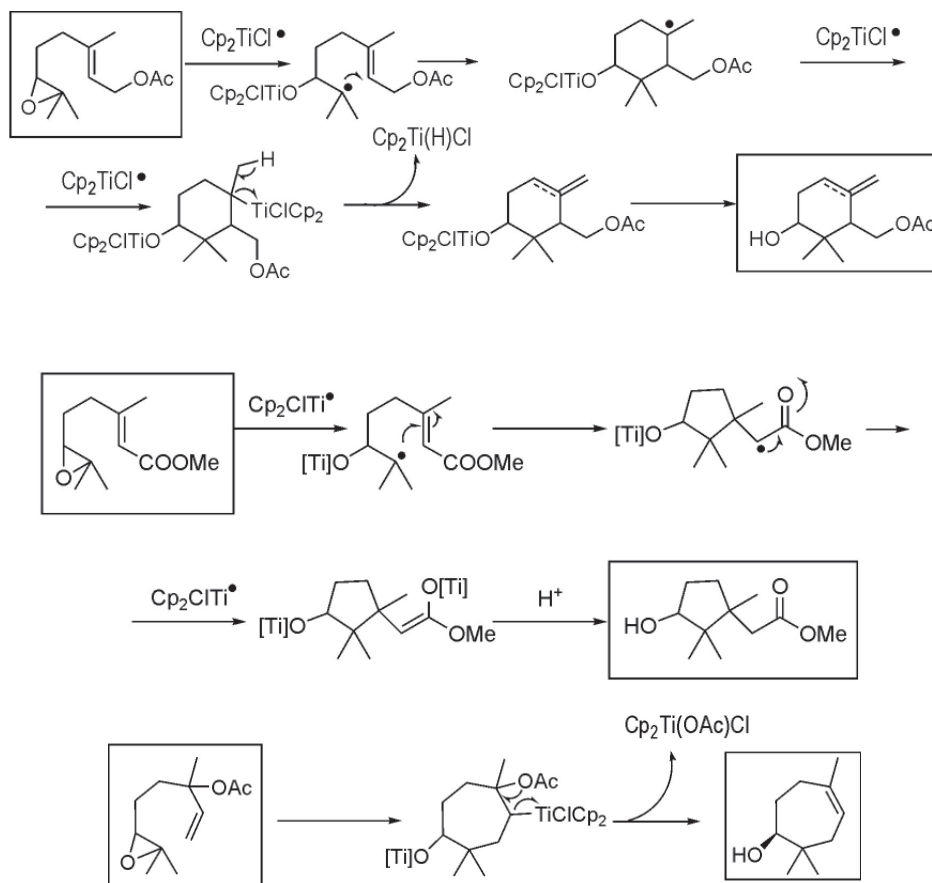


Esquema 3



Esquema 4

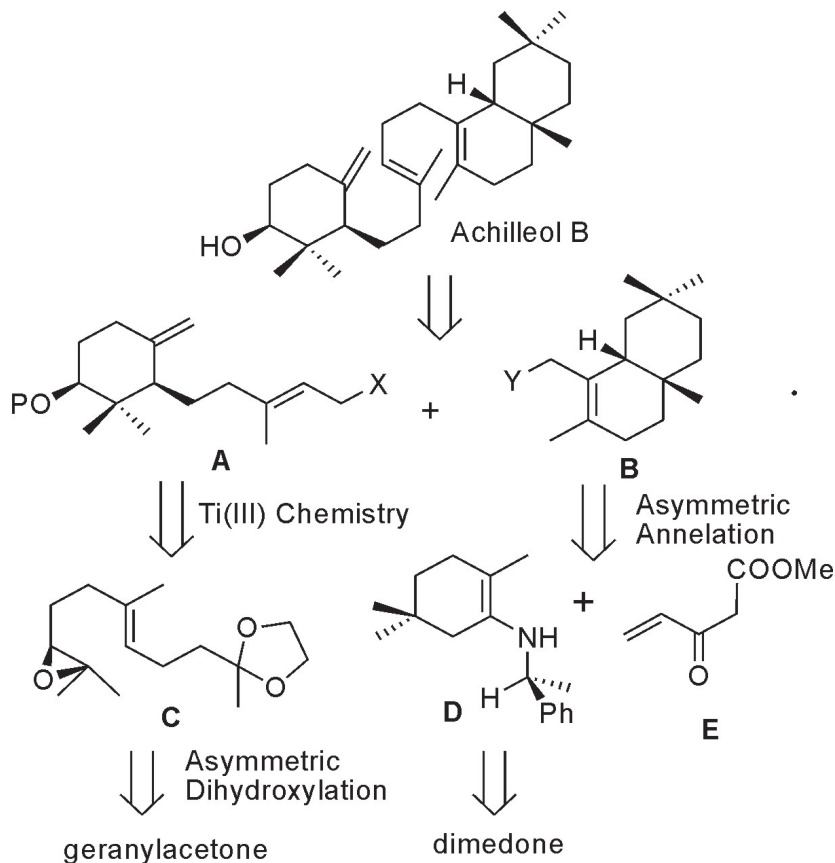
para provocar una apertura homolítica del oxirano originando un radical centrado en el carbono que es el encargado de iniciar los procesos de ciclación¹⁴. Cuando la terminación de la ciclación tiene lugar por adición del radical sobre un doble enlace trisustituido, se cierran ciclos de seis eslabones a través de procesos 6-*endo*-trig, mientras que si el doble enlace se conjuga con un carbonilo o el cierre se da con un doble enlace monosustituido del tipo del linalool, los ciclos pueden ser de cinco y siete eslabones respectivamente (Esquema 5).



Esquema 5

Este tipo de ciclaciones se puede llevar a cabo bien con exceso de Cp_2TiCl_2 en presencia de Mn o con cantidades catalíticas de reactivo organometálico, empleando CITMS/colidina como agente regenerador del Ti(III) ¹⁵. Por otra parte se pueden hacer síntesis enantioselectivas y con ese objetivo hemos preparado oxiranos de forma asimétrica utilizando tanto la dihidroxilación como la epoxidación asimétrica¹⁶. La metodología se ha aplicado para la síntesis de numerosas moléculas terpenoides con una amplia gama de esqueletos y funciones¹⁷. Un ejemplo representativo estriba en la síntesis asimétrica de achilleol B **13**, un triterpeno irregular aislado por nosotros en 1990 de *Achillea odorata*¹⁸. A esta molécula se le asignó una unión interanular trans, en base a inexistencia de efecto NOE entre el metilo y CH de la unión interanular en RMN-H. Sin embargo, publicaciones posteriores pusieron de manifiesto la existencia de triterpenos relacionados, como camelliol A que posee unión interanular

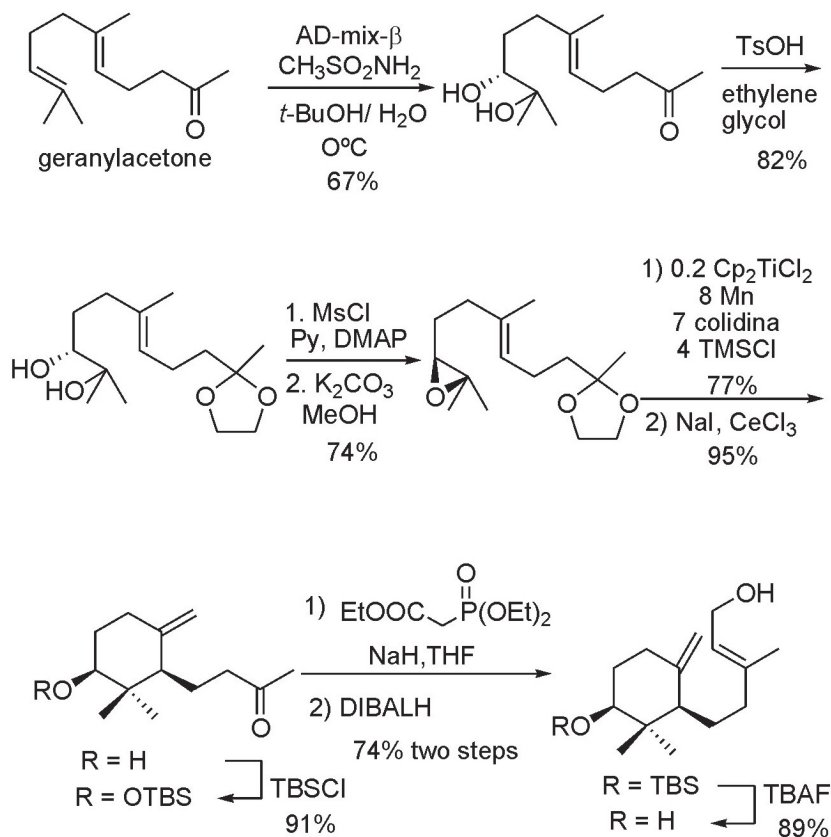
cis, por eso sospechamos que la estereoquímica era errónea y planteamos su síntesis según el esquema retrosintético 6.



Esquema 6

La síntesis se plantea a partir de la conexión de dos sintones C15, **A** y **B**. El primero se obtendrá teniendo como etapas clave una ciclación radicalaria con Ti(III) y una dihidroxilación asimétrica. Para la obtención de **B** es fundamental la anelación de Robinson asimétrica utilizando una enamina quiral. Se planteó inicialmente la síntesis del enantiómero dibujado en el esquema pensando que perteneciera a la serie enantiomérica normal de los triterpenos. Para ello se empleará AD-mix- β que conduce a alcoholes secundarios de configuración R. Para la anelación se formará la enamina con (S)-fenil etilamina.

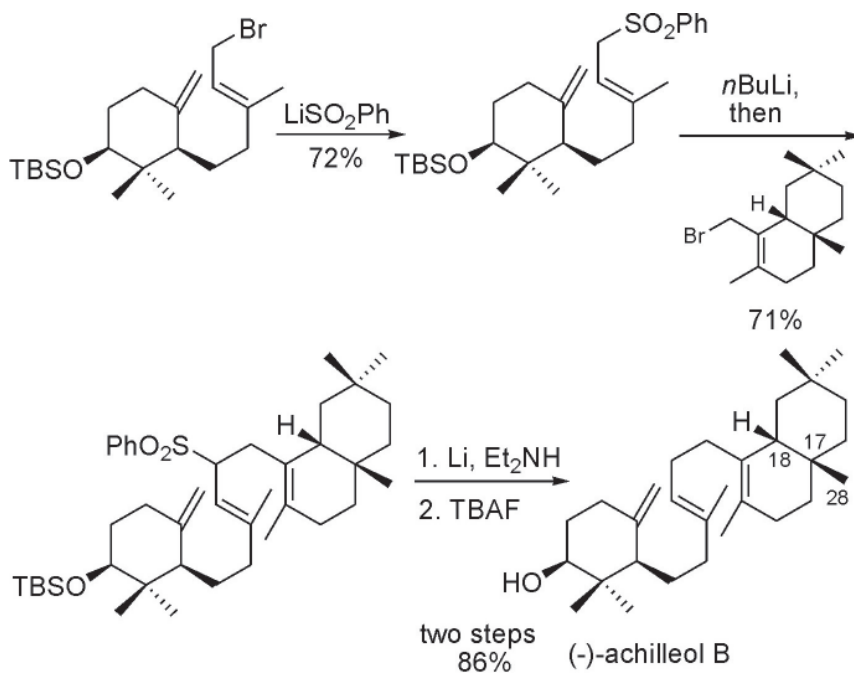
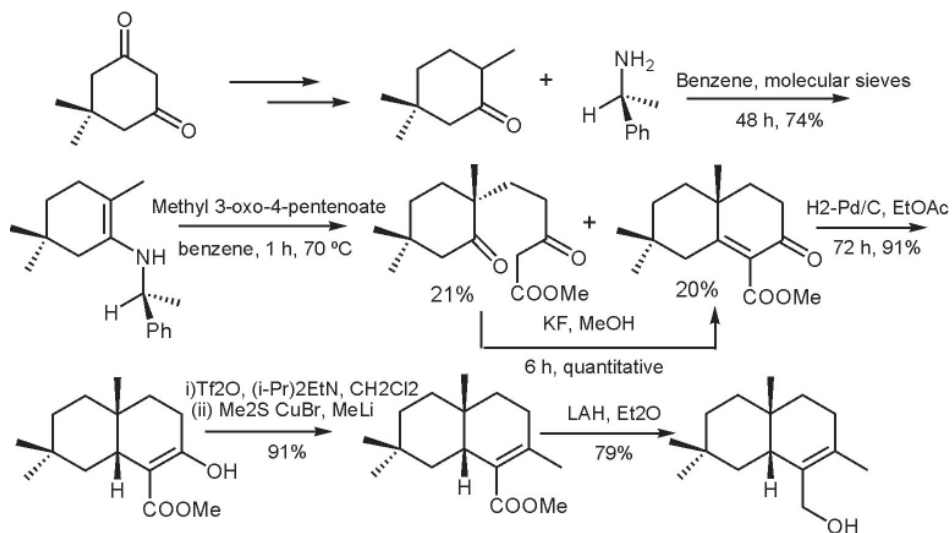
La síntesis del sintón **A** parte de geranylacetona y está resumida en el esquema 7.



Esquema 7

La dihidroxilación asimétrica se consigue con un 67% reciclando el producto de partida que queda sin reaccionar. Por otro lado, es de destacar el buen rendimiento y regioselectividad hacia el doble enlace exocíclico en el proceso de ciclación con Ti(III). El alcohol primario final se broma con PBr₃ y el bromo derivado se transforma en la fenilsulfona **A**. La síntesis del síntón **B** parte de dimedona y puede verse en el esquema 8. La anelación de Robinson da lugar a una mezcla de mono y biciclo productos, el primero se puede transformar cuantitativamente en el segundo por tratamiento con fluoruro potásico. El alcohol final se broma con PBr₃ dando el síntón **B**.

El acoplamiento y etapas finales (Esquema 9) conducen a un producto idéntico a Achilleol B natural y de la comparación de sus rotaciones ópticas se reasigna la configuración relativa y establece de forma inequívoca la configuración absoluta¹⁹.



Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Ciencia la subvención recibida, Proyectos BQU-2002-03211 y CTQ2006-15575-C02-01 y al Programa CYTED por el Proyecto IV.12.

Referencias

1. Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Arteaga JF, Burillo J. 2008. *Natural Product Communications* 3: 379-381.
2. Loayza I, Abujder D, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Jean F. 1995. *Phytochemistry* 38: 381-389.
3. Catalán JV. 2007. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
4. Ohashi H, Asai T, Kawai S. 1994. *Holzforschung* 48: 193-198.
5. Grande M, Bellido IS, Torres P, Piera F. 1992. *J Nat Prod* 55: 1074-1079.
6. Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Catalan JV. 2008. *Natural Product Communications* 3: 567-576.
7. Aoyama Y, Araki Y, Konoike T. 2001. *Synlett* 1452-1454.
8. Kimura I. 2006. *Yakugaku Zasshi* 126: 133-143.
9. Barrero AF, Altarejos J, Alvarez-Manzaneda EJ, Ramos JM, Salido S. 1993. *Tetrahedron* 49: 625-632.
10. Barrero AF, Alvarez-Manzaneda E, Alvarez-Manzaneda R, Chahboun R, Meneses R, Cuerva JM, Aparicio M, Romera JL. 2001. *Org Letters* 3: 647-650.
11. Barrero AF, Arseniyadis S, Quilez JF, Herrador MM, Valdivia M, Jiménez D. 2002. *J Org Chem* 67: 2501-2508.
12. De la Torre MC, Sierra MA. 2004. *Angew Chem Int Ed* 43: 160-181.
13. Van Tamelen EE, Storni A, Hessler EJ, Schwartz MJ. 1963. *J Am Chem Soc* 85: 3295-3296.
14. Barrero AF, Cuerva JM, Herrador MM, Valdivia MV. 2001. *J Org Chem* 66: 4074-4078.
15. Justicia J, Rosales A, Buñuel E, Oller-Lopez JL, Valdivia M, Haidour A, Oltra JE, Barrero AF, Cardenas D, Cuerva JM. 2004. *Chemistry—A European Journal* 10: 1778-1788.
16. Barrero AF, Quilez del Moral J, Herrador MM, Sanchez E, Arteaga J. 2006. *J Mex Chem Soc* 50: 149-156.
17. Barrero AF, Quilez del Moral JF, Sánchez EM, Arteaga JF. 2006. *Eur J Org Chem* 7: 1627-1641.
18. Barrero AF, Manzaneda EA, Manzaneda RA, Arseniyadis S, Guillet E. 1990. *Tetrahedron* 46: 8161-8168.
19. Arteaga JF, Domingo V, Quilez del Moral JF, Barrero AF. 2008. *Organic Letters* 10: 1723-1726.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL PROFESOR FERNÁNDEZ

El conferencista, profesor Alejandro Fernández de la Universidad de Granada, España, hace énfasis en cómo en los últimos años se ha incrementado el consumo de medicamentos y de muchos otros productos de importancia industrial que son productos naturales o provienen de productos naturales y en que a medida que se incrementa el precio de los productos químicos, como consecuencia de la subida de los precios del petróleo, se ha visto la necesidad de buscar mejores rutas de síntesis para obtener en forma más barata y con mayor rendimiento muchos productos químicos de interés. Adicionalmente, menciona que se vienen empleando en España como materia prima para la síntesis química, distintos terpenoides naturales para procesos de hemi-síntesis (proceso mucho más corto y barato que una síntesis total) y que en los últimos años se han tratado de poner en marcha cultivos sostenibles de plantas endémicas de la Península Ibérica seleccionadas por sus características fitoquímicas, como fuente de sustancias de partida para las síntesis.

En primer lugar, se presentaron los trabajos para la obtención a escala de multigramos de productos naturales como el monoterpene lavandulol, los sesquiterpenos germacrona y ácido ilícico o los diterpenos ácidos comúnicos desde distintas plantas. Se emplearon especies recolectadas en su medio natural y otras que se cultivaron y sobre las que se realizaron estudios de optimización, para la máxima producción de metabolitos de interés. Algunas de estas moléculas se emplean por primera vez en la síntesis de compuestos bioactivos, así se ha preparado el antitumoral β -elemeno o el agente antimigraña β -eudesmol. Una segunda estrategia descrita, estriba en la puesta a punto de métodos para la construcción de anillos de diferentes tamaños, mediante ciclaciones biomiméticas radicalarias. Se utilizan aperturas de monoepoxipoliprenos con Ti(III) en procesos de monociclación u otros que desarrollan cascadas de ciclaciones hacia policiclos. La utilización conjunta de materiales de partida naturales adecuados y de ciclaciones radicalarias constituye una poderosa herramienta sintética que se ha aplicado a distintas síntesis de terpenoides naturales.

En conclusión, es muy importante señalar que en la actualidad dependemos de la invención del químico sintético (quien debe descubrir diversas estrategias de síntesis) para obtener cantidades de compuestos bioactivos en el orden de los multigramos, para satisfacer no solo los experimentos necesarios para la producción de nuevas drogas sino también la demanda del mercado de medicamentos, etapa posterior a su fabricación.

Perspectivas de la agroindustria de aceites esenciales en Colombia

Elena E. Stashenko¹

Las plantas pueden ser aprovechadas industrialmente de diferentes maneras, *i.e.* como material de propagación y ornamental, como material vegetal fresco (uso alimentario) y seco, que puede ser utilizado en infusiones y decocciones (básicamente, plantas medicinales), y como fuente de nuevos productos y mezclas, entre los cuales figuran absolutos, concretos, oleorresinas y aceites esenciales. Para la obtención de absolutos, concretos u oleorresinas se emplean diferentes solventes (pentano, hexano, éter de petróleo, *etc.*). Los extractos usados en la industria de alimentos se obtienen por el método de extracción con fluido supercrítico de las especias, *e.g.* clavo, jengibre, comino, páprika, *etc.*

La composición de estos productos depende del método de extracción y determina su uso final. Los constituyentes de extractos de plantas o aceites esenciales son metabolitos secundarios, que en su mayoría corresponden a alguna de las siguientes familias de compuestos químicos: terpenoides, flavonoides, cumarinas, alcaloides, fenilpropanoides, fenoles y carotenoides, entre otros. La calidad de los aceites esenciales y en consecuencia, su precio, depende del estado de la planta, de la parte de la planta utilizada en la destilación, del origen geográfico, las condiciones climáticas y el método de extracción, entre algunas otras variables a considerar.

Las plantas medicinales constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes. El 0,7% de las plantas medicinales posee principios activos constituidos total o parcialmente por esencias y se denominan plantas aromáticas; de ellas, se obtienen esencias. Los aceites esenciales (esencias) son mezclas aromáticas, de rico y complejo olor, que evocan la

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Directora Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM; Correo electrónico: elena@tucan.uis.edu.co

fragancia concentrada de la planta original o de su parte (flor, semilla). Los aceites se aíslan de las plantas aromáticas por métodos físico-químicos (destilación con agua, con vapor húmedo o seco, según la planta), en cantidades variadas que pueden ir de 0,001% (pétalos de rosas) hasta 6-7% (semillas de anís). En el caso de frutos cítricos se emplea también la técnica de expresión y/o raspado de la cáscara. Estos preciados líquidos (sus valores pueden variar de 1 a 5000 US \$/kg) encuentran múltiples aplicaciones, básicamente en tres industrias, a saber: farmacéutica, de alimentos, y de perfumes y fragancias (Figura 1).

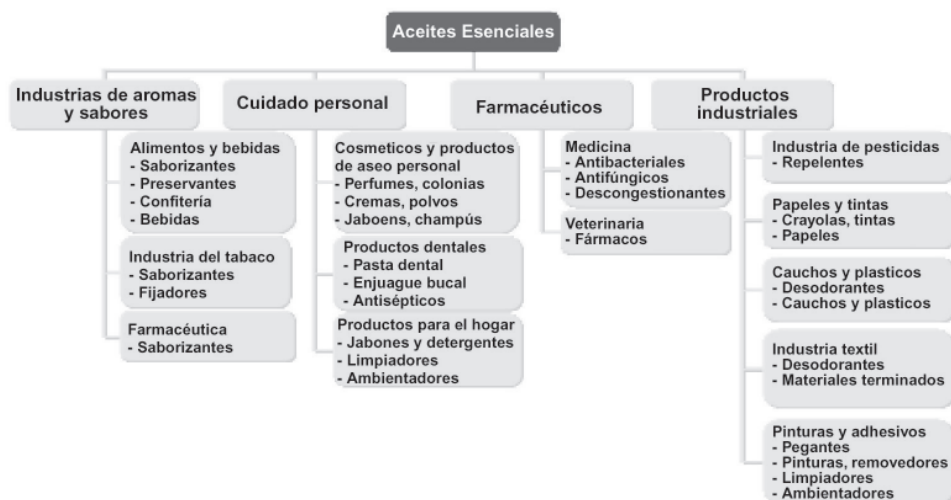


Figura 1. Principales áreas de aplicación de los aceites esenciales.

Se conocen y se han estudiado más de tres mil plantas aromáticas en el mundo y sus aceites esenciales, pero sólo alrededor de trescientos se utilizan comercialmente. La gran mayoría de plantas aromáticas tiene su origen en el Mediterráneo (romero, salvia, manzanilla, albahaca, lavanda, ruda, menta, orégano, *armoise*, mejorana, tomillo, algunas umbelíferas, e.g. cilantro, hinojo, coriandro, eneldo, etc.), otras plantas provienen de Asia tropical y sub-tropical (cítricos, patchoulí, vetiver, jengibre, citronela, limonaria, jazmín, ylang-ylang, clavo, canela, cardamomo, sándalo, etc.), de África (anís, geranio), Australia (eucalipto, árbol de té). La vainilla, que actualmente se cultiva industrialmente en Madagascar y otras islas del Océano Índico, en Tahití y, a pequeña escala, en México, es originaria del Nuevo Mundo. Entre las plantas aromáticas y sus aceites esenciales que se comercializan hoy en día en el mundo, muy pocos son de origen latinoamericano, en parte, por el escaso desarrollo de su industria de aceites, excepto en Brasil (cítricos, mentas, orégano, jengibre, vetiver, patchoulí, otros), Argentina (cítricos, oréganos, mentas), México (vainilla, lima) y

Guatemala (citronela, limonaria), en parte, por la falta de la investigación más intensa sobre las plantas aromáticas nativas, o debido a la muy estricta y bastante engorrosa reglamentación para la introducción de un nuevo aceite en el mercado internacional para su uso y comercialización. Nótese que las plantas aromáticas cultivadas industrialmente en Latinoamérica, en su mayoría, son de origen foráneo, son plantas introducidas de Asia o de Europa (cítricos, mentas, oréganos, limonaria, etc.).

Los usos finales de los aceites esenciales son muy diversos. Principalmente, son ingredientes de productos de las industrias de alimentos, cosmética y de aseo personal y farmacéutica (Figura 1). La base de datos *Web of Science* registra 1317 publicaciones sobre el empleo de aceites esenciales, en el período 1997-2007 (fecha de consulta: 22-05-2007, CENIVAM-PNP-Colciencias); se observa que el 57%, 23% y 9% de estas publicaciones se refieren a usos en los sectores de alimentos, medicina y cosmética, respectivamente. No se esperan disminuciones importantes en estas aplicaciones, especialmente ahora que existe una fuerte tendencia entre los consumidores por preferir lo natural. Son productos de origen vegetal los aceites esenciales, así como las fracciones aisladas de ellos y las sustancias obtenidas por semi-síntesis a partir de componentes mayoritarios de las esencias naturales.

El estudio de los aceites esenciales, sus nuevas fuentes (plantas), aplicaciones (nuevos usos) y transformaciones químicas y microbiológicas, es el objeto de investigación de muchos grupos tanto en universidades como en la industria. Tal como se puede observar en la Figura 2, la tasa de crecimiento anual

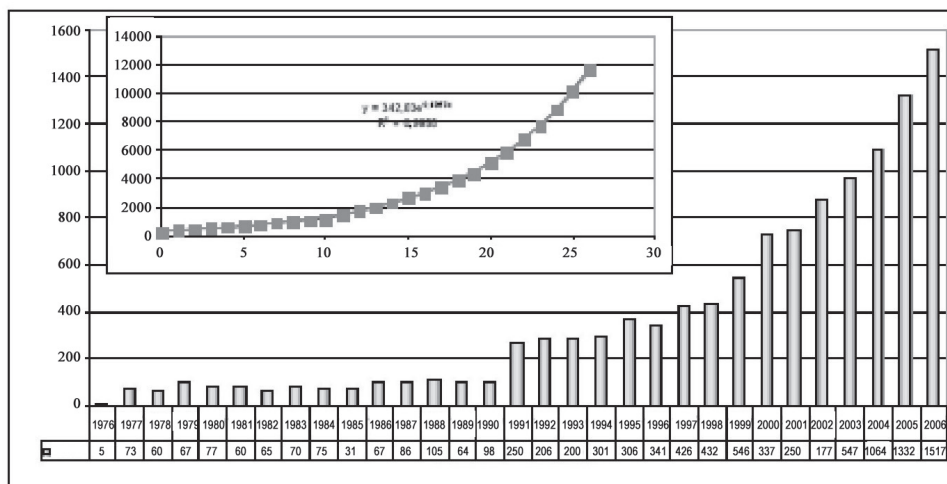


Figura 2. Evaluación en el tiempo (1976-2006) del número de publicaciones sobre aceites esenciales en el mundo. CENIVAM - PNP - Colciencias.

Fuente ISI Web of Science. Fecha de consulta: 22-05-2007.

promedio del número de publicaciones (1976-2006) sobre aceites esenciales alcanza el 14% ($R^2 = 0,998$); en los países latinoamericanos ésta es más alta, *i.e.* 20%; más de la mitad de las publicaciones sobre esencias se hace en Brasil, seguido de Argentina (15%) y Cuba (9%). Colombia contribuye con un modesto 2% de todas las publicaciones científicas sobre aceites esenciales en Latinoamérica, situación que debe ser mejorada, sobre todo teniendo en cuenta que Colombia es uno de los países del mundo con mayor biodiversidad, que incluye también las plantas con alto potencial esenciero.

En el contexto macroeconómico mundial, la industria de sabores y fragancias ocupa un importante tercer lugar después de los gigantes de las de petróleo y farmacéutica. La industria de sabores y fragancias mueve alrededor de 18 billones de dólares al año, siendo diez empresas multinacionales las que representan el 70% del mercado (Figura 3).

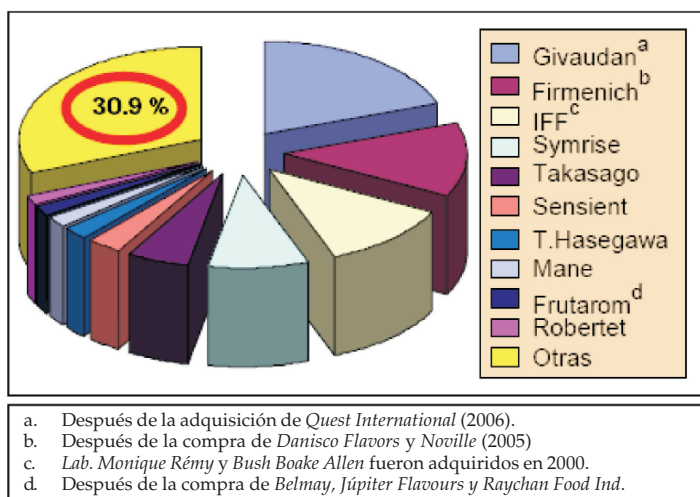


Figura 3. Principales industrias de sabores y fragancias y su contribución en el mercado internacional en 2006 (*Perfurmer & Flavorist*, 2007)

Los aceites esenciales –metabolitos secundarios volátiles de plantas aromáticas–, forman parte importante de este mercado. Se producen miles de toneladas de estos productos de origen natural anualmente; diez esencias (fundamentalmente de frutos cítricos, lavandas, mentas, citronela y eucalipto, entre otras) representan alrededor del 80% de todo el mercado de aceites volátiles. La industria de alimentos, la industria farmacéutica y la de cosméticos y perfumes absorben lo grueso de la producción de aceites esenciales en el mundo. Para una producción competitiva y mercadeo exi-

tos, la industria de aceites esenciales debe innovar, descubrir productos nuevos, de características sorprendentes e inconfundibles. En la era de la genética, la nanotecnología y la conquista espacial, la innovación en el campo de sabores, fragancias y perfumes se enfoca en el estudio de la biodiversidad, en la búsqueda de nuevas plantas, nuevos metabolitos secundarios y nuevos usos de esencias (perfumes funcionalizados, cosmeceúticos, aromacología y otros).

La biodiversidad del Trópico es universalmente reconocida; al lado de Brasil, Colombia goza de una inmensa variedad de plantas, muchas aún poco estudiadas. Entre ellas, se encuentran también las plantas aromáticas, distintivas por su fragancia y la posibilidad del aislamiento de aceites esenciales en cantidades apreciables ($> 0,5 - 1,0\%$). La inmensa cantidad de flores ofrece la oportunidad de descubrir fragancias sorprendentes, atrevidas y descomunales. La tendencia mundial focalizada en el uso de productos de origen natural, ecológicos y de cultivo orgánico, como ingredientes en alimentos, bases de perfumes y/o cosméticos, así como una inspiración en nuevas notas odoríferas, que brindan plantas y flores exóticas, hacen extremadamente promisorio el campo de investigación de metabolitos secundarios volátiles. La diversidad vegetal, junto con la diversidad molecular, permiten encontrar nuevos productos de aprovechamiento sostenible agrícola, en beneficio social del país y de su economía.

Colombia es un importador neto de aceites esenciales, cada año importa más y más, tal como lo refleja la Figura 4. En mayor proporción, se importan los aceites de cítricos (naranja), así como los de mentas y de eucalipto, entre otros. Las industrias de alimentos y de aseo personal son grandes demandantes. El desarrollo de la naciente industria de aceites esenciales en Colombia podría enfocarse tanto para reemplazar los productos foráneos, que pueden producirse aquí, como para obtener y exportar los aceites esenciales de plantas aromáticas cultivadas en Colombia, introducidas y –lo que es de elevado interés–, nativas. El establecimiento de una nueva industria requiere no solamente de la inversión y el subsidio inicial, sino de la investigación previa en varios campos, a saber: estudios botánicos y ecológicos, análisis químico de esencias obtenidas y su calidad, diseño de plantas extractoras, cultivos piloto, estudio de factibilidad y planes de negocio, mercadeo y comercialización de productos, entre otras actividades. Las universidades colombianas son llamadas a participar en este tipo de proyectos de envergadura e importancia nacional.

En el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, a través del Proyecto *“Estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias, extractos y derivados naturales en Colombia”*, financiado por Colciencias, cinco universidades

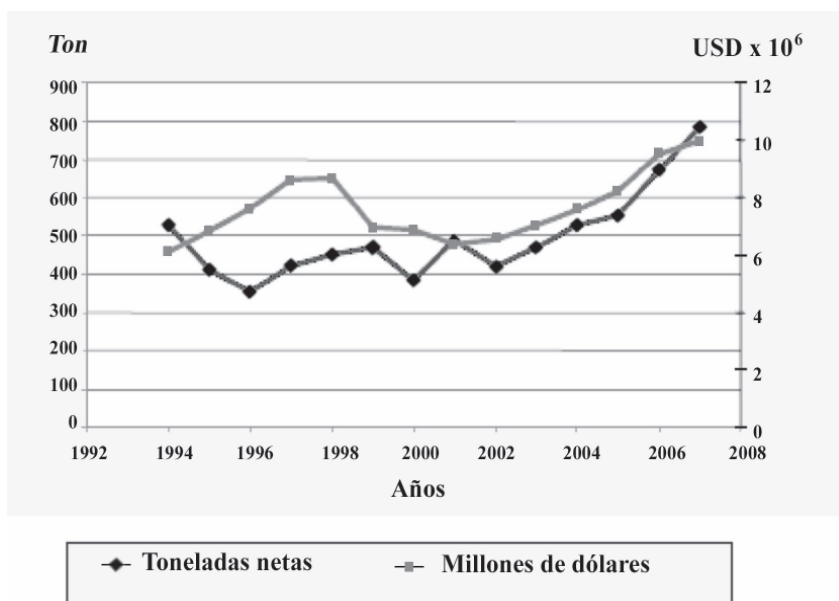


Figura 4. Importación de aceites esenciales en Colombia. DANE, 2008.

públicas (nueve grupos de investigación de la Universidad Industrial de Santander, Universidades de Cartagena, Antioquia, Tecnológica de Pereira y la Universidad Tecnológica del Chocó) unieron sus esfuerzos para investigar la diversidad botánica y molecular de plantas nativas colombianas, con miras a explorar la posibilidad de su uso como fuentes de esencias y metabolitos secundarios con diversa bioactividad (antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral, entre otras). Más de 100 investigadores, profesores, estudiantes de pregrado, maestría, doctorado y jóvenes investigadores trabajan en el Centro; entre ellos, botánicos, biólogos, químicos, ingenieros químicos, mecánicos, industriales, economistas, microbiólogos, médicos, entre otros especialistas.

La meta central de las investigaciones que realiza el CENIVAM es el desarrollo en Colombia de la agroindustria de aceites esenciales. Aunque en muchos otros países tropicales (India, Indonesia, Ceilán, Marruecos, Egipto, Brasil, otros), ésta es una agroindustria desarrollada, en Colombia todavía se encuentra en sus primeras etapas de crecimiento y es muy pequeño aún el volumen de aceites esenciales que se comercializa.

Dentro de las perspectivas de la agroindustria de aceites esenciales en Colombia figura la apertura y el desarrollo de nuevos campos de aplicación; este campo es el uso de aceites esenciales en productos que posean

propiedades cosméticas y farmacéuticas, denominados *cosmecéuticos*. La industria cosmética reviste importancia especial dentro de las perspectivas de crecimiento de la agroindustria de aceites esenciales, porque figura entre las tres primeras a nivel mundial, según el monto de las transacciones. Dentro de los factores que inciden sobre el crecimiento de la industria cosmética se pueden mencionar el envejecimiento de la población mundial, sobre todo en los países desarrollados, el aumento de las campañas que promueven el cuidado de la piel y destacan la importancia de la imagen y la belleza, la existencia de un mayor número de consumidores jóvenes y de mediana edad que se preocupan por prevenir y minimizar los efectos del envejecimiento, la preferencia por productos naturales, y una creciente demanda de productos que presenten resultados eficaces y verificables de manera visual, sensorial o funcional.

La Comisión Europea define en el artículo 1 de la Directiva 76/768 EEC, que los cosméticos son *"aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano (piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes, membranas mucosas de la cavidad oral), con el objetivo de limpiar, perfumar o proteger y mantener la buena condición, cambiar su apariencia y/o corregir los olores del cuerpo"*.

Dentro de las principales afecciones de la piel figuran la dermatitis (atópica o eccema, por contacto o seborreica), las infecciones bacterianas (residentes o transeúntes), las infecciones micóticas, las infecciones parasitarias y las infecciones virales. Otro aspecto del cuidado de la piel, para el que existen productos cosméticos, es el envejecimiento cutáneo. Éste es un proceso biológico progresivo, irreversible, que se manifiesta en cambios funcionales, pérdida de elasticidad y la aparición de líneas de expresión. Sin embargo, este proceso natural puede ser acelerado por factores extrínsecos, entre los que figuran las radiaciones, la contaminación ambiental y los radicales.

En el desarrollo reciente de la industria cosmética dedicada al cuidado personal han surgido nuevas palabras para calificar productos que cruzan algunas fronteras y cumplen más de una función. Ejemplos de estos términos nuevos son: *fitocosméticos*, *dermacosméticos*, cosméticos activos, cosméticos bioactivos, cosméticos funcionales, cosméticos terapéuticos, *dermacéuticos*, *skinceuticals* y medicamentos cosméticos.

Según la empresa Freedonia Group Inc., en el año 2003, la demanda de productos calificados como cosmecéuticos tuvo un volumen de 4200 millones de dólares. Los productos para el cuidado de la piel representaron el 61% de este total. Dentro de estos últimos, los antioxidantes y los filtros

solares constituyeron el 34,5% y el 16%, respectivamente. Los aceites esenciales son fuente potencial de principios activos para estas aplicaciones.

Debido a que los aceites esenciales están constituidos por metabolitos secundarios, su composición está modificada por factores intrínsecos (genotipo, parte de la planta, tiempo del día) y extrínsecos (luz, agua, temperatura, viento, suelo, fertilizantes), que afectan la biosíntesis. Existen en el mundo sitios en los que se reúne el conjunto apropiado de condiciones geobotánicas para cada tipo de planta aromática y es por esto que en el mercado de aceites esenciales es importante la *denominación de origen* cuando se realizan las transacciones comerciales. Es así como Brasil, la Florida (EE.UU.) y España se destacan como proveedores de aceites esenciales de cítricos, mientras que Asia Oriental es fuente tradicional de los aceites de jengibre y patchoulí. Colombia debe lograr insertarse en el mapa mundial de proveedores de aceites esenciales, pero para esto requiere consolidar su oferta alrededor de un número reducido de aceites que pueda producir con calidades y cantidades reproducibles, garantizando la cantidad y la continuidad del suministro.

La búsqueda de nuevas aplicaciones de aceites esenciales en *cosmecéuticos* incluye la prospección biológica, para encontrar plantas con olor agradable, cuyo cultivo sea relativamente sencillo. Los aceites de las plantas candidato se someten a diversos ensayos para establecer su actividad biológica. El número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales, originadas en Brasil, es cerca de la tercera parte de las originadas en los EE.UU., el mayor productor. La producción científica de Colombia es bastante reducida (2% de la producción latinoamericana), superada por Costa Rica, Venezuela, Chile y México.

Una característica del desarrollo de la agroindustria de aceites esenciales en un país, es la aparición de empresas especializadas en algunos sectores de la actividad comercial. Así, en países reconocidos mundialmente como actores importantes en el mercado de aceites esenciales, se pueden distinguir empresas independientes con ofertas de productos tales como: aceites esenciales crudos, aceites esenciales de grado farmacéutico, aceites esenciales concentrados o desterpenados, aceites esenciales rectificadas, aceites esenciales sintéticos, aceites esenciales artificiales, aromas y mezclas.

Según el Directorio Industrial *Kompass*, India posee 220 empresas dedicadas al comercio de aceites esenciales, mientras que Francia, el Reino Unido e Italia poseen, respectivamente, 210, 86 y 69 empresas. El reto para el desarrollo de la agroindustria de aceites esenciales en Colombia es formidable, pero la oportunidad existe en la naturaleza cambiante y

competitiva del mercado internacional. La industria de perfumes compite con base en la novedad. Continuamente se buscan nuevas tendencias, nuevas notas aromatizantes y saborizantes. Las investigaciones bio-prospectivas apuntan al desarrollo de conocimiento sobre nuevas plantas y nuevas propiedades. La innovación industrial explora nuevos usos y el aprovechamiento de tecnologías emergentes. La productividad creciente se afina para satisfacer sectores nacientes, preferencias de consumo y esquemas de comercialización nuevos. Como se aprecia, la capacidad competitiva es una característica dinámica, en continua validación, que está fuertemente apoyada en la investigación científica y el desarrollo de conocimiento especializado.

El Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM adelanta investigaciones que permitan construir la base científica de respaldo para la naciente agroindustria de aceites esenciales en Colombia. Esta Unión Temporal de cinco universidades estatales (nueve grupos de investigación) está en su cuarto año de actividad, en desarrollo de las siguientes cinco líneas de investigación:

1. Etnobotánica y taxonomía; colecta de plantas.
2. Extracción y caracterización de aceites y extractos.
3. Transformación química, catalítica y enzimática de aceites esenciales y sus componentes principales.
4. Evaluación de actividad biológica de aceites esenciales y productos de síntesis.
5. Transferencia de tecnología: talleres y experimento piloto en el campo.

La realización de más de veinte salidas de campo ha permitido la recolección de 425 accesiones botánicas, de las cuales se han obtenido más de 200 aceites esenciales y 75 extractos, los cuales se han sometido a pruebas para la evaluación de los siguientes tipos de actividad: organoléptica, citotóxica, ictiotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-*Leishmania*, anti-*Tripanosoma*, anti-*Candida*, anticancerígena, alelopática y anti-*Quorum Sensing*, entre otras.

Se han encontrado buenos resultados de la actividad biológica en 34% de los aceites esenciales, 31% de los extractos etanólicos y 25% de los compuestos sintéticos. Estos últimos son productos de síntesis orgánica que utiliza sustancias naturales como modelo y que en varios casos emplea componentes de aceites esenciales como sustancias de partida.

CENIVAM participa en proyectos productivos de aceites esenciales a escala piloto en el Departamento de Santander (municipios de Socorro y Sucre), con asociaciones de cultivadores, desarrollando los elementos de la cadena productiva de plantas aromáticas y aceites esenciales (Figura 5).

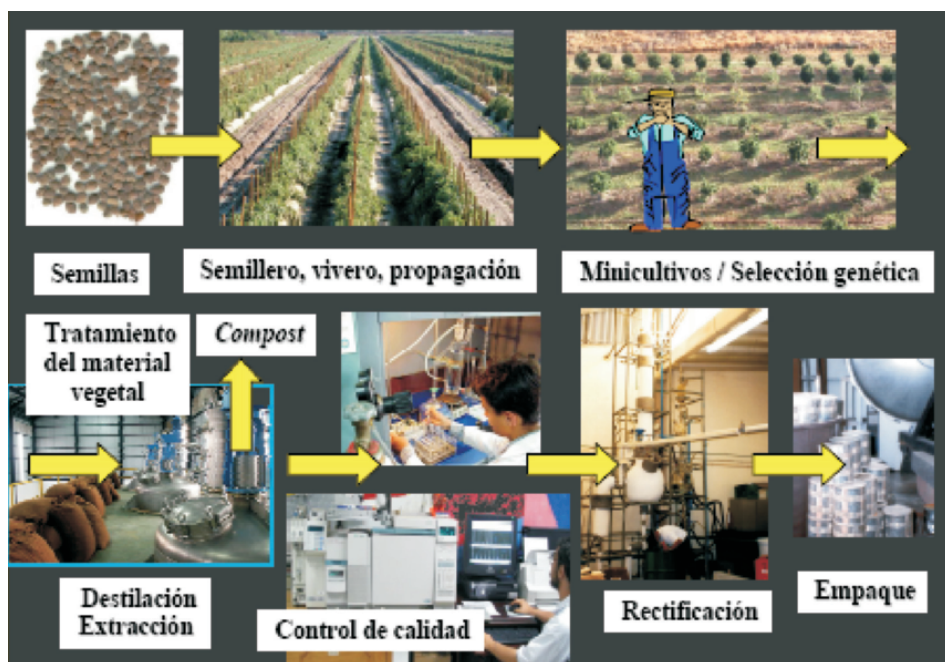


Figura 5. Elementos de la cadena productiva de plantas aromáticas y aceites esenciales.

El trabajo se enfoca en las capacitaciones técnicas, construcción de viveros, propagación de plantas, su siembra y estudio de diversas variables como la altura, grado de fertilización y la densidad de siembra. En los municipios se instalarán las plantas extractoras diseñadas en la Universidad Industrial de Santander. Ya se han diseñado y construido equipos fijos y móviles (Figura 6) para la extracción de aceites esenciales. Como resultado de esta etapa de trabajo se obtendrán los datos reales sobre los costos de producción de aceites esenciales en Colombia y su calidad, que permitirán vislumbrar la viabilidad de la industria y el margen de ganancia que ésta pueda dar en el país. Se realizan cursos y pasantías de entrenamiento en la producción y el aseguramiento de la calidad de los aceites esenciales y se mantiene una vigilancia tecnológica activa para la detección de nuevos desarrollos en áreas relacionadas con esta agroindustria.



Figura 6. Equipo de extracción de aceites esenciales móvil diseñado en CENIVAM.

COMENTARIO AL TRABAJO DE LA PROFESORA STASHENKO

La profesora Elena Stashenko de la Universidad Industrial de Santander enfoca su conferencia en las investigaciones que desarrolla el CENIVAM en Colombia sobre la agroindustria de aceites esenciales. Aunque en muchos otros países tropicales esta es una agroindustria desarrollada, en Colombia todavía está en sus primeras etapas de crecimiento y es muy pequeño el volumen de aceites esenciales exportado. Los usos finales de los aceites esenciales son muy variados. Normalmente son ingredientes de productos de las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica. La base de datos Web of Science registra 1317 publicaciones sobre usos de aceites esenciales, aparecidas en el período 1997-2007. 57%, 23% y 9% de estas publicaciones se referían a usos en los sectores de alimentos, medicina y cosmética, respectivamente. No se esperan disminuciones importantes en estas aplicaciones, especialmente ahora que existe una fuerte tendencia entre los consumidores por preferir lo natural. Son productos de origen vegetal los aceites esenciales, las fracciones aisladas de las esencias y las sustancias obtenidas por semi-síntesis a partir de esencias.

Menciona la conferencista las investigaciones realizadas en 425 plantas de la región de donde se han obtenido hasta el momento 221 aceites esenciales y 75 extractos, los cuales se someten a pruebas para la evaluación de actividades biológicas, las cuales determinarán la posible aplicación del aceite obtenido. Entre las principales actividades biológicas que se determinan están: actividad organoléptica, citotóxica, ictiotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-leishmania, anti-tripanosoma, anti-candida, anticancerígeno y alelopática.

Consideramos que esta forma de aproximarse al estudio de los aceites esenciales y sus aplicaciones es novedosa y sobre todo apunta efectivamente hacia la ampliación en Colombia del campo de aplicación de estas mezclas de sustancias de origen natural. Adicionalmente, la determinación de actividades biológicas además de las actividades de olor y sabor que usualmente se le atribuyen a los aceites esenciales, permiten su aplicación en el campo de la salud. También vale la pena mencionar que si en el futuro se logra la fabricación controlada de esta clase de esencias con propiedades medicinales, se van dando pasos importantes hacia nuevos usos y nuevos esquemas de comercialización.

SECCIÓN 4

*Métodos de producción en gran escala
de compuestos naturales para su desarrollo industrial.
Métodos biotecnológicos*

Pseudopterosine synthesis: the promise and the challenge

Russell G. Kerr¹

Introduction

While the field of marine natural products chemistry has enjoyed sustained growth over the past 20 years or more, the field of biosynthesis has not developed at the same pace. However, due to the existence of highly conserved regions in polyketide synthases (PKS) and non-ribosomal peptide synthases (NRPS), these two classes of natural products are being examined in a number of marine organisms which is leading to an understanding of the mechanism of production of these compounds. This research is also leading to answers concerning the source of the biosynthetic pathway in the complex assemblages of an invertebrate and its microbial symbionts.

Terpenes represent the largest group of natural products with many notable examples from the marine environment such as the anti-inflammatory pseudopterosins from *Pseudopterogorgia elisabethae*¹ and the antimitotic agent eleutherobin from *Erythropodium caribaeorum*.² There has been only a very limited amount of experimental work addressing fundamental biosynthetic questions with this group of highly significant marine natural products. In 1970, Anderson *et al.* demonstrated the *de novo* biosynthesis of crassin acetate in the gorgonian, *Pseudoplexaura porosa*.³ Other examples of terpene biosynthetic investigations in marine organisms include studies on the *Dendrodoris* sp. nudibranchs.⁴⁻⁸ These experiments revealed that the drimane sesquiterpenes were produced *de novo* from mevalonate. Additionally, the isonitrile metabolites isolated from various sponges are a family of terpenes that have been extensively investigated. This work confirmed the role of inorganic cyanide in the biosynthesis

¹ Department of Chemistry and Department of Biomedical Sciences. Atlantic Veterinary College. University of Prince Edward Island.

and showed that the incorporation of cyanide into the compounds is an enzymatic process.⁹⁻¹²

As described in a review by Garson,¹³ a primary problem in pathway elucidation work is the low levels on incorporation of labeled metabolites thus “forcing” researchers to use radioisotopes rather than stable isotope methodology. The lack of sequence homology in terpene synthases (= terpene cyclases) precludes the direct molecular approach to investigations of this fundamental step in terpene biosynthesis.¹⁴

Gorgonians, also known as sea whips, sea fans or sea plumes, are prominent members of tropical and subtropical habitats world wide. In the Bahamas and Florida, gorgonians represent an estimated 38% of the known fauna with over 195 species documented from the families Briareidae, Plexauridae and Gorgoniidae.¹⁵ These organisms have proven to be a prolific source of novel bioactive natural products, particularly terpenes which exhibit a range of biomedical activities.^{16, 17} The pseudopterosins are a family of diterpene glycosides produced by the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* which is found in only a few areas of the Caribbean. Interestingly, different members of the pseudopterosin family are found in *P. elisabethae* collected in distinct geographic locations. There are 26 derivatives, pseudopterosins A – Z (PsA – PsZ) and in most cases, the pseudopterosins are present in 2-5% of the crude extract. In spite of the relatively large number of pseudopterosins, there are only minor changes in the structures within this family. All pseudopterosins possess the amphilectane diterpene skeleton. The carbohydrate moiety can be located at either C-9 or C-10, the identity and degree of acetylation can vary and the isobutenyl group at C-1 can be either a or b. Pseudopterosins A – D (Figure 1) have been isolated from *P. elisabethae* collected from Grand Bahama Island and the central Bahamas [1], Ps E – J were isolated from collections in Bermuda, and Ps K and L were the sole pseudopterosins of collections from Great Abaco Island.¹⁸ Collections of the closely related *Pseudopterogorgia kallos* from Cosgrove Shoal near the Marquesas Keys in Florida revealed the presence of *seco*-pseudopterosins A-D (Figure 1)¹⁹ with the serrulatane ring system. The pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins are anti-inflammatory and analgesic agents with potencies superior to that of existing drugs such as indomethacin in mouse ear models.^{20, 21} Further, one of the pseudopterosins has a substantial commercial market as a skin care product. They are not active against PLA₂, cyclooxygenase and cytokine release or as regulators of adhesion molecules. Evidence suggests the pseudopterosins block eicosanoid release rather than biosynthesis in murine macrophages.²² A simple derivative of pseudopterosin A, methopterosin, has successfully completed Phase II clinical trials as a topical anti-inflammatory agent.

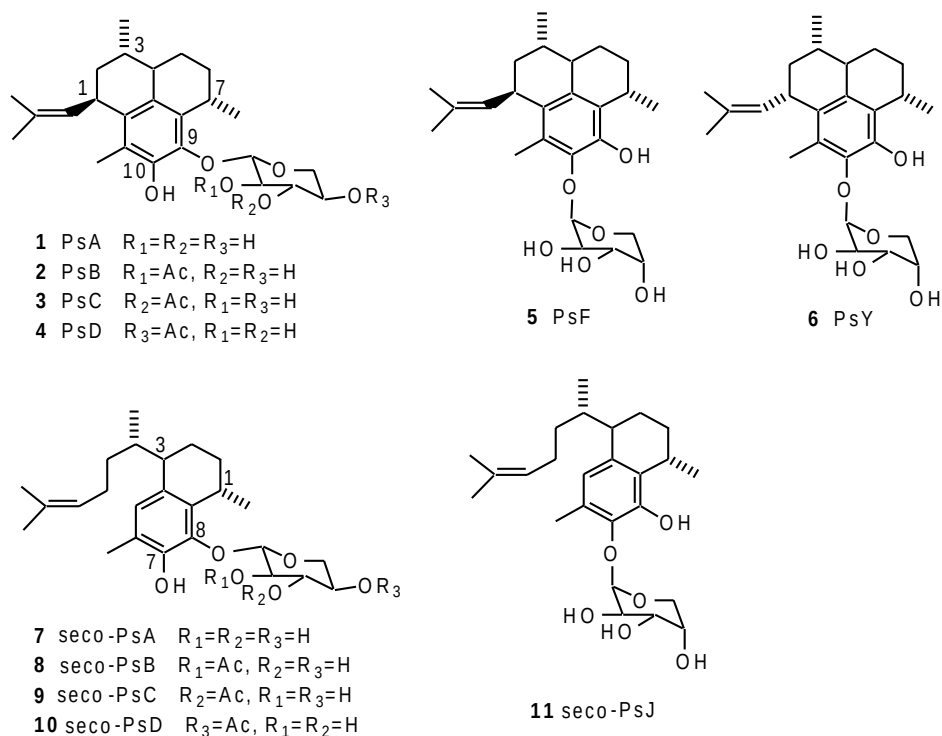


Figure 1. Structures of selected pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins.

The supply issue

Despite the great potential of new marine natural products, a limited supply of many of these agents represents a significant hurdle in the transformation of the marine natural product into a commercial entity. Such a supply issue is not unique to marine-based natural products; the cancer drug paclitaxel is a prime example of how supply can hamper development. The lack of a fully renewable supply has negatively impacted the development of numerous marine natural products. This supply problem was recognized over ten years ago and while some progress has been made since that time, it is clear that a variety of supply methods are still required to address the different classes and complexities of marine natural products. There is therefore a desperate need to answer fundamental biosynthetic questions about the origins of marine natural products without hurting their species and ecosystem survival as such progress can lead to the development of reliable, cost effective production methods. Identification of a microbial source could afford a production method based on fermentation of the natural producer. Pathway elucidation studies can lead

to cloning of biosynthetic genes and heterologous expression of all, or part, of the biosynthetic machinery.

Strategy

In efforts to develop a commercially relevant production method, detailed biosynthetic experiments were conducted. Identification of biosynthetic intermediates can lead to the purification of biosynthetic enzymes and sequencing of such proteins provides critical information leading to the cloning of corresponding biosynthetic genes. The identification of biosynthetic intermediates can also be of use in confirming the presence of biosynthetic capability in a microbial symbiont.

Development of conditions to evaluate potential biosynthetic intermediates

Given the paucity of literature discussing biosynthetic experiments of natural products from gorgonian corals, a first task in elucidating the biosynthesis of the pseudopterosins was to establish conditions in which to evaluate potential intermediates. A viable cell-free extract (CFE) of *P. elisabethae* was generated using conditions derived from the plant biosynthesis literature.²³ The CFE was prepared by homogenizing flash frozen gorgonian tissue in a phosphate buffer at the pH of the organism (7.7) with EDTA and β -mercaptoethanol with liquid nitrogen. Cellular debris was removed by centrifugation and the supernatant stored in aliquots at -80°C for use in biosynthetic experiments. This CFE transformed [C_1 - 3H]-GGPP into pseudopterosins with sufficient yield to allow for rigorous establishment of radiochemical purity.²³ In a typical experiment, ca. 35,000 dpm 3H -labeled pseudopterosins was recovered from an incubation of 1 μCi 3H -GGPP with 25 mL CFE.

Identification of elisabethatriene, the diterpene cyclase product with a serrulatane skeleton

One of the key intermediates in terpene biosynthesis is the cyclase product. In terrestrial systems numerous such intermediates have been characterized and, in general, these compounds are unsaturated hydrocarbons. Terpene cyclases catalyze intramolecular, electrophillic reactions with acyclic intermediates at various metabolic branch points in isoprenoid metabolism.^{24, 25} A growing number of terpene synthases (= terpene cyclases) in the monoterpene, sesquiterpene and diterpene series

have been isolated and cloned from plant and, more recently, microbial sources e.g.²⁶⁻³⁰

In 2000, we reported the structure of the diterpene cyclase product leading to the pseudopterosins which represented the first such intermediate from any marine organism.³¹ A radioactivity-guided isolation strategy was employed as a direct method of identifying the cyclase product. We reasoned that we could gain rapid access to the diterpene cyclase product by isolating the least polar radioactive intermediate following an incubation of a CFE with ³H-GGPP. This proved to be a worthwhile approach. The hexane fraction from the quenched incubation mixture was subjected to normal phase HPLC and the first radioactive peak collected and further purified by reversed phase HPLC with monitoring of radioactivity. Elisabethatriene (**12**) was found to be the only radioactive compound in this HPLC analysis. Elisabethatriene was found to be an unsaturated C-20 hydrocarbon as expected, however detailed NMR analysis indicated that this cyclase product possessed the serrulatane skeleton rather than the anticipated amphilectane skeleton of the pseudopterosins. This is surprising as in most cases the terpene cyclase product has the same carbon skeleton as the fully functionalized terpene. Radiochemical purity of elisabethatriene was established by rigorous purification by HPLC, derivatization to an endocyclic diene, and subsequent HPLC purification of the derivative with monitoring of specific activity.

Oxidations of elisabethatriene

It was clear that the transformation of elisabethatriene (**12**) to pseudopterosins required a dehydrogenation / aromatization process. Erogorgiaene (**15**) was reported from a collection of *P. elisabethae* from Colombia³² and thus seemed like a plausible intermediate in pseudopterosin biosynthesis. We isolated **15** from our collections of *P. elisabethae* from the Florida Keys, however it was not present in isolable quantities in our Bahamian collections of this coral. Both elisabethatriene (**12**) and erogorgiaene (**15**) were produced in ³H-labeled form using incubations of a CFE with ³H-GGPP. Incubation of **12** (300,000 dpm) with a CFE resulted in the production of ³H-labeled **15** (2,060 dpm). Radiochemical purity of erogorgiaene was established by HPLC purification, derivatization to its epoxide and subsequent HPLC purification of the derivative. There was no significant change in the specific activity of the derivative, thus confirmed the conversion of elisabethatriene to erogorgiaene. To test for the conversion of **15** to the pseudopterosins, ³H-labeled **15** (5,130 dpm) was incubated with a CFE of *P. elisabethae* and pseudopterosins A-D purified by HPLC. Liquid scintillation counting indicated that the pseudopterosins were

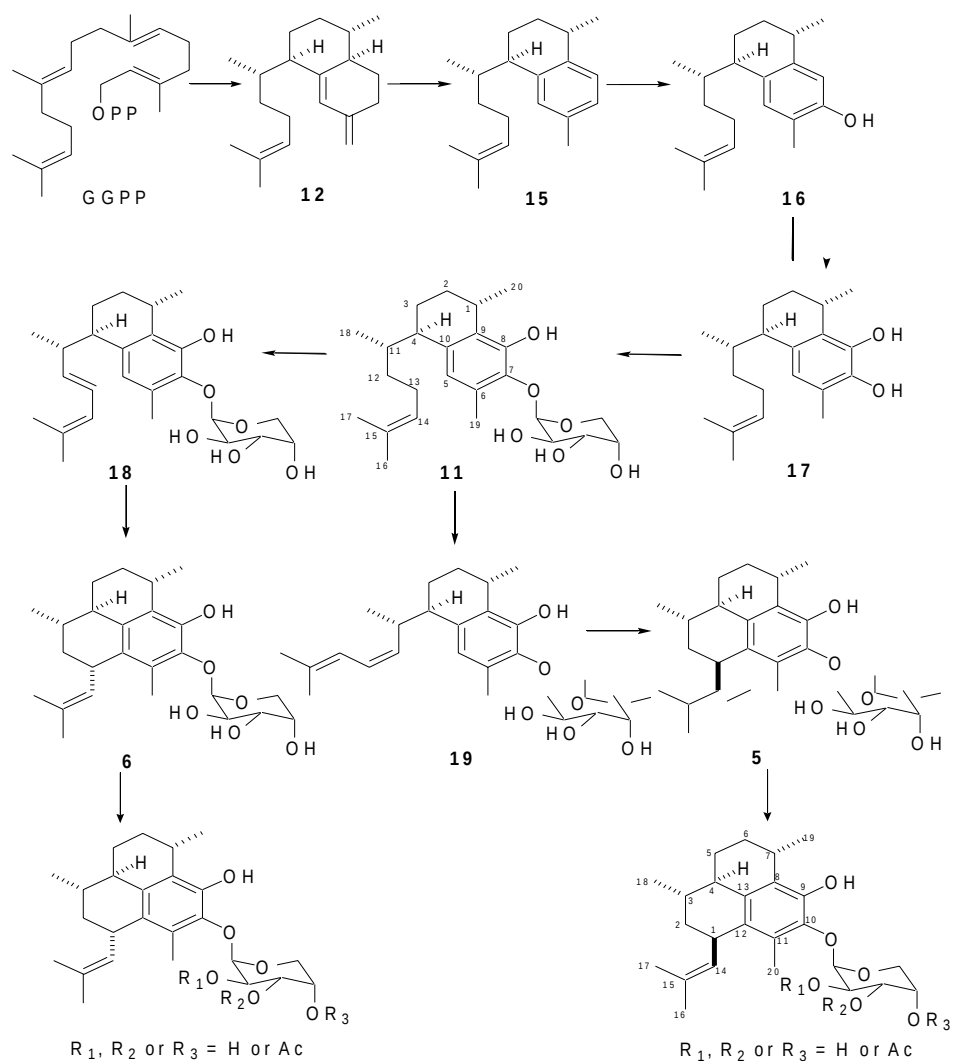
radioactive and, in fact, there was a 5.7% radiochemical yield for this transformation.

It was clear from the structures of elisabethatriene (**12**) and its aromatized product erogorgiaene (**15**) that mono- and dihydroxy derivatives of **15** were likely intermediates in pseudopterosin biosynthesis.³³ We examined our *P. elisabethae* collections from the Florida Keys as a potential source of such compounds as we had found this to be the source of much greater diterpene diversity than collections from other sites. 7-Hydroxy erogorgiaene (**16**) was isolated as a minor component of this extract and the 8-hydroxy isomer was not found, suggesting that the first oxidation occurs at C7 of erogorgiaene. 7, 8-Dihydroxyerogorgiaene (**17**) initially proved difficult to isolate and thus a standard sample was synthesized by a hydrolysis of *seco*-pseudopterosin J (**11**) with methanolic HCl. Using this authentic standard to guide the isolation, catechol **17** was purified from the *P. elisabethae* extract by TLC followed by repeated reversed phase HPLC.

The presence of 7-hydroxyerogorgiaene (**16**) and 7, 8-dihydroxyerogorgiaene (**17**) from an extract of *P. elisabethae* suggested that these were intermediates in pseudopterosin biosynthesis. To experimentally test this hypothesis, radiolabeled **15**, **16** and **17** were prepared, incubated with a CFE of *P. elisabethae* and the production of labeled pseudopterosins confirmed by scintillation counting and radiochemical purity established by derivatization.³³

Amphilectosins as key biosynthetic intermediates

The confirmation of elisabethatriene (**12**), erogorgiaene (**15**), 7-hydroxyerogorgiaene (**16**) and 7, 8-dihydroxyerogorgiaene (**17**) as intermediates in pseudopterosin biosynthesis indicate that the ring closure of the serrulatane skeleton to the amphilectane ring system must occur relatively late in the biosynthetic pathway. We had observed that *seco*-pseudopterosins co-occur with pseudopterosins in many of our collections of *P. elisabethae*. Together with the biosynthetic data discussed above, this suggested that *seco*-pseudopterosins may be biosynthetic precursors of the pseudopterosins. To experimentally test this hypothesis, ³H-labeled *seco*-pseudopterosin J (**11**) was prepared by biosynthetic means and radiochemical purity established by derivatization to its dihydro analogue and monitoring of specific activity³⁴. Incubation of ³H-labeled *seco*-pseudopterosin J (**11**) with a CFE resulted in the production of radioactive pseudopterosins F (**5**) and Y (**6**). In this case, the derivatization reaction to establish radiochemical purity was the hydrolysis of the pseudopterosins to their aglycones.



Scheme 1. Pseudopteroin biosynthesis.

Confirmation of the involvement of *seco*-pseudopteroin in pseudopteroin biosynthesis implied the existence of a *seco*-pseudopteroin derivative with a functionality at C-13 to facilitate a ring closure. We therefore conducted an NMR-guided examination of the mid-polarity extract of *P. elisabethae* from the Florida Keys to search for such compounds. This resulted in the isolation of two new compounds which we termed amphilectosins A and B (since these provide the key intermediate in the formation of amphilectane diterpenes).³⁴ These new compounds (18 and 19) contain a diene moiety in the side chain thus suggesting that the ring closure

could occur by a nucleophilic attack of the aromatic ring at C-12 – C-13 double bond. The intermediacy of the amphilectosins was confirmed by incubating radioactive **18** and **19** with CFEs and monitoring for the production of 3H-labeled pseudopterოსins. Amphilectosin A (**18**) was transformed to pseudopterოსin Y (**6**) and amphilectosins B (**19**) was transformed to pseudopterოსin F (**5**).

Acknowledgements

Funding was provided by NSERC, the Canada Research Chair Program, the University of Prince Edward Island, the Canada Foundation for Innovation, the Atlantic Innovation Fund, and the Jeanne and Jean-Louis Lévesque Foundation.

References

1. Look SA, Fenical W, Matsumoto GK, Clardy J. 1986. The pseudopterოსins: a new class of anti-inflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). J Org Chem 51: 5140-5145.
2. Lindel T, Jensen PR, Fenical W, Long BH, Casazza AM, Carboni J, Fairchild CR. 1997. Eleutherobin, a new cytotoxin that mimics paclitaxel (Taxol) by stabilizing microtubules. J Amer Chem Soc 119: 8744-8745.
3. Rice JR, Papastefanou C, Anderson DG. 1970. Isolation, localization, and biosynthesis of crassin acetate in *Pseudoplexaura porosa*. Biol Bull 138: 334-343.
4. Cimino G, De Rosa S, De Stefano S, Sodano G, Villani G. 1983. Dorid nudibranch elaborates its own chemical defense. Science 219: 1237-1238.
5. Cimino G, De Rosa S, De Stefano S, Morrone R, Sodano G. 1985. The chemical defense of nudibranch molluscs. Structure, biosynthetic origin and defensive properties of terpenoids from the dorid nudibranch *Dendrodoris grandiflora*. Tetrahedron 41: 1093-2000.
6. Cimino G, De Rosa S, De Stefano S, Sodano G. 1985. Observations on the toxicity and metabolic relationships of polygodial, the chemical defense of the nudibranch *Dendrodoris limbata*. Experientia 41: 1335-1336.
7. Cimino G, De Rosa S, De Stefano S, Sodano G. 1986. Marine natural products: new results from Mediterranean invertebrates. Pure Appl Chem 58: 375-386.
8. Cimino G, Sodano G. 1989. The chemical ecology of Mediterranean Opisthobranchs. Chem Scr 29: 389-394.

9. Garson M. 1986. Biosynthesis of the novel diterpene isonitrile diisocyanoadociane by a marine sponge of the *Amphimedon* genus: incorporation studies with sodium cyanide- ^{14}C and sodium acetate-2- ^{14}C . J Chem Soc, Chem Commun 35-36.
10. Fookes CJR, Garson MJ, MacLeod JK, Skelton BW, White AH. 1988. Biosynthesis of diisocyanoadociane, a novel diterpene from the marine sponge *Amphimedon* sp. crystal structure of a monoamide derivative. J Chem Soc, Perkin Trans 1003-1011.
11. Karuso P, Scheuer PJ. 1989. Biosynthesis of isocyanoterpenes in sponges. J Org Chem 54: 2092-2095.
12. Chang CWJ, Scheuer PJ. 1990. Biosynthesis of marine isocyanoterpenoids in sponges. Comp Biochem Physiol 97B: 227-233.
13. Garson MJ. 1993. The biosynthesis of marine natural products. Chem Rev 93: 1699-1733.
14. Rynkiewicz M, Cane D, Christianson, D. 2001. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. Proc Natl Acad Sci USA 98: 13543-13548.
15. Bayer FM. 1961. The shallow-water octocorallia of the West Indian Region. Martinus Nijoff, The Hague.
16. Fenical W. 1987. Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. J Nat Prod 50: 1001-1008.
17. Rodriguez AD. 1995. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals. Tetrahedron 51: 4571-4618.
18. Roussis V, Wu Z, Fenical W. 1990. New anti-inflammatory pseudopterogens from the marine octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. J Org Chem 55: 4916-4922.
19. Look SA, Fenical W. 1987. The *seco*-pseudopterogens, new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopterogorgia*. Tetrahedron 43: 3363-3370.
20. Look SA, Fenical W, Jacobs R, Clardy J. 1986b. The pseudopterogens: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6238-6240.
21. Ata A, Kerr RG, Moya C, Jacobs R. 2003. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. Tetrahedron 59: 4215-4222.
22. Mayer AM, Jacobson PB, Fenical W, Jacobs RS, Glaser KB. 1998. Pharmacological characterization of the pseudopterogens: novel anti-

- inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. Life Sci 62: PL401-407.
23. Coleman AC, Mydlarz LD, Kerr RG. 1999. In vivo and in vitro investigations into the biosynthetic relatedness of the pseudopterოსins. Org Lett 1: 2173-2175.
24. Gershenzon J, Croteau RB. 1993. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Lipid Metab Plants 339-388.
25. Davis EM, Croteau R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids. Top Curr Chem 209: 53-95.
26. Wildung MR, Croteau RB. 1996. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. J Biol Chem 271: 9201-9204.
27. Vogel BS, Wildung MR, Vogel G, Croteau RB. 1996. Abietadiene synthase from Grand Fir (*Abies grandis*). J Biol Chem 271: 23262-23268.
28. Back K, Chappell J. 1996. Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy. Proc Natl Acad Sci USA 93: 6841-6845.
29. Starks CM, Back K, Chappell J, Noel JP. 1997. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. Science 277: 1815-1820.
30. Bohlmann J, Crock J, Jetter R, Croteau R. 1998. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)- α -bisabolene from grand fir (*Abies grandis*). Proc Natl Acad Sci USA 95: 6756-6761.
31. Coleman A, Kerr RG. 2000. Radioactivity-guided isolation and characterization of the bicyclic pseudopterოსin diterpene cyclase product from *Pseudopterogorgia elisabethae*. Tetrahedron 56: 9569-9574.
32. Rodriguez AD, Ramirez C. 2001. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. J Nat Prod 64: 100-102.
33. Ferns T, Kerr RG. 2005. Oxidations of erogorgiaene in pseudopterოსin biosynthesis. Tetrahedron 61: 12358-12365.
34. Ferns T, Kerr RG. 2005. Identification of amphilectosins as key intermediates in pseudopterოსin biosynthesis. J. Org. Chem. 70: 6152-6157.

COMENTARIOS AL TRABAJO DEL PROFESOR KERR

El conferencista, profesor Russell Kerr del Departamento de Química y de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Príncipe Eduardo, Canadá, nos llama la atención que para producir un compuesto por métodos biotecnológicos en las cantidades necesarias para lograr su producción en el orden de los multigramos y su posterior comercialización como producto industrial (por ejemplo como medicamento), se necesita como primera medida conocer su biosíntesis. El conocimiento de la biosíntesis también nos llevará a establecer los diferentes intermediarios biosintéticos y las enzimas involucradas en cada paso, y la secuenciación de estas proteínas nos dará la información necesaria para clonar los correspondientes genes biosintéticos. La identificación de los intermediarios biosintéticos también nos permitirá evaluar la capacidad biosintética del simbiote.

*Como ejemplos particulares de la estrategia antes mencionada el profesor Kerr describe minuciosamente los experimentos biosintéticos hechos en corales blandos, particularmente en *P. elisabethae* del norte del Caribe, fuentes de importantes sustancias antiinflamatorias, usando isótopos radiactivos, y establece una ruta completa para la producción biosintética de los compuestos mencionados.*

Esta conferencia nos lleva claramente a reflexionar que a pesar del gran potencial que muestran los nuevos productos naturales marinos, el problema del suministro de cantidades del orden de los multigramos que se necesitan para su transformación a un producto comercial representa un peso enorme y una situación muy difícil de resolver. Esta situación es común tanto para plantas como para organismos marinos. Sin embargo, en organismos marinos la situación es más crítica por la baja concentración en que casi siempre se encuentran los compuestos bioactivos y además por la dificultad de proceder a extracciones masivas de los organismos fuente, sin llegar a extremos de provocar su extinción. Adicionalmente procedimientos de acuicultura o maricultura no siempre son fáciles ni exitosos, y los procedimientos de síntesis química casi siempre son largos y costosos; por estas razones, se necesita acudir a otras alternativas viables que nos aseguren un mejor suministro del compuesto natural. Una de esas alternativas es el descubrimiento de quién está en realidad produciendo el compuesto bioactivo: el macroorganismo o su simbiote. Si las investigaciones nos conducen a establecer que es el simbiote (generalmente son microalgas, bacterias, hongos, etc.) el productor, se ha allanado el camino para la producción sustentable del compuesto natural. Manejar microorganismos poniéndolos a producir lo que queremos por métodos biotecnológicos es una vía grandiosa y mucho más barata de producción.

Producción de metabolitos primarios y secundarios mediante el cultivo de células vegetales

Lucía Atehortúa¹

Palabras clave: cultivo in vitro de células vegetales, aspectos críticos, metabolitos primarios y secundarios, escalado.

Introducción

El cultivo de células vegetales *in vitro* ha sido propuesto como una alternativa viable para la producción de una gran cantidad de compuestos fitoquímicos de alto valor agregado pero que se producen naturalmente en muy bajas concentraciones, tales como: drogas, pesticidas, colorantes, fragancias, antioxidantes; igualmente se podrían obtener alimentos básicos, tal como se ilustra en la tabla 1.

Para algunas de estas sustancias, el cultivo de células provee un potencial para su producción, con el fin de superar los limitantes generados en los cultivos tradicionales y en la síntesis química. Muchos sistemas han sido patentados y en los últimos 20 años, un considerable interés industrial y académico ha surgido para desarrollar la producción a escala industrial de sustancias de alto valor agregado.

Debido a este gran interés por parte de la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, en las dos últimas décadas, se ha realizado un considerable número de trabajos para diseñar biorreactores para el cultivo de células vegetales (Panda *et al.*, 1989; Bisaria & Panda, 1991; Taticek *et al.*, 1991; Scragg, 1991, 1994).

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Sede de Investigaciones Universitarias SIU, Torre 1-210. Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín. Correo electrónico: latehor@gmail.com

Tabla 1. Productos naturales producidos por plantas de importancia industrial.

Productos	Bioactivos
1. Farmacéuticos	
a. Alcaloides	Ajmalicine, atropina, berberina, codeína, reserpina, vincristina, vinblastina
b. Esteroides	Diosgenina
c. Cardenolidas	Digitoxina, digoxina
2. Aditivos y saborizantes	
a. Endulzantes	Esteviosido, Thaumatina
b. Agentes amargantes	Quinina
c. Pigmentos	Crocina
3. Pigmentos & Perfumes	
a. Pigmentos	Shikonina, antocianinas, betalainas
b. Fragancias	Aceites de rosa, jazmín y lavanda
4. Agroquímicos & Químicos Finos	
a. Agroquímicos	Piretrinas, salanina, azadiractina
b. Químicos finos	Proteasas, vitaminas, lípidos, látex, aceites

Un biorreactor es un vaso de cristal o acero inoxidable en el cual se cultivan los organismos. Idealmente, estos biorreactores están provistos de sensores para medir y monitorear el pH, la temperatura, la concentración de gases disueltos (O_2 y CO_2), además de puertos para la toma de muestras, ajustar pH, adicionar medio fresco y con un sistema de mezclado (agitación) que no cause daño a la naturaleza totalmente aséptica del cultivo. De esta manera, se realiza un control y monitoreo automatizado del cultivo con un seguimiento a todos los factores involucrados en el sistema de cultivo.

Sin embargo, a la fecha, la aplicación industrial del cultivo de células en suspensión y la comercialización de sus productos han estado limitadas, debido en gran parte a consideraciones de factibilidad económica, originadas tanto de aspectos de origen biológico, como de algunas consideraciones ingenieriles.

A pesar de lo anterior, el cultivo de células en suspensión sigue siendo una alternativa atractiva bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, si la fuente vegetal es difícil de cultivar por métodos agrícolas tradicionales, o tienen un largo periodo de cultivo, o una baja productividad del metabolito de interés, si la síntesis química no ha podido llevarse a cabo, o si es técnicamente problemática (Kieran *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que la productividad y rendimiento de un metabolito vegetal puede exceder a lo producido por la planta en campo (Fujita y Tabata, 1987; Fujita, 1988). Por esta razón, utilizando esta tecnología, los metabolitos

de interés tanto primarios, como secundarios, pueden ser producidos bajo condiciones controladas y reproducibles, independiente de factores geográficos, climáticos y/o situaciones políticas impredecibles.

Si consideramos que el cambio climático es una realidad y un fenómeno irreversible, este se constituye en el factor más limitante de la producción agrícola global, por lo cual será necesario desarrollar nuevos sistemas de producción con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, energética y de salud, y estos sistemas de cultivos se constituirán en lo que podría denominarse "BioAgricultura Urbana": en otras palabras, producción agrícola en garajes de alta tecnología, especialmente para ser desarrollada en las grandes ciudades (Atehortúa, 2007).

Estos sistemas de producción podrían garantizar la producción de materias primas de varios productos agrícolas en pequeños espacios, dotados de alta tecnología, generando un sistema de producción limpia, 24 horas al día durante 365 días del año, independiente de factores climáticos externos, libre de patógenos, libre de agroquímicos, independiente de la estacionalidad de los cultivos agrícolas, y con la posibilidad de producir GMOs, sin que estos interactúen con el medio ambiente, ni la biodiversidad existente.

Adicionalmente, estos podrían contribuir a la conservación de la biodiversidad, suelo y agua, al evitar la extensión de la frontera agrícola y urbana, que son unos de los factores que mayor impacto causan al medio ambiente. De otro lado, tienen la ventaja de que se podrían implementar en cualquier parte del planeta, incluso en el espacio.

Naturaleza de las células vegetales

Aunque los requerimientos básicos para una suspensión celular vegetal son similares a la de aquellos cultivos sumergidos de micro-organismos, los fermentadores utilizados en el cultivo de células microbiológicas no son adecuados para el cultivo de células vegetales, debido a las notables diferencias en la naturaleza celular y los patrones de crecimiento de estos dos tipos de células.

Comparativamente, las células vegetales son más grandes que las de los micro-organismos (10-500 μm de longitud por 20 a 50 μm de diámetro), rígidas debido a la pared celular, con una larga vacuola que las hace sensitivas al efecto de corte causado por la agitación; además son de naturaleza aeróbica, por lo que requieren un suplemento constante de oxígeno (1-3 $\text{mmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aunque menor que los micro-organismos. En algunos casos,

una alta concentración de oxígeno es tóxica para las actividades metabólicas celulares; tienden a formar agregados de 2-200 células, las cuales suelen sedimentarse o pegarse en las paredes del biorreactor, causando bloqueamiento de las boquillas del suministro de gases y la toma de muestras. Igualmente, los agregados celulares afectan la reología del sistema, ya que crean zonas muertas, afectando las condiciones de cultivo y la formación de los productos de interés (Bhojwani & Razda, 1996).

Un eficiente mezclado de las células vegetales en cultivo a gran escala es extremadamente importante para proveer condiciones fisiológicas uniformes dentro del vaso de cultivo ya que el mezclado provee un mejor crecimiento e incrementa la transferencia de nutrientes desde la fase líquida a la fase gaseosa a las células, dispersando las burbujas para una oxigenación efectiva. Durante la fase exponencial de crecimiento, las células son más pegajosas debido al incremento de la excreción de los exopolisacáridos dentro del vaso de cultivo, generando que estas se peguen en las paredes del biorreactor, mangueras, poros de dispersión de burbujas y puertos. La agregación celular afecta adversamente la toma de muestras utilizadas para monitorear el cultivo durante el crecimiento (cinética celular) y formación de producto. Las reacciones bioquímicas se ven limitadas por la difusión de nutrientes, debido a que éstos no pueden penetrar al centro del agregado celular. A pesar de estos efectos adversos, cierto grado de agregación (célula a célula) es esencial para la producción de metabolitos secundarios. Por esta razón, el control de los agregados celulares es de interés desde el punto de vista de los bioprocesos ingenieriles.

Desde la perspectiva ingenieril, el cultivo de células en suspensión ofrece un inmediato potencial para las aplicaciones industriales que el cultivo de tejidos y órganos, debido a la gran cantidad de experiencias que han sido acumuladas durante el cultivo de microorganismos en condiciones sumergidas: mientras el cultivo de tejidos y raíces ofrece una estabilidad genética y en algunos casos un desarrollo metabólico superior sobre las suspensiones celulares de las mismas líneas (Flores & Curtis, 1992), el desarrollo de reactores apropiados y técnicas de procesamiento para estos sistemas implicará una enorme inversión.

Clases de cultivos celulares in vitro

Existen fundamentalmente tres formas de realizar un cultivo de células vegetales: en suspensión, inmovilizadas o como tejidos u órganos. La clase de cultivo afecta, entre otras cosas, el crecimiento celular, la formación de producto, su recolección y el tipo de biorreactor que puede ser utilizado.

Cultivo en suspensión

Este proceso consiste en llevar a un medio líquido el tejido de callo, para lograr que las células se dispersen en forma homogénea a través del medio de cultivo y que todas estén expuestas a las mismas condiciones de cultivo, lo cual facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma. Este tipo de cultivo presenta la desventaja de no permitir el control de ciertas variables como el pH y los gases disueltos debido a la conformación del matraz de cultivo. A pesar de lo anterior, bajo estas condiciones, se pueden presentar modificación de algunas de sus características, tales como la diferenciación en tejidos y la comunicación intercelular (Schlatmann *et al.*, 1996), observándose que el cultivo está constituido principalmente por células indiferenciadas, más débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural (Yeoman & Yeoman, 1996). Sin embargo, cuando se cultivan células diferenciadas específicas, como las que dan origen a metabolitos primarios, cuya expresión es constitutiva, se puede lograr un cultivo de células diferenciadas, capaz de producir los metabolitos de interés (Atehortúa, 2007). Si se utiliza el tejido base, es necesario utilizar una solución de enzima (pectinasa) con el fin de lograr la separación de las células y garantizar que estas se dispersen en el medio homogéneamente.

En este tipo de cultivo el estado que más se aproxima a las condiciones naturales es la fase estacionaria, en la que diversos autores han reportado un cierto grado de diferenciación (Bougard *et al.*, 2001), observándose que la acumulación de metabolitos secundarios se presenta principalmente durante este periodo; sin embargo, en caso de que el metabolito esté asociado al crecimiento, su acumulación puede ser proporcional a la producción de biomasa y observarse durante la fase exponencial, como es el caso de las betalainas, los carotenoides y azadiractina en ciertas líneas celulares (Bougard *et al.*, 2001; Prakash & Srivastara, 2005, 2006) o en células productoras de metabolitos primarios.

En la actualidad se conocen pocos procesos industriales para la producción de metabolitos secundarios utilizando esta estrategia de cultivo; entre estos se destaca la obtención de paclitaxel, una droga anticancerígena obtenida de suspensiones celulares de especies del género *Taxus* por la empresa Alemana Phytol. Otros dos metabolitos secundarios que se han logrado producir a gran escala a través de suspensiones celulares son la shikonina (Fujita, 1988) y la berberina (Murria, 1984).

Cultivo de células inmovilizadas

Éste consiste en incluir las células dentro de un material de soporte y se utiliza cuando el metabolito no está asociado a la fase de crecimiento celu-

lar. Es una alternativa que ha mostrado en muchos casos la estimulación del metabolismo secundario, debido probablemente a una tasa de crecimiento más lenta que favorece un mayor flujo de nutrientes y energía hacia este metabolismo, un mayor contacto célula-célula y un mayor grado de diferenciación, haciendo que el ambiente físico-químico sea más parecido al de la planta (Lindsey *et al.*, 1983; Schlatmann *et al.*, 1996; Charlet *et al.*, 2000; Bougard *et al.*, 2001; Dönenburg, 2004; Prakash & Srivastara, 2005). Las células inmovilizadas presentan una mayor limitación a la transferencia de masa, debido a la resistencia aportada por el soporte; además, se ha reportado la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos, que pueden estimular no sólo la producción, sino también la liberación de metabolitos secundarios al medio, posiblemente por la permeabilización de la membrana celular (Gillet *et al.*, 2000; Dönenburg, 2004; Prakash & Srivastara, 2005).

La utilización de sistemas con células inmovilizadas presenta la ventaja de mantener retenido el biocatalizador (enzima), permitiendo su reutilización y la operación del proceso de manera continua, usando altas tasas de dilución sin que ocurra lavado celular. Adicionalmente, se ven simplificados los procesos de purificación de los metabolitos de interés, reduciendo el costo del proceso (Yeoman & Yeoman, 1996; Charlet *et al.*, 2000; Sajc *et al.*, 2000; Dönenburg, 2004).

La matriz de inmovilización provee una mayor protección a las células, impidiendo que éstas tengan contacto directo con el fluido y con dispositivos mecánicos dentro del reactor, reduciendo de esta forma el estrés de corte al que son sometidas y por tanto permitiendo la utilización de altas tasas de aireación, una mejor homogeneización del medio y el mantenimiento de la actividad catalítica por más tiempo (Schlatmann *et al.*, 1996; Charlet *et al.*, 2000; Dönenburg, 2004). La productividad puede incrementarse mediante el mantenimiento de altas densidades celulares, la inducción de la liberación del producto y la eliminación de la fase de crecimiento, que en el caso de células vegetales representa gran parte del tiempo del proceso (Yeoman & Yeoman, 1996). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la viabilidad de las células puede verse comprometida, que el metabolito de interés no debe estar asociado a la fase de crecimiento y debe liberarse al medio, ya que es indispensable inhibir la división celular para evitar el rompimiento del soporte (Dönenburg, 2004; Ramachandra & Ravishankar, 2002) y éste no debe ser destruido en el proceso de purificación (Yeoman & Yeoman, 1996; Charlet *et al.*, 2000).

Los métodos físicos de inmovilización son los más usados en el cultivo de células vegetales, ya que tienden a modificar menos la capacidad biosintética de las células debido a que no involucran uniones covalentes con los soportes (Yeoman & Yeoman, 1996; Bougard *et al.*, 2001; Schlatmann

et al., 1996; Charlet *et al.*, 2000, Lindsey *et al.*, 1983; Ramanchandra & Ravinshankar, 2002) Dentro de estos métodos se han usado fundamentalmente el atrapamiento en gel (Gillet *et al.*, 2000) o en espuma (Hu & Yuan, 1995). Recientemente se ha comenzado a explorar la posibilidad de usar soportes inorgánicos (derivados de sílice); este tipo de soportes es más resistente al estrés mecánico y no es sensible al crecimiento celular (Perullini *et al.*, 2007) En la actualidad no existen procesos industriales en los que se usen células inmovilizadas para la producción de metabolitos secundarios.

Cultivo de órganos

La producción de ciertos metabolitos está asociada a células muy especializadas o a la interacción de células en la planta; en estos casos resulta útil cultivar el órgano o tejido completo (Yeoman & Yeoman, 1996). Existen dos tipos de órganos que usualmente son cultivados para la producción de metabolitos secundarios: raíces y brotes; éstos se caracterizan por tener un patrón metabólico muy similar al de los órganos en la planta y pueden o no, estar transformados genéticamente; en el caso de células no transformadas el tejido se obtiene a partir de un explante y la diferenciación se logra utilizando una combinación apropiada de hormonas; los órganos transformados se obtienen utilizando *Agrobacterium rizhogenes*, en el caso de raíces o *Agrobacterium tumefaciens* en el caso de brotes (Schlatmann *et al.*, 1996; Bougard *et al.*, 2001) o simplemente se cultiva toda la estructura vegetal como en el caso de los musgos, donde la fase gametofítica se utiliza para la producción de los metabolitos (Mühlbach, 1998).

Los órganos transformados tienen varias ventajas con respecto a los órganos sin transformar ya que requieren medios más simples, sin reguladores de crecimiento, mantienen la estabilidad genética y la producción del metabolito de interés por más tiempo, crecen rápidamente acumulando metabolitos secundarios durante la fase de crecimiento, se pueden cultivar a altas densidades de biomasa y se retienen fácilmente en el reactor facilitando la operación continua (Bougard *et al.*, 2001; Giri & Lakshmi, 2000). Sin embargo, es importante tener en cuenta las limitaciones a la transferencia de oxígeno y nutrientes dentro de los órganos, por lo que es necesario optimizar las operaciones de transferencia de masa para evitar la necrosis (Schlatmann *et al.*, 1996; Bougard *et al.*, 2001).

Las ventajas de este sistema de cultivo han hecho común su utilización. Este tipo de cultivos ha sido utilizado exitosamente en la producción industrial de algunos compuestos, como camptothecina y podofilotoxina por la compañía alemana ROOT (Guillion *et al.*, 2006) y en el cultivo de Echinacea purpúrea para la producción de ácido cafeico por una empresa coreana (Hahn, comunicación personal).

Aspectos críticos del cultivo de células vegetales

Agregación celular

Las células vegetales que crecen *in vitro* tienen una tendencia natural a formar agregados; esto se debe a deficiencias en la separación después de la división celular y a la secreción de polisacáridos. Estos agregados tienen tendencia a sedimentarse, lo que influye en la reología del medio de cultivo e incrementa los requerimientos de agitación (Kieran *et al.*, 1997). El fenómeno de agregación es importante en el metabolismo, ya que al facilitar las interacciones y la transmisión de señales intercelulares puede aumentar la producción de metabolitos secundarios (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2002; Edahiro & Ski, 2006). Sin embargo, dificulta el conteo celular y la determinación de la viabilidad celular.

Agitación y estrés hidrodinámico

La agitación es una operación física que aumenta la homogeneidad del medio de cultivo, disminuyendo los gradientes de concentración y temperatura, evitando la sedimentación de las células (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2002) y controlando el tamaño de los agregados celulares (Zhong *et al.*, 2002). La agitación, al igual que la aireación, genera fuerzas hidrodinámicas sobre las células en suspensión, lo que se traduce en una respuesta metabólica que depende del tiempo e intensidad de la exposición y de las características fisiológicas de estas células (gran tamaño, presencia de pared celular rígida, grandes vacuolas y formación de agregados) (Kieran *et al.*, 1997; Chattopadhyay *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2002).

Los cultivos de células vegetales generalmente tienen un comportamiento no-newtoniano y debido a que las altas densidades celulares, la formación de agregados celulares y la secreción de polisacáridos incrementan la viscosidad, requieren mayores tasas de agitación (Kieran *et al.*, 1997).

En los procesos de agitación es posible mantener constante la velocidad del impulsor o el tiempo de mezcla. Se ha encontrado que tiempos de mezcla elevados afectan el crecimiento debido a la formación de zonas muertas dentro del reactor que presentan una mayor limitación a la transferencia de oxígeno; mientras que tiempos de mezcla pequeños favorecen el incremento de la densidad celular debido a una mayor homogenización del medio de cultivo (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

Durante la agitación se forman remolinos de diferentes tamaños; los mayores extraen energía del flujo principal, mientras que los más pequeños interactúan directamente con las células, haciéndolas rotar y en ocasiones

causando daños a la pared celular cuando remolinos con rotaciones contrarias y tamaños menores al de la célula, entran en contacto con la misma simultáneamente. Según la teoría de Kolmogorov, los remolinos más grandes son inestables y tienden a disgregarse en remolinos más pequeños, hasta que la escala del remolino es tan pequeña que el número de Reynolds de los mismos no es suficientemente grande como para que persista la inestabilidad y su energía cinética es disipada térmicamente. Esta teoría permite calcular el tamaño del remolino más pequeño que se produce bajo las condiciones del fluido y la velocidad de agitación aplicada (Van't Riet & Tramper, 1991; Doran, 1995), lo que permite evitar la formación de remolinos que puedan afectar el cultivo (Joshi *et al.*, 1996).

Aireación y transferencia de oxígeno

El requerimiento de oxígeno de las células vegetales es menor que el de las células bacterianas, debido a que su rata de crecimiento es más lenta. La transferencia de oxígeno y la concentración de éste en el medio son afectadas por la viscosidad del fluido, que como se dijo anteriormente, puede ser mayor en cultivos de células vegetales.

Se ha encontrado que el oxígeno es importante no sólo para el crecimiento sino también para la síntesis de metabolitos secundarios (Kieran *et al.*, 1997), por lo que garantizar una buena aireación es fundamental en el diseño del biorreactor (Sajc *et al.*, 2000). La optimización de la transferencia de oxígeno puede lograrse incrementando la velocidad de agitación, la tasa de aireación o la concentración de oxígeno en el aire suministrado; sin embargo, las dos primeras presentan algunas desventajas ya que se aumenta el consumo de potencia (Kieran *et al.*, 1997; Han & Zhong, 2003; Trung *et al.*, 2006), se genera mayor estrés de corte sobre las células (Honda *et al.*, 2002), se puede presentar la formación de espuma y puede darse el arrastre de compuestos volátiles importantes en el metabolismo secundario (Kieran *et al.*, 1997; Han & Zhong, 2003; Trung *et al.*, 2006).

Diseño de biorreactores

El cultivo de células vegetales a gran escala comenzó en 1959 con la NASA, quien apoyó las investigaciones buscando la posibilidad de usar el cultivo de células vegetales para obtener alimentos durante los vuelos espaciales (Tulecke & Nickell, 1959, 1960).

Los vasos de cultivo utilizados fueron botellas, las cuales podrían rodar o agitar para generar un buen mezclado. Estos luego fueron cambiados por tanques de acero inoxidable que podrían funcionar con un motor y agitador.

En 1970 se introdujo el primer biorreactor tipo airlift para el cultivo de células en suspensión. La mayoría del escalado de cultivos vegetales celulares ha sido llevado a cabo en sistemas batch (Scrag, 1991). Los biorreactores hasta 10 litros son esterilizados mediante autoclave, pero biorreactores de mayor escala se esterilizan mediante vapor caliente (caldera), con una exposición de 2 a 3 horas. Medio autoclavado es adicionado al biorreactor y el cultivo es iniciado con un inóculo en una relación de radio de 1: 10. Generalmente, el pH del cultivo no es controlado, pero es ajustado inicialmente entre 5 y 6. La temperatura es mantenida entre 25 y 35°C. La agitación es definida mediante un estudio de viabilidad celular vs. agitación (rpm), así como la concentración de O_2 y CO_2 .

Tipos de biorreactores y sus limitaciones

De acuerdo a Bhojwani y Razda (1996), los principales tipos de biorreactores utilizados en el cultivo de células vegetales son: tanque agitado, columna de burbujeo, air-lift, tambor rotante y modificaciones de estos.

1. **Reactor de tanque agitado:** consiste en que el aire es dispersado por agitación mecánica y representa el reactor clásico de las fermentaciones aeróbicas. El problema mayor de este tipo de biorreactor es el efecto de corte sobre las células, debido a la sensibilidad celular. Este ha sido modificado para el cultivo de células vegetales: a) reduciendo la velocidad a 50-150 rpm y reemplazando la turbina por una pala marina; b) removiendo de los baffles, tales como pruebas de pH y otros no requeridos c) alargando de los puertos hasta 1cm para reducir el bloqueo causado por la agregación celular. Los más grandes biorreactores utilizados para este tipo de cultivo son de 75.000 y 5000 Litros. Una desventaja de este tipo de tanque es la gran potencia de energía requerida y la complejidad de construcción para su escalado.
2. **Reactor de columna de burbujeo:** este es uno de los más simples tipos de reactores gas-líquido utilizados en fermentaciones aeróbicas. Consiste en un vaso cilíndrico aireado desde el fondo. El gas es disperso en forma neumática a través de un polo profundo de líquido, mediante unas placas perforadas o aspersores. Algunos de los méritos de este tipo de biorreactor son: a) facilita las operaciones de esterilidad, debido a la ausencia de partes móviles y a que no se requieren partes selladas; b) provee alta transferencia de masa y calor sin una potencia de energía mecánica, haciéndolo útil para organismos con alta sensibilidad de agitación. La desventaja de este tipo de reactor son los indefinidos patrones de flujo del fluido dentro del reactor y su falta de uniformidad en el

mezclado; además falta de datos para reacciones de fermentación no newtonianas.

3. **Reactor Air-Lift:** como su nombre lo indica, aire comprimido es utilizado para la aireación y el mezclado del contenido del vaso. El aire es esparcido desde la base del biorreactor, lo cual baja la densidad del medio de cultivo y el cual levanta el tubo arrastrando el medio de cultivo fresco dentro y fuera de la base y así se sostiene el flujo. Un patrón más uniforme de flujo es alcanzado en este biorreactor comparado con la columna de burbujeo. Air-Lift han sido utilizados extensivamente en el cultivo de células vegetales de varias especies: *Catharanthus roseus*, *Cinchona ledgeriana*, *Berberis wilsonae*, *Dioscorea deltoidea*, *Digitalis lanata*, *Morinda citrifolia* y *Lithospermum erythrorhizon*, entre otras. En todos los casos, la configuración ha dado resultados en términos de biomasa y formación de producto. Vienne & Marison (1986) reportaron cultivo continuo exitoso de *C. roseus* en un biorreactor air-lift. Este tipo de biorreactor es uno de los más adecuados para el cultivo de células vegetales en suspensión a gran escala, debido a que provee un mezclado favorable, buena transferencia de oxígeno y bajo efecto de corte, además de baja contaminación debido a que no tiene partes móviles o tiene el efecto del impulsor. Su costo de operación es más bajo que el de tanque agitado y no requiere una entrada de energía para el agitador. A pesar de sus ventajas, este tipo de biorreactor no ha sido tan extensivamente utilizado como el de tanque agitado.
4. **Reactor de tambor rotante:** consiste en un tambor rotante sobre ruedas o balineras redondas conectadas a un motor. Este movimiento de rotación facilita un buen mezclado y aireación sin imponer un fuerte estrés de agitación sobre el cultivo de las células. Los baffles en la parte interna del tambor ayudan a incrementar la transferencia de oxígeno. Este reactor tiene la capacidad de promover una alta transferencia de oxígeno a una alta densidad celular. Ha sido utilizado para cultivar *C. roseus* y *L. erythrorhizon* arriba de los 1000 L de volumen. Este tipo de biorreactor ha mostrado ser superior al biorreactor tipo air-lift, y a los reactores de tanque agitado para el cultivo de *L. erythrorhizon* (Tanaka, 1987). Su desventaja consiste en sus restricciones en escalado.
5. **Reactores de células inmovilizadas:** células inmovilizadas dentro de un portador adecuado y su cultivo en diferentes tipos de biorreactores ha sido desarrollado como una alternativa al cultivo de células en sistemas libres para la producción de fitoquímicos industriales. La inmovilización se ha hecho en alginato, agar, agarosa, carregenina o

polímeros (polycrilamida), o sintéticos como polyuretano reticulado, espuma y confinamiento en membranas semipermeables.

6. **Reactores de membranas cilíndricas huecas (hollow fibre units):** en este tipo de reactores las células son separadas del medio de crecimiento por membranas y es particularmente adecuado para células frágiles y sensibles. Las células son introducidas dentro de la concha o cubierta lateral del molde de la fibra hueca y el medio circula a través del lumen o hueco y aireado utilizando un reservorio separado. Debido a que las células no se pegan a la membrana de la fibra del reactor, estas retienen su integridad mecánica por un periodo más largo de tiempo y puede ser reusable.

Producción de metabolitos secundarios

A pesar del potencial que ofrece el cultivo de células y tejidos vegetales, no sólo para investigaciones básicas, sino también para el desarrollo de investigaciones aplicadas a la producción de productos de interés y en especial para los países que como Colombia poseen una gran biodiversidad vegetal, su implementación en nuestro país ha sido escasa, lo que contrasta con la gran cantidad de investigaciones al respecto, realizadas en países desarrollados con poca diversidad, tal como lo ilustran las tablas 2 a la 7.

Tabla 2. Compuestos producidos únicamente bajo condiciones de cultivos celulares de especies vegetales.

Compuesto	Especie vegetal	Referencia
Epchronea	<i>Ochrosia elliptica</i>	Pawelka et al, 1986
Dehidroxiconiferil-alcohol- γ - β -D glucosido	<i>Plagiorhegma dubium</i>	Arens et al, 1985
Paniculid A	<i>Angrographis paniculata</i>	Butcher & Connolly, 1971
Pericine	<i>Picalima nitida</i>	Arens et al, 1982
Rutaculitine	<i>Ruta graveolens</i>	Steck et al, 1971
		Nahrstedt et al, 1985
Tarennoside	<i>Gardenia jasminoides</i>	Ueda et al, 1981
Voafrine A & Voafrine B	<i>Voccanga africana</i>	Stockigt et al, 1983

Tabla 3. Escalado de algunos metabolitos secundarios producidos en cultivos celulares vegetales.

Producto	Fuente vegetal	Biorreactor	Volume (Litros)
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Cultivo en Batch en un sistema de 2 etapas	750
Beberian	<i>Thalictrum minus</i>	Cultivo en Batch y flujo continuo	4000
	<i>Coptis japonica</i>	Flujo continuo con un agitador de turbina	
Ginseng saponinas	<i>Panax ginseng</i>	Cultivo celular y de raíces	20.000
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Agitador de turbina	75.000
Sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>	Reactor de Aire (Airlift)	300

Fuente: Smith, 1995.

Tabla 4. Metabolitos secundarios de alto valor producidos en cultivos celulares vegetales.

Compuesto	Fuente de células	Localización	Referencia
Antraquinonas	<i>Rubia fruticosa</i>	-	Schulte et al., 1984.
Antocianinas	<i>Daucus carota</i>	Vacuola	Barz et al, 1990
	<i>Vitix vinifera</i>	-	Do & Cormier, 1990
Atropina	<i>Datura innoxia</i>	Excretado	Barz et al, 1990
Alcaloides de Benzofenantridina	<i>Eschsholtzia californica</i>	-	Tanahashi & Zenk, 1990
Berberina	<i>Thalictrum minus</i>	Excretado	Fujita & Tabata, 1987
	<i>Coptis japónica</i>		
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Excretado	Lindsey, 1986
Acido 0-coumarin Glucosido	<i>Melilotus albal</i>	Vacuola	Barz et al, 1990
Malonil Flavona	<i>Petroselinun hortense</i>	Vacuola	Barz et al, 1990
Ginkgolidos	<i>Ginkgo biloba</i>	-	Carrier et al, 1986
Alcaloides Indoles	<i>Catharantus</i>	Vacuola	Zenk et al. 1977
(Ajmalicina, Serpentina)	<i>Roseous</i>		
Malonil Isoflavona glucosidos	<i>Cicer arietinum</i>	Vacuola	Barz et al, 1990
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	-	Tal et al, 1983
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	-	Heinstein, 1985
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Vacuola-Excretado	Mantell et al, 1983
Podofilotoxina	<i>Linum album</i>	Intracelular	Smolny et al, 1992
Betalainas	<i>Basella alba</i>	Vacuola	Cyuel, 1989
Acido Rosmarinico	<i>Coleus blumei</i>	Vacuola	Zenk, 1977
Sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>	Excretado	Eiler et al, 1985
Saponinas	<i>Panax gingesn</i>	-	Payne et, 1991
Sapolin	<i>Solanum avicularee</i>	Excretado ^a	Roisin et al, 1997
		Intracelular ^b	
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizum</i>	Excretado	Tabata et Fujita, 1985
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Excretado	Christen et al, 1989
Tripdiolida	<i>Tripterygium wilfordii</i>	-	Kutney, 1995
Vanilina	<i>Vanilla planifolia</i>	-	Knuth & Sahai, 1989

Células inmovilizadas (^a)Suspensiones de células libres (^b)

Tabla 5. Algunos ejemplos comparativos de productos naturales producidos en cantidades iguales o más altas que los producidos por la planta entera.

Producto	Especie Vegetal	Rendimientos	Rendimientos	Referencia
		(% DW) Planta entera	(% DW) Cultivos celulares	
Ajmalicine	<i>Catharantus roseus</i>	0.3	1	Zenk et al, 1977
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	2.2	18	Zenk et al, 1975
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	2.4	13.4	Murria, 1984
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	1.6	1.6	Anderson et al, 1986
Catharantine	<i>Catharantus roseus</i>	0.0017	0.0005	Kurz et al., 1981
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	2.4	7.8	Tal et., 1982
Ginsenoside	<i>Panax ginseng</i>	4.5	27	Misawa, 1994
Acido Rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	3	23	Ulrich et al., 1985
Serotonina	<i>Catharantus roseus</i>	0.26	2	Deus-Neumann & Zenk, 1984
Sepentina	<i>Catharantus roseus</i>	0.26	2	Sasse et al, 1982
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizum</i>	01-feb	15-20	Fujita, 1988
Acido Shikimico	<i>Gallium mollugo</i>	02-mar	10	Amrhein et al, 1980
Trigonellina	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	0.4	5	Radwan & Kokate, 1980
Tripodiolida	<i>Tripterygium wilfordii</i>	0.01	0.2	Hayashi et al., 1982
Vomilenina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	0.004	0.214	Skockigt et al., 1981

Fuente: Bhojwani & Razdan, 1996.

Tabla 6. Elicitación de metabolitos secundarios en células vegetales

Compuesto	Elicitor	Cultivo celular	Ref
Acido Rosmarínico	Extracto de levadura	<i>Orthosiphon aristatus</i>	Sumaryono et al, 1991
Sanguinarina	Quitina solubilizada	<i>Papaver somniferum</i>	Kurz et al, 1990
Isoflavonoides	Extracto de levadura	<i>Pueraria lovata</i>	Sankawa et al, 1995
Echinatina	Alginato de Sodio	<i>Glycorrhiza echinata</i>	Ayabe et al, 1986
Medicarpina, Maackiaina	Asochyta rabiei	<i>Cicer arietinum</i>	Barz et al, 1990
Isoflavonoides, Isoflavanones	Levadura	<i>Cicer arietinum</i>	Barz & Mackenbrock, 1994
Amidas de Hidroxicinamomil	Levadura	<i>Solanum khasianum</i>	Mühlenbeck et al, 1996
Bergapten	<i>Polyporus umbellatus</i> ^a	<i>Petroselinum crispum</i> ^b	Reil & Berger, 1996

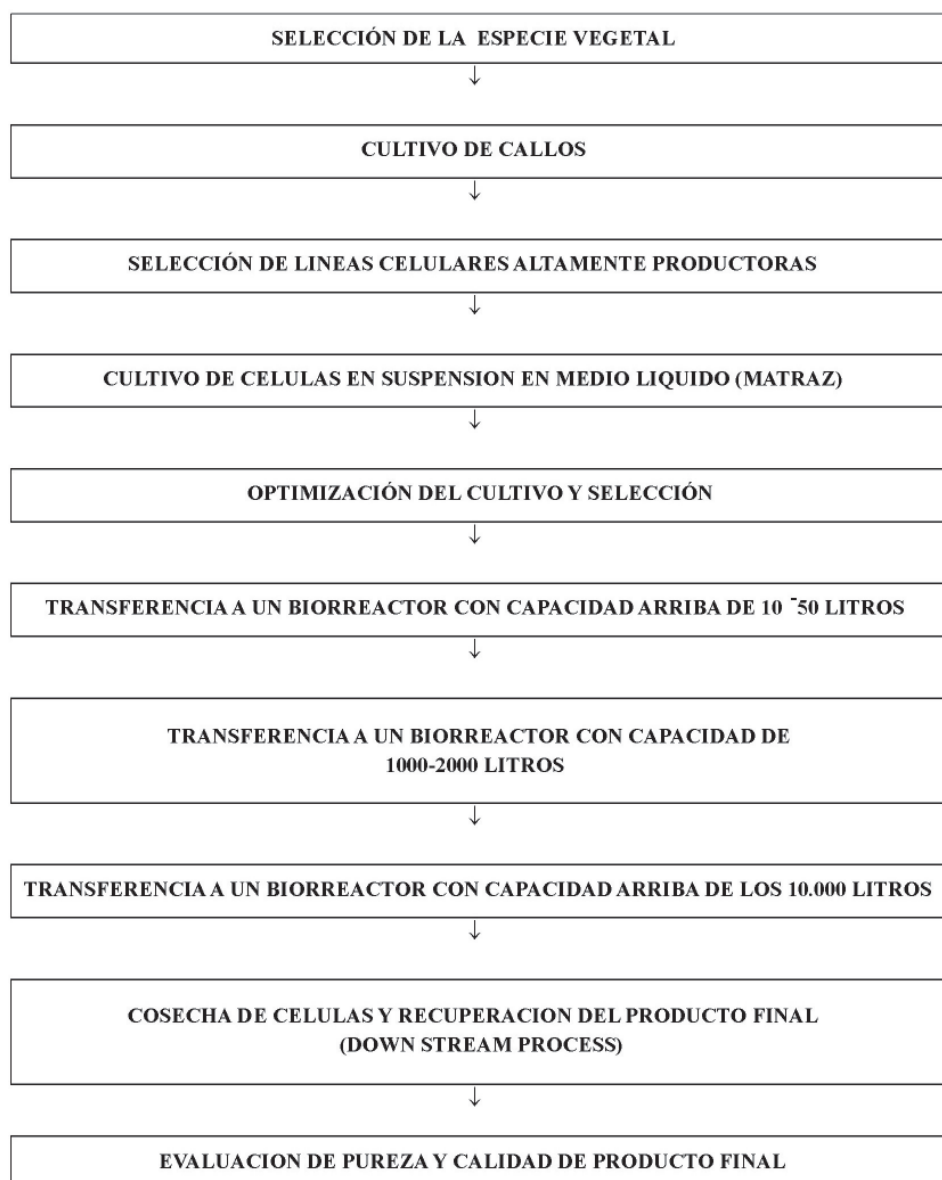
Homogenados autoclavados (^a).**Tabla 7.** Producción de productos farmacéuticos potenciales en cultivo de células vegetales.

Compuesto	Actividad biológica	Fuente vegetal	Rendimiento	Elicitor
Acido Rosmarínico	Antioxidante, antiviral, anti-inflamatorio	<i>Coleus blumei</i>	3.3 g/l	-
Sanguinarina	Antibiótico, antiviral, antitumoral	<i>Orthosiphon aristatus</i>	10 μmol/g FW	Yeast
Alcaloides de Benzofenandridina	Antimicrobial, antitumoral, antiviral	<i>Papaver somniferum</i>	3.6 mg/gFW	Solub chitin
Podophyllotoxina	Antitumoral	<i>Eschscholtzia californica</i>	25 mg/g DW	Jasmonate
Forskolina	Antitumoral	<i>Thalictrum bulgaricum</i>	0.4 mg/m	Yeast
Polisacáridos	Potenciador Inmunológico	<i>Linum album</i>	0.3% DW	-
Antraquinonas	Laxante	<i>Coeus forskohlii</i>	0.073% DW	-
Berberina	Antibacterial, anti-inflamatorio, antimalárico	<i>Echinacea purpurea</i>	10-100 ppm of suspension volume	-
Scopolin	Anti-inflamatorio	<i>Morinda citrifolia</i>	2.5 g/l	-
Ginkgolidos(GA)	Anti-plaquetario	<i>Coptis japonica</i>	7g/l	-
Paclitaxel (Taxol)	Antitumoral	<i>Solanum aviculare</i>	127 μg/gFW	Cell Immob in Ca-Alginate
Shikonina	Antibacterial, anti-inflamatorio, curador de heridas	<i>Ginkgo biloba</i>	0.0000013% DW	-
		<i>Taxus media</i>	110 mg/l	Methyl Jasmonate
		<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4 g/L	Agarpectin
				Pectic acid

Fuente: El-Geweily, 1998.

El siguiente diagrama de flujo, ilustra cada una de las etapas del proceso de cultivo celulares a nivel de biorreactor.

DIAGRAMA DE PROCESOS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES
BAJO CONDICIONES SUMERGIDAS



Producción de metabolitos primarios

De acuerdo a Anderson (1996b), para este milenio, no será necesario cultivar y cosechar los campos. El cultivo de tejidos de ciertas partes de la planta será la base para el desarrollo de nuevos sistemas de producción. Por ejemplo, el cultivo de las partes comestibles de ciertas especies agrícolas o frutas podría crecer *in vitro*. El éxito de estos sistemas dependerá de su estabilidad y precio competitivo, con el fin de poder ser escalados a nivel industrial y comercial (Gupta *et al.*, 2005).

Si el cambio climático se convierte en el factor limitante de la producción agrícola global, será necesario desarrollar nuevos sistemas de producción con el fin de garantizar la seguridad alimentaria y estos sistemas de cultivos se constituirán en lo que podría denominarse “BioAgricultura Urbana”; en otras palabras, producción agrícola en garajes de alta tecnología, especialmente para ser desarrollada en las grandes ciudades (Atehortúa, 2007).

Estos sistemas de producción podrían garantizar la producción de materias primas de varios productos agrícolas en pequeños espacios, dotados de alta tecnología, generando un sistema de producción limpia, 24 horas al día durante 365 días del año, independiente de factores climáticos externos, libre de patógenos, libre de agroquímicos, independiente de la estacionalidad de los cultivos agrícolas, y con la posibilidad de producir GMOs sin que estos interactúen con el medio ambiente, ni la biodiversidad existente. Adicionalmente, estos podrían contribuir a la conservación de la biodiversidad, suelo y agua, al evitar la extensión de la frontera agrícola, que es uno de los factores que mayor impacto causan al medio ambiente. Por otro lado, tienen la ventaja de que se podrían implementar en cualquier parte del planeta, incluso en el espacio.

A pesar de la escasa información científica sobre la producción de productos primarios (materias primas alimenticias), los bioprocesos para la obtención de estas materias primas son prácticamente iguales a la producción de metabolitos secundarios, con la excepción de que los genes responsables de su producción son constitutivos, es decir se expresan directamente sobre el tejido que da origen al producto de interés, mientras en los metabolitos secundarios, algunos de los genes que codifican para dichos compuestos pueden expresarse bajo condiciones de stress en tejidos o células localizadas fuera del centro de producción, haciendo difícil su expresión y manipulación.

Cualquier cultivo celular se inicia con una selección del material parental de calidad “elite” que deseamos multiplicar o producir y este

es un factor crítico. Igualmente importante es el estado fisiológico de desarrollo de la planta donante del explante especializado y utilizado para iniciar el proceso. Durante el desarrollo de la planta, cada órgano o tejido tiene un período crítico en el cual se presenta una rata de multiplicación (división) celular acelerada y la cual es óptima para la selección del explante. Una vez definido este período de alta división celular para la especie sobre la cual vamos a obtener el producto primario, se llevan a cabo todos los procedimientos estándar para el establecimiento de un cultivo *in vitro*.

El tejido diferenciado responsable de la producción del metabolito o producto primario es el seleccionado como material básico (explante) y se procede a establecer el cultivo trasladando secciones pequeñas del explante sobre un medio fresco nutritivo (con macro y microelementos) previamente definido, que contenga una composición hormonal adecuada para generar una rata de división celular permanente. Generalmente, el medio debe contener un balance de auxinas y citoquininas adecuadas. La selección del tipo de hormonas y su concentración deberá ser cuidadosa con el fin de evitar un desarrollo morfogénico no deseado o inducir una alta variabilidad genética dentro del cultivo.

Como respuesta a la composición química y hormonal del medio de cultivo, el explante desarrollará un proceso de callogénesis constante, el cual crece desde las áreas de corte hasta cubrir la totalidad del explante diferenciado. A medida que este se va desarrollando y diferenciando, se separa del explante inicial y se procede a realizar subcultivos sobre medio fresco con la misma composición química y hormonal (cada 15 o 30 días) y bajo las mismas condiciones de cultivo definidas al inicio del cultivo, con el fin de generar una cantidad apreciable y razonable de tejido celular que facilite el establecimiento de las suspensiones celulares. El subcultivo repetido genera un callo friable (en constante división) dando origen a una suspensión celular fina dentro del medio líquido (Wilson & Street, 1975; Noguchi *et al.*, 1977).

Para obtener células libres, pedazos de callos diferenciados y no diferenciados son transferidos a medio líquido y colocados en constante agitación (normalmente a 80-90 rpm). A estos cultivos se les denomina células en suspensión. La agitación del cultivo ejerce al menos las siguientes funciones:

1. Crea una presión sobre la masa de células o agregados para que estas se disgreguen en pequeños grupos y células individuales.

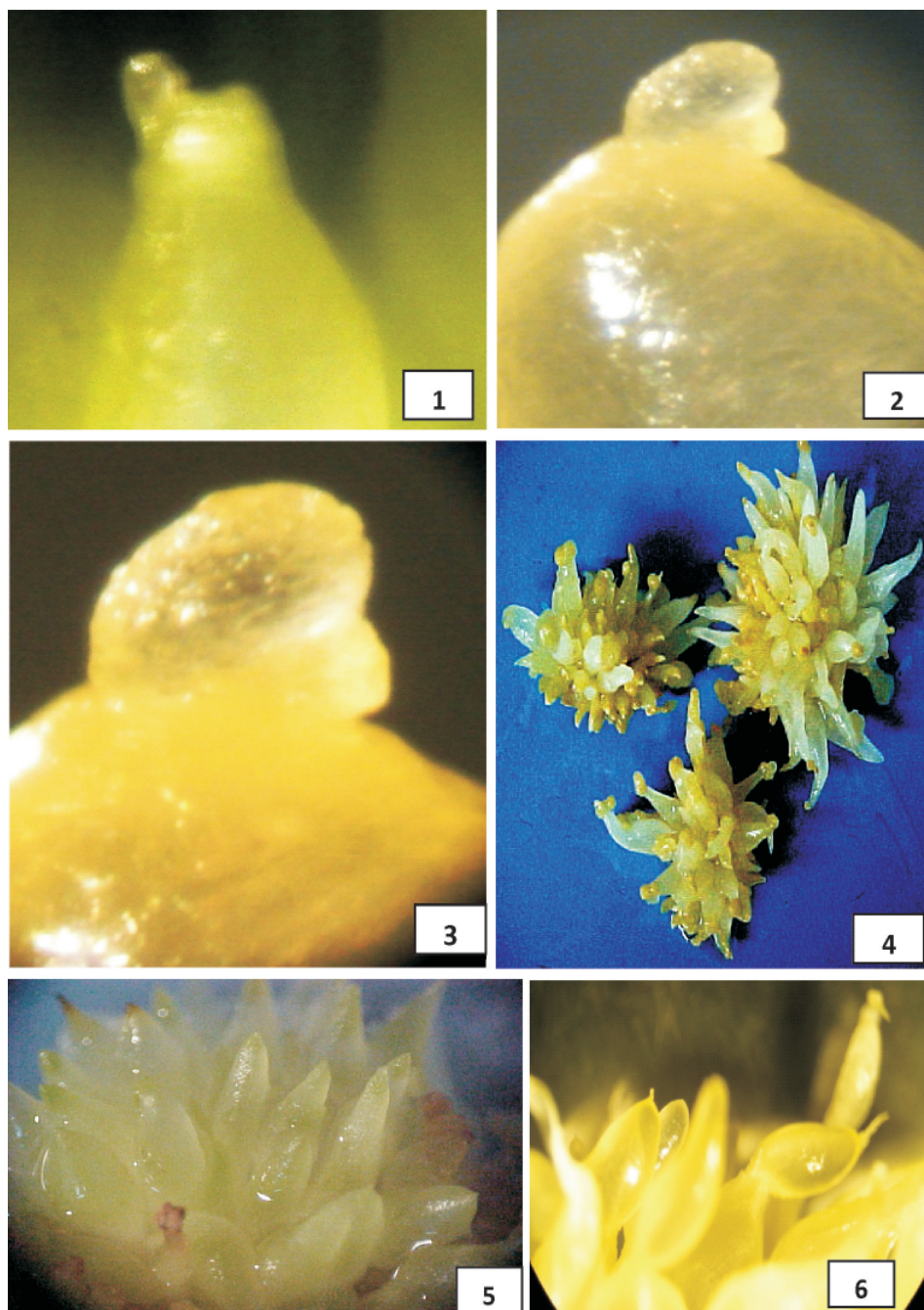
2. Mantiene una distribución uniforme de los nutrientes y hormonas sobre los tejidos.
3. Provee un intercambio de gases entre el medio y el aire del cultivo contenido en el recipiente.

Una vez establecido el cultivo en suspensión, estudiados todos los parámetros físico-químicos y biológicos y de realizar todas la pruebas de viabilidad, se procede a la obtención de alícuotas de la suspensión para transferirlas a medio fresco. Durante el periodo de incubación la biomasa celular se incrementa debido a la división y crecimiento (enlargamiento). Durante este periodo se procede a realizar el estudio de la cinética celular para la especie definida y se subcultiva nuevamente para mantener la suspensión celular en constante crecimiento. Debido a que la producción de los metabolitos primarios es constitutiva, lo importante en este proceso es mantener constante la capacidad de división celular, el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación del tejido. Para mantener la producción de los productos primarios de interés, es importante realizar toma de muestras para evaluar la calidad del producto producido vía HPLC o mediante otras técnicas que nos den la certeza de la calidad del producto producido.

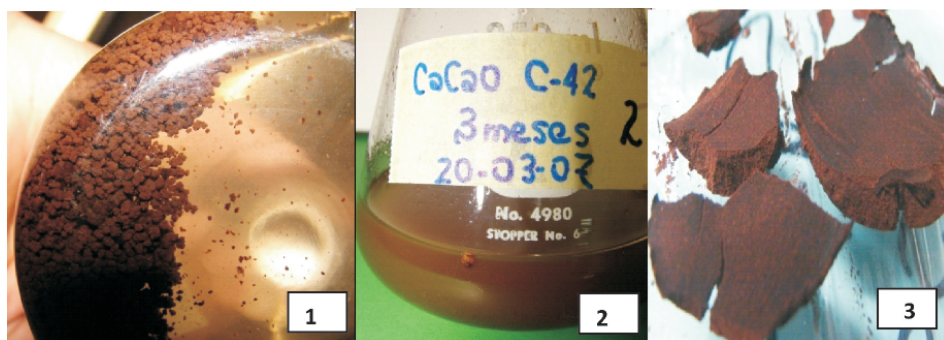
Para garantizar la calidad de la suspensión, es necesario hacer un tamizaje del cultivo con el fin de descartar agregados grandes del cultivo y solo dejar en el subcultivo pequeños agregados celulares con el fin de que todas las células reciban la misma calidad y cantidad de medio de cultivo. Sin embargo, la textura de la suspensión es genéticamente controlada y a menudo es difícil obtener una buena dispersión celular bajo cualquier condición. A pesar de lo anterior, es posible manipular la composición del medio de cultivo para lograr una mayor disgregación, agregando pequeñas cantidades de enzimas hidrolíticas tales como celulasas y pectinasas (Street, 1977b), u otras sustancias como extracto de levadura (Noguchi *et al.*, 1977). Para el caso de metabolitos primarios, estos procesos son menos dispendiosos, ya que a medida que el cultivo se va diferenciando, se obtienen los productos de interés.

El grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia ha venido desarrollando varios protocolos de cultivo para la producción de biomasa celular de especies de valor alimenticio y energético, con el fin de generar nuevas alternativas de producción agroindustrial que contribuyan a mitigar el cambio climático global. A la fecha ha desarrollado protocolos para el cultivo de células productoras del jugo de naranja dulce, cacao, *Jatropha curcas*, macadamia, palma mil pesos y están desarrollando otros protocolos en caña de azúcar y especies de valor alimenticio.

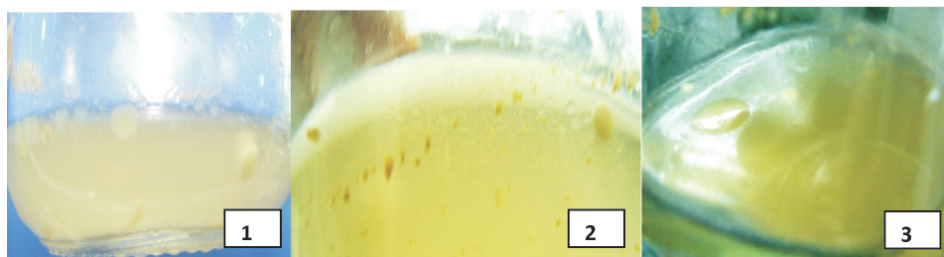
A continuación se ilustran algunos de estos desarrollos:



Fotos 1-6. Muestran el proceso de cultivo y desarrollo de las vesículas de naranja dulce (*Citrus sinensis*).



Fotos 1-3. Secuencia del proceso de cultivos celulares en suspensión para la producción de biomasa de cacao (*Theobroma cacao*).



Fotos 1-3. Cultivos en suspensión de *Jatropha curcas* para la producción de biocombustibles.

Referencias

- Alfermann AW, Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 43: 199-205.
- Atehortúa L. 2007. Bioagricultura Urbana y Cambio Climático. *Producción + Limpia* 2(2): 72-89.
- Bhojwani S.S, Razdan MK. 1996. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier. Ámsterdam. 766 p.
- Bougard F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161(5): 839-851.
- Charlet S, Gillet F, Villareal MI, Barbotin Jn, Fliniaux Ma, Nava Je. 2000. Immobilization of *Solanum chrysotrichum* plant cells within Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiology Biochemistry* 38(11): 875-880.
- Chattopadhyay S, Srivastava A, Bhojwani S, Bisaria V. 2002. Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93(2): 215-220.

- Dörnenburg H. 2004. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes. *Process Biochemistry* 39(11): 1369-1375.
- Doran P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. 1st Ed. Great Britain. Academic Press.
- Dörnenburg H, Knorr D. 1998. Monitoring the impact of high pressure processing on the biosynthesis of plant metabolites using plant cell cultures. *Food Science & Technology* 9(10): 355-361.
- Edahiro JI, Ski M. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(1): 8-13
- Flores HE, Curtis WR. 1992. Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant root. *Ann, New York Acad Sci* 665: 188-2009.
- Fujita Y, Tabata M. 1987. Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD. (Eds.) *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss, New York pp. 169-185.
- Fujita Y. 1988. Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. In: Bajaj YPS. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants I*, Vol 4 Springer-Verlag. Berlin pp. 225-236.
- Gillet F, Roisin C, Fliniaux M, Jacquin-Dubreuil A, Barbotin J, Nava-Saucedo J. 2000. Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced amounts of scopolin. *Enzyme and Microbial Technology* 26(2): 229-234.
- Giri A, Lakshmi M. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18(1): 1-22.
- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati Pk, Rideau M, Gantet P. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3): 341-346.
- Han J, Zhong JJ. 2003. Effects of oxygen partial pressure on cell growth and ginsenoside and polysaccharide production in high density cell cultures of *Panax notoginseng*. *Enzyme and Microbial Technology* 32(3): 498-503.
- Hashimoto T, Azexhi S. 1988. Bioreactors for large-scale culture of plant cells. In: Bajaj YPS. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants I*, Vol 4 Springer-Verlag. Berlin pp. 104-122.
- Honda H, Hiraoda K, Nagamori E, Omote M, Kato Y et al. 2002. Enhanced anthocyanin production from grape callus in air lift type bioreactor using

- viscous additive supplemented medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(2): 135-139.
- Hu ZD, Yuan YJ, Fuzzy. 1995. Growth kinetics of immobilized *Catharanthus roseus* cells in polyurethane foams. *Chemical Engineering Science* 50(20): 3297-3301.
- Huang SY, Shen YW, Chan HS. 2002. Development of a bioreactor operation strategy for L-DOPA production using *Schizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* 30(6): 779-791.
- Joshi JB, Elias CB, Patole MS. 1996. Role of hydrodynamic shear in cultivation of animal, plant and microbial cells. *The Chemical Engineering Journal*. 62(2): 121-141.
- Kieran P, MacLoughlin P, Malone D. 1997. Plant cell suspensions cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59(1): 39-52.
- Lambie AJ. 1990. Commercial aspects of the production of secondary compounds by immobilized plant cells. In: BV. Charlwood & MJC. Ro-dees (Eds). *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Clarenton Press, Oxford. Pp. 265-278.
- Lindsey K, Yeoman Mm, Black Gm, Mavituna F. 1983. A novel method for the immobilization and culture of plant cells. *Febs. Letters* 155(1): 143-149.
- Missawa M. 1991. Research activities en Japan. In: Komamine A, Misawa M, DiCosmo F (eds). *Plant Cell Culture in Japan*. CMC. Tokio, pp. 3-7.
- Misawa M. 1994. *Plant Tissue Culture: An alternative for production of useful metabolites*. FAO Agriculture Services Bull. Rome. 87 pp.
- Mühlbach Hans-Peter. 1998. Use of plant cell culture in biotechnology. En: El-Geweley MR. (Ed.). *Biotechnology Annual Review*. Vol. 4. Elsevier, Ámsterdam, N.Y. 394 p.
- Noguchi M, Matsumoto T, Hirata Y, YamamotoK, Katsuyama A, Kato A, Azechi S & Kato K. 1977. Improvement growth rates of plant cell culture. In: W. Barz et al. (Eds.), *Plant Tissue Culture and the Bio-technological Application*. Springer, Berlin Pp. 85-94.
- Panda AK, Saroj M, Bisaria VS, Bhojwani SS. 1989. Plant cell reactors: a perspective. *Enzym. Microb Technol* 11: 386-397.
- Parr AJ. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. *J. Biotechnol* 10: 1-26.
- Pierik RLM. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa. Palermo, España. 326 p.

- Perullini M, Rivero Mm, Jobbágy M, Mentaberry A, Bilmes SA. 2007. Plant cell proliferation inside and inorganic host. *Journal of Biotechnology* 127(3): 542-548.
- Prakash G, Srivastava A. 2005. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Jyss) suspension cultures. *Process Biochemistry* 40(12): 3795-3800.
- Prakash G, Srivastava A. 2006. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 29(1-2): 62-68.
- Ramachandra S, Ravishankar G. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20(2): 101-153.
- Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4(2): 89-99.
- Sauerwein M, Yoshimatsu K, & Shimomura K. 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Cult. Lett* 9: 1-9.
- Schlatmann J, Hoopen H, Heijnen J. 2000. Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures. En: DiCosmo F, Misawa M, Editores. *Plant cell culture secondary metabolism: toward industrial application*. New York: CRS Press; 1996. Pp. 11-52.
- Shuler MI. 1993. Strategies for improving productivity in plant cell, tissue and organ culture in bioreactors. In: Yoshida T, Tañer RD (Eds), *Bioproducts and Bioprocesses*. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, p. 235-245.
- Smith MAL. 1995. Large-scale production of secondary metabolites. In: Terzi M, Cella R., Falavigna A (Eds.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht. Kluwer Academic. Pp. 669-674.
- Street HE. 1973. *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 503 p.
- Street HE. 1977b. Cell (Suspension) cultures-techniques. In: H.E. Street (Ed.), *Plant Tissue and and Cell Culure*. Blackwell, pp. 61-102.
- Stöckigt J, Obitz P, Falkenhagen H, Lutterbach R, Endress S. 1995. Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 43: 9-109.
- Su WW. 1995. Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures *Appl. Biochem Biotechnol* 50: 189-230.

- Tabata M, Fujita Y. 1985. Production of shikonin by plant cell cultures. En: Zaitlin M, Day P, Hollaender A, Editores. *Biotechnology in Plant Science*. Orlando. Academic Press; p. 207-223.
- Trung N, Murthy HN, Yu K, Jeong CS, Hahn EJ, Paek KY. 2006. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *Journal of Plant Physiology* 163(12): 1337-1341.
- Ushiyama K. 1991. Large scale culture of ginseng. In: Komamine A, Misawa M, DiCosmo F (eds.). *Plant Cell Culture in Japan*. CMC, Tokio. Pp. 92-98.
- Van't Riet K, Tramper H. 1991. *Basic Bioreactor Design*. Marcel Dekker, INC (NY).
- Verpoorte R, van der Heijden R, van Gulik W. ten Hoopen HJG. 1991. Plant Biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. In: Brossi A (Ed.), *The Alkaloids: Vol. 40*. Academic Press, London, pp. 2-187.
- Wilson HM. & Street HE. 1975. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension culcultures of *Hevea brasiliensis*. *Ann Bot* 39: 671-682.
- Yeoman M, Yeoman C. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist* 134 (4): 553-569.
- Zhong JJ, Chen F, Hu WW. 1999. High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Process Biochemistry* 35(5): 491-496.
- Zhong JJ, Pan ZW, Wang ZY, Wu J, Chen F, Tagaki M, et al. 2002. Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(3): 244-250.

COMENTARIOS AL TRABAJO DE LA PROFESORA ATEHORTÚA

El cultivo de células vegetales in vitro ha sido propuesto como una alternativa viable para la producción de una gran cantidad de compuestos fitoquímicos de alto valor agregado pero que se producen naturalmente en muy bajas concentraciones, tales como: drogas, pesticidas, colorantes, fragancias, antioxidantes; igualmente se podrían obtener alimentos básicos. Debido al interés por parte de la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, en las dos últimas décadas, se ha realizado un considerable número de trabajos para diseñar biorreactores para el cultivo de células vegetales.

Se ha demostrado que la productividad y rendimiento de un metabolito vegetal puede exceder a lo producido por la planta en campo. Por esta razón, utilizando esta tecnología, los metabolitos de interés tanto primarios, como secundarios, pueden ser producidos bajo condiciones controladas y reproducibles, independiente de factores geográficos, climáticos y/o situaciones políticas impredecibles.

La profesora Lucía Atehortúa de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia describe además durante su conferencia aspectos importantes de esta otra estrategia de producción de compuestos naturales; por ejemplo, la naturaleza de las células vegetales, las clases de cultivos celulares in vitro (cultivos en suspensión, cultivo de células inmovilizadas, cultivo de órganos), aspectos críticos del cultivo de células, y finalmente cultivos de células para la producción de metabolitos primarios.

A pesar de todas las ventajas expuestas en esta conferencia es importante anotar que a la fecha, la aplicación industrial del cultivo de células en suspensión y la comercialización de sus productos han estado limitadas, debido en gran parte a consideraciones de factibilidad económica, originadas tanto de aspectos de origen biológico, como de algunas consideraciones técnicas. Sin embargo, el cultivo de células sigue siendo una alternativa biotecnológica atractiva bajo ciertas circunstancias; por ejemplo, si la fuente vegetal es difícil de cultivar por métodos agrícolas tradicionales, o tienen un largo periodo de cultivo, o una baja productividad del metabolito de interés, si la síntesis química no ha podido llevarse a cabo, o si es técnicamente problemática.

COMENTARIOS GENERALES

Las ponencias presentadas tanto en la Sección de Parasitología como en la de Productos Naturales fueron de gran interés para todos los participantes. A partir de ellas se pueden encontrar varios aspectos que cabe resaltar. La producción de vacunas contra parásitos es muy difícil debido a los cambios que se producen en su superficie como resultado posiblemente de la actividad de retrotransposones. Sin embargo, es interesante buscar aquellas proteínas que son absolutamente necesarias para la rela-

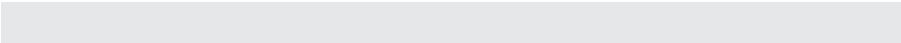
ción entre el parásito y el hospedero, ya que ellas muy posiblemente sean altamente conservadas y sea contra ellas contra las que se puede levantar una respuesta inmune humoral adecuada. Esto, sin embargo, no garantiza protección ya que se ha visto que en áreas geográficas endémicas los sujetos humanos tienen altos títulos de anticuerpos sin que haya necesariamente una protección específica. Esto hace necesario estudiar más cuidadosamente la respuesta inmune celular, ya que a través de ella se podrían encontrar claves para lograr protección a través de vacunación.

Por otro lado, es importantísimo explorar la etnobotánica ya que existen plantas que han sido tradicionalmente usadas para el tratamiento de estas enfermedades tales como la artemisa y la quina, que son base para modificación química que aumente su eficacia y la selectividad de su efecto. Pero es importante tener en cuenta la preocupación expresada en las conferencias acerca de que el producto natural que es efectivo como infusión sea convertido en una droga de marca con la misma efectividad pero a un mayor precio. Lo anterior no se aplica solamente a sustancias naturales antimaláricas sino a todo tipo de sustancias que tienen actividad biológica y que han sido usadas ancestralmente para el tratamiento de la enfermedad. De allí la importancia de una bioprospección sistemática y con reglas claras que eviten la biopiratería y la destrucción de la flora.

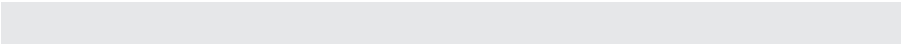
Las líneas de los tripanosómidos y su coevolución son de especial interés para comprender los aspectos epidemiológicos de estas enfermedades y buscar la manera de interrumpir la transmisión a los vectores. En este sentido, varias charlas permitieron tener una visión actualizada de las rutas de dispersión de los parásitos. El estudio del genoma de estos organismos presenta grandes esperanzas para su control y se mostró que existen grupos colombianos que están contribuyendo al entendimiento de la genética y bioquímica del kinetoplastido.

Finalmente, fue inmensamente gratificante observar la forma como se ha desarrollado la química de productos naturales en el país y cómo se han encontrado fuentes nuevas de metabolitos secundarios de posible actividad biológica provenientes de nuestros mares y cómo es posible el estudio y escalado a través del cultivo de tejidos vegetales, con todos sus problemas y con todos sus posibles beneficios. Un aspecto de particular importancia fue el llamado de atención a todos los investigadores en el sentido de que su trabajo tiene una responsabilidad social fundamental y que debe orientarse a mejorar las condiciones de los ciudadanos. De aquí que la utilización de las plantas como productores de aceites y aromas combina la comercialización de los productos con la producción de las plantas por los campesinos en forma científicamente sistematizada para mantener la calidad y por consiguiente el precio.

Un aspecto muy interesante a resaltar es que las conferencias publicadas serán un valioso manual para los futuros investigadores ya que incluyen en forma detallada los procesos a seguir y en el caso de la determinación de la estructura de compuestos químicos, los protocolos de análisis así como las rutas de síntesis.



TALLERES



RELATORÍAS COMENTADAS

Como lo expresamos más arriba, el formato para este Seminario se apartó de los tradicionales para reuniones científicas, ya que se combinaron la sesiones de presentación de conferencias altamente estructuradas con la celebración de talleres con tópicos específicos de discusión. Estos tópicos fueron:

1. Interacción entre los grupos interdisciplinarios: a) Prioridades de investigación. b) Fuentes de financiamiento. Una agenda para los próximos cinco años.
2. Estrategias para el fortalecimiento del intercambio científico y tecnológico entre los países participantes. Agenda para los próximos cinco años.
3. Fortalecimiento de programas doctorales. a) Recursos disponibles. b) Necesidades y nuevos retos. Agenda para los próximos cinco años.

El resultado de las discusiones quedó plasmado en las siguientes relatorías que se presentaron en una sesión plenaria en la que los asistentes tuvieron la oportunidad de ampliar o controvertir los informes.

PARASITOLOGÍA

Grupo 1: Interacción entre los grupos interdisciplinarios. Prioridades de investigación. Fuentes de financiamiento. Una agenda para los próximos cinco años.

Participantes

Nombre	Institución
Nancy Saravia	CIDEIM
Alejandra Falla	CIMPAT. Universidad de Los Andes
Patricia Escobar	CINTROP. Universidad Industrial de Santander (UIS)
Iván Darío Vélez	Pecet. Universidad de Antioquia
Clara González	Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (UIS)
Concepción Puerta	Universidad Javeriana
César Augusto Ramírez	Universidad Javeriana
Daniel Zabala	LIPT. Universidad del Tolima
Edwin Hincapié	Gienoc. Unitrópico
Oneida Espinosa	LIPT. Universidad del Tolima
Victoria Rodríguez	LIPT. Universidad del Tolima
Martha Stella Ayala	Instituto Nacional de Salud
Ángela Patricia Guerra	Instituto Nacional de Salud
Ana Flisser	UNAM. México
Santiago Mas Coma	Universidad de Valencia. España
Luicile Gómez Rodríguez	Universidad Metropolitana de Barranquilla
Diana Carolina Pagonero	Universidad Javeriana
Edgar Peña	Universidad Javeriana
Nelson Uribe	Universidad Industrial de Santander
Lorena González	CIMPAT. Universidad de Los Andes
Andrea Coronado	CIMPAT. Universidad de Los Andes
Néstor Pinto	CIMPAT. Universidad de Los Andes
Jorge Molina	CIMPAT. Universidad de Los Andes

Lecciones de colaboraciones nacionales e internacionales

I. Debilidades percibidas en la interacción exitosa de los grupos:

- Deficiencia en la capacidad administrativa y gerencial.
- Necesidad de desarrollar capacidad en la planificación y organización, y seguimiento de proyectos.

II. Elementos claves por el éxito de Proyectos interdisciplinarios:

- Participación e intervención de diferentes disciplinas en el desarrollo de un propósito común, lo cual motiva proyectos colaborativos.
- Conocimiento del enfoque de investigación y de los requerimientos de las agencias auspiciadoras potenciales.
- Asociaciones basadas en la complementariedad en los aportes de los “socios” al proyecto, como son capacidades, tecnologías, disciplinas y/o enfoques.

La capacidad de llegar a ser considerado elegible y competir como socio en proyectos colaborativos internacionales depende de la capacidad administrativa y gerencial tanto de la institución ejecutora como de los estamentos estatales (Ministerios, Aduana, etc.).

Se proponen las siguientes acciones con el fin de superar las debilidades identificadas:

1. La inclusión de gestión y administración de proyectos en los **programas de ciencias de las Universidades nacionales**.
2. La promoción y apoyo por parte de **COLCIENCIAS** en el fortalecimiento de la capacidad de las instituciones del sistema de ciencia y tecnología nacional en la gestión y administración de macroproyectos nacionales e internacionales.
3. La gestión y abogacía de las instituciones pertenecientes a la **comunidad científica** y los estamentos estatales para que conozcan los requerimientos y tengan la capacidad administrativa de cumplirlas oportunamente.

Identificación de Prioridades

Se destacó la importancia de la toma de decisiones sobre prioridades basadas en la información adecuada en términos de confiabilidad y vigencia. Existe una debilidad en el acceso y disponibilidad de la información actualizada y comprensiva.

El fortalecimiento de los sistemas de información permitirá realizar un análisis de la situación de salud y de las enfermedades a fin de establecer prioridades de investigación y decisiones políticas.

Prioridades

- *Mayor inversión en investigación en Ciencias Básicas* tanto dentro del programa nacional de Ciencia y Tecnología en Salud como en el Programa de Ciencias Básicas. Se destacó como una prioridad y pre-requisito para desarrollar investigaciones aplicadas e intervenciones de impacto en las enfermedades endémicas. Se recomiendan convocatorias específicas para proyectos de investigación básica en salud.
- *Políticas que promuevan y prioricen el desarrollo de medicamentos y vacunas para enfermedades endémicas* fueron consideradas necesarias hacia el ordenamiento y concentración de los esfuerzos de diversas instituciones con capacidades para aportar al desarrollo de productos.
- El desarrollo de productos requiere *fomento de capacidades* desde investigación estratégica hasta ensayos pre-clínicos y clínicos, producción y buenas prácticas.
- Basados en las prioridades del Plan Nacional de Salud Pública del Ministerio, las *Zoonosis y las Enfermedades Transmitidas por Vectores han sido identificadas como prioridad*. Son susceptibles a cambios climáticos, y las áreas de mayor biodiversidad presentan mayor riesgo. La capacidad de la comunidad científica nacional y los nexos colaborativos confieren factibilidad de abarcar macroproyectos interdisciplinarios en esta área.
- Se destaca la importancia de establecer *políticas nacionales de salud para la generación de consorcios dirigidos hacia el desarrollo de productos* (Pruebas diagnósticas, fármacos y vacunas) para las ETV y zoonosis. Los grupos/entidades podrían trabajar en diferentes etapas del desarrollo de los productos con el apoyo del Ministerio de Protección Social en la evaluación y regulación de los productos. Tales políticas orientarían la búsqueda de conocimiento y capacidad tecnológica hacia la generación de un producto a partir de la investigación básica. Las Universidades y otras instituciones apoyarían la formación de recurso humano y desarrollarían componentes específicos en la generación de conocimiento y productos.
- Desarrollar *capacidad de Gestión del Conocimiento* (Una prioridad del Plan Nacional de Salud) que optimice el flujo de información con el fin de tomar decisiones basadas en evidencia. Una medida factible a corto plazo es la consulta y comunicación permanente entre autoridades de salud pública y la comunidad científica mediante:

1. Acceso de bases de datos estadísticos de indicadores de salud.
2. La convocatoria y participación de investigadores, instituciones profesionales biomédicas y de salud, con el conocimiento pertinente en la toma de decisiones técnicas y políticas específicas.
3. El fortalecimiento del diagnóstico y el informe de casos desde los municipios.
4. Comunicación pro-activa de los representantes de Sociedades profesionales biomédicas y de salud nacional (ACIN, Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical entre otros) con la Dirección de Salud Pública del Ministerio de Protección Social.

Otros tópicos de investigación en las prioridades identificadas

- Resistencia a drogas: farmacovigilancia e identificación de mecanismos de resistencia de los diferentes patógenos.
- Estudio del hospedero como co-partícipe en la patogénesis y blanco de intervenciones incluyendo susceptibilidad, respuesta a fármacos, etc.
- Distribución y emergencia de enfermedades zoonóticas y ETV.

Teniendo en cuenta las líneas de investigación convocadas para este Primer Simposio de Ciencia se propuso como potencial punto de partida para el desarrollo de productos como prioridad para responder problemas de salud: **La identificación y desarrollo de fármacos a partir de productos naturales para el tratamiento de zoonosis y ETV endémicas.**

Grupo 2. Estrategias para el fortalecimiento del intercambio científico y tecnológico entre los países participantes. Agenda para los próximos cinco años

En busca de un mayor fortalecimiento de los grupos colombianos de investigación se presentarán algunas de las ofertas que promueven la capacitación de los investigadores y fuentes de financiación para estudios de postgrado.

El Dr. José Luis Ramírez (Instituto de Estudios Avanzados UNU-BIOLAC, Venezuela) presentó el programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (BIOLAC) de la Universidad de Naciones Unidas (UNU), el cual ofrece apoyo en la atribución de becas, el estímulo a la creación de

redes de investigación y el apoyo financiero en favor de cursos de estudios avanzados en Universidades e Instituciones públicas y privadas, que cuenten con trayectoria reconocida en investigación. El programa está enfocado al área de Biociencias en general y en los últimos siete años ha otorgado 231 becas y financiado 88 cursos a investigadores latinoamericanos. Los países que principalmente han sido auspiciados por este programa son Cuba, Perú, México, Argentina y recientemente Venezuela.

Los candidatos deben ser presentados por un tutor vinculado a un centro de investigación reconocido y pueden proponer el lugar al cual quieran aplicar, teniendo en cuenta su reconocimiento científico. Las becas de entrenamiento pueden tener una duración de cuatro semanas a cuatro meses y la convocatoria no tiene un límite de edad. El programa puede cubrir el 100% de los gastos o financiar montos no auspiciados por la entidad a la cual está vinculado el investigador. El becario debe presentar informes técnicos y financieros, en los que se sustente el cumplimiento de los objetivos y debe dar crédito a BIOLAC en las publicaciones que se desarrollen a partir de los cursos o pasantías realizadas.

Igualmente, la Dra. Frédérique Brenière (Institut de Recherches pour le Développement, IRD Montpellier y la Paz, Bolivia) presentó el programa de becas doctorales del IRD para extranjeros, el cual ofrece aproximadamente 20 a 30 becas. Las universidades a las que puede aplicar el candidato pueden ser de América Latina o de Europa. El IRD también ofrece financiación para estadías cortas e intercambios entre centros de investigación, en los que se busque una actualización en técnicas o análisis y discusión de resultados. Igualmente apoya grupos en formación, por medio del financiamiento de equipos de laboratorio y formación científica de los investigadores.

Otra de las opciones presentada al grupo de discusión por el Dr. Felipe Guhl es la financiación de proyectos tanto en investigación básica como aplicada y de becas para entrenamientos y doctorados del TDR (The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases), el cual se encuentra cofinanciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (UNDP) y el Banco Mundial. Este programa busca fortalecer la capacidad de los países endémicos para llevar a cabo la investigación necesaria para desarrollar nuevas tecnologías para el control de enfermedades. Al becario se le ofrecen tiquetes aéreos, soporte mensual, ayudas para materiales de estudio incluyendo computador, gastos de matrícula, soporte en gastos de tesis y seguro médico.

Por otro lado, en nuestra segunda sesión contamos en la mesa de trabajo con la Dra. Ingrid Guerra, Coordinadora de la División de Inter-

nacionalización de la Ciencia del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” – COLCIENCIAS, la cual nos presentó un gran número de convocatorias que existen para el intercambio de investigadores en el marco de proyectos conjuntos internacionales con diferentes países dentro de los que se encuentran: Francia, Alemania, España, Brasil, México, Cuba, Chile y Argentina. Con cada uno de estos países se tienen establecidos diferentes convenios en los que se establece el perfil del investigador dependiendo del área de trabajo y el tipo de apoyo financiero que le podrá ser otorgado. Es claro que debe estar contemplada dentro del proyecto en el que se esté trabajando la asociación entre los grupos de investigación de los dos países, ya que estas becas únicamente cubren los gastos del investigador que va a realizar el entrenamiento o algún tipo de estudio.

COLCIENCIAS igualmente ofrece becas de maestría y doctorado para personas que se encuentren vinculadas a alguna entidad en el país. Algunos de los requisitos para ser candidato para estas becas es ser menor de 34 años y se debe regresar al país para condonar 50% de su beca y trabajar en una entidad colombiana. La otra parte de la deuda puede ser condonada con publicaciones.

Se cuenta con entidades colombianas como el Instituto Colombiano de Crédito Educativo y Estudios Técnicos en el Exterior – ICETEX que ofrece un programa de crédito para estudios de postgrado en el exterior hasta por US\$16000 en la modalidad de mediano plazo, donde el usuario cancela el 50% durante el periodo de estudios y el otro 50% al finalizar el periodo de estudios. Igualmente ofrece crédito a largo plazo hasta por US\$8000, cuya cancelación debe iniciar el usuario tres meses después de terminar sus estudios.

Por otro lado, el ICETEX cuenta con un convenio con la Fundación Carolina que promueve estudios en universidades españolas en diferentes áreas. El programa contempla dos tipos de becas: uno en que cubre los rubros de tiquete aéreo, seguro médico y 1200 euros mensuales de mantenimiento y otro parcial en que se cubre transporte aéreo, seguro médico y un porcentaje de descuento en la matrícula.

Otra entidad colombiana que cuenta con un Programa de Crédito-beca para Posgrados en el Exterior (PCB) es COLFUTURO, la cual financia estudios en el exterior de especialización, maestría o doctorado en cualquier área. El monto máximo por año de estudio es de US\$25.000 y se otorga por dos años y parte de la deuda es condonable al cumplir requisitos como terminar el programa al que se inscribió y regresar al país y permanecer en el tiempo exigido.

Conclusiones:

- Actualmente existen varias ofertas que buscan el fortalecimiento del intercambio científico que no son utilizadas en Colombia con la frecuencia deseada.
- Se sugiere que ACOFACIEN se constituya en el organismo que avale las propuestas de intercambio internacional de los grupos de investigación de Facultades de Ciencias del país.
- Creación de un órgano divulgativo al interior de ACOFACIEN acerca de las oportunidades y programas de intercambio internacional científico y tecnológico.

Grupo 3. Fortalecimiento de programas doctorales. Recursos disponibles. Necesidades y nuevos retos. Agenda para los próximos cinco años

De acuerdo a los objetivos planteados por el gobierno en cabeza de Colciencias, desde la década de los años noventa, se busca potenciar las capacidades científicas y tecnológicas mediante el apoyo decidido a sus programas de doctorado. Basados en estos objetivos y en la experiencia hasta el momento de los programas doctorales en Colombia, el siguiente documento muestra cada uno de los puntos importantes a tener en cuenta en una futura agenda que permita el fortalecimiento de dichos programas.

DOFA

Debilidades

1. Carencia de becas adecuadas (no becas-crédito) suficientes para los doctorados.
2. Poca oferta de programas en Colombia. Los cupos de doctorado son pocos, solo se acepta a los estudiantes cuyos directores de tesis tengan la posibilidad de tener dinero para la investigación, donde también es difícil la consecución de fondos.
3. Falta de política estatal sobre formación de doctorados.
4. Falta de reconocimiento social a las personas con formación doctoral, dificultad en la consecución de empleo y de recursos para iniciar una línea de investigación.

5. Falta de madurez y consolidación de los programas existentes en Colombia.
6. No hay programas de doctorado específicamente en parasitología.
7. Hace falta identificar programas en donde seamos altamente competitivos.
8. Falta de estímulos para el mejoramiento de los programas existentes.
9. El procedimiento para validar títulos de doctorados obtenidos en el extranjero es demorado, tortuoso y costoso.
10. Hace falta incluir en los programas de formación doctoral herramientas gerenciales, que le faciliten al futuro doctor la creación o consolidación de su grupo de investigación, la consecución y el manejo de recursos.
11. No hay mecanismos para fomentar transferencia de conocimiento y tecnología desde la investigación en parasitología hacia la empresa: las entidades estatales encargadas, por ejemplo, de programas de salud pública y la sociedad.

Oportunidades

1. Las universidades demandan profesionales con título de doctorado.
2. Apoyo de Colciencias con becas-crédito, adquisición de equipos y apoyo a movilidad.
3. Redes nacionales e internacionales de investigación existentes y la posibilidad de desarrollar otras.
4. Hay posibilidad de acceder a becas para doctorados en instituciones extranjeras.
5. Creación de nuevos programas de doctorado.
6. Estimular la sana competencia entre los programas de doctorado, lo cual puede redundar en el mejoramiento de su calidad.
7. Los estudiantes de doctorado son necesarios para mantener, fortalecer y enriquecer la investigación.
8. Creciente interés internacional en las enfermedades desatendidas.

Fortalezas

1. La posibilidad de trabajar *in situ* nuestra problemática.
2. La biodiversidad colombiana.
3. El creciente interés de entrar en un programa doctoral.
4. El talento humano.
5. El buen nivel de la formación en pregrado y en maestría en las universidades colombianas.
6. La existencia de grupos de investigación reconocidos nacional e internacionalmente por su trayectoria.
7. Existencia de asociaciones científicas nacionales en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.

Amenazas

1. La falta de trabajo interdisciplinario que conlleve a resultados integrados para dar solución a la problemática y objetivos planteados.
2. Los proyectos de investigación se justifican en una futura aplicabilidad, pero al final lo que se hace es hacer solamente un aporte en el conocimiento.
3. Hace falta incorporar el componente social en los proyectos de investigación.
4. Cambios en la interpretación o interpretación arbitraria de las normas en los programas de doctorado ya existentes.
5. Insuficiencia de adecuados equipos de gestión y coordinación de los programas de doctorado.
6. Hay oportunidades perdidas de becas e intercambio, porque algunas veces se quedan los convenios en los escritorios o por barreras idiomáticas.
7. La falta de dominio del inglés científico como segundo idioma.
8. Se le dan prioridades a otras áreas a nivel tecnológico (nanotecnología, energías alternativas) dejando a un lado la prioridad en parasitología.

9. Falta de conciencia sobre beneficios para el desarrollo de la investigación en parasitología.
10. Tenemos una comunidad científica pequeña y por lo tanto una masa crítica pequeña.

Agenda propuesta

1. Formación de una comisión de alto nivel para plantear la problemática, con propuestas de soluciones, ante las entidades estatales directamente relacionadas: Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Educación, Colciencias, ICETEX, etc.
2. Creación de programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
3. Hacer un inventario de los programas de doctorado existentes actualmente en biología y ciencias biomédicas y evaluar en cuántos de ellos se realizan estudios específicamente en las áreas de parasitología o entomología.
4. Difundir a través de las asociaciones científicas nacionales información sobre programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
5. Establecer los mecanismos necesarios para concienciar y sensibilizar a la sociedad y a la empresa, de la necesidad de una formación especializada con el máximo grado académico de doctores en parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
6. Fortalecer la participación en redes nacionales e internacionales de investigación.
7. Establecer consensos para unificar criterios de estructuración de programas doctorales.
8. Buscar mecanismos que permitan agilizar la validación de títulos de doctorado obtenidos en el extranjero.
9. Crear estímulos para el mejoramiento continuo de la calidad de los programas doctorales.
10. Promover jornadas científicas con la participación de las entidades estatales y de la empresa para divulgar los resultados de los trabajos de investigación y discutir su eventual aplicabilidad.

9. Falta de conciencia sobre beneficios para el desarrollo de la investigación en parasitología.
10. Tenemos una comunidad científica pequeña y por lo tanto una masa crítica pequeña.

Agenda propuesta

1. Formación de una comisión de alto nivel para plantear la problemática, con propuestas de soluciones, ante las entidades estatales directamente relacionadas: Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Educación, Colciencias, ICETEX, etc.
2. Creación de programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
3. Hacer un inventario de los programas de doctorado existentes actualmente en biología y ciencias biomédicas y evaluar en cuántos de ellos se realizan estudios específicamente en las áreas de parasitología o entomología.
4. Difundir a través de las asociaciones científicas nacionales información sobre programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
5. Establecer los mecanismos necesarios para concienciar y sensibilizar a la sociedad y a la empresa, de la necesidad de una formación especializada con el máximo grado académico de doctores en parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
6. Fortalecer la participación en redes nacionales e internacionales de investigación.
7. Establecer consensos para unificar criterios de estructuración de programas doctorales.
8. Buscar mecanismos que permitan agilizar la validación de títulos de doctorado obtenidos en el extranjero.
9. Crear estímulos para el mejoramiento continuo de la calidad de los programas doctorales.
10. Promover jornadas científicas con la participación de las entidades estatales y de la empresa para divulgar los resultados de los trabajos de investigación y discutir su eventual aplicabilidad.

PRODUCTOS NATURALES

Grupo 1. Interacción entre los grupos interdisciplinarios: a) Prioridades de investigación. b) Fuentes de financiamiento. Una agenda para los próximos cinco años

La mesa de trabajo se inició con la presentación de los participantes que comprendían principalmente profesores de universidades como la del Atlántico, de Antioquia, del Cauca, de Cartagena, del Tolima, Tecnológica de Pereira, Pontifica Universidad Javeriana, Universidad de la Salle, un investigador del INVEMAR, además de profesores del Departamento de Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, junto con estudiantes de posgrado y pregrado de algunas de las instituciones antes mencionadas.

Los primeros comentarios buscaron establecer el tipo de interacciones realizadas hasta el momento por los investigadores presentes, mostrando que se han realizado trabajos conjuntos, citando como ejemplo el trabajo entre investigadores de la U. Javeriana, el Departamento de Farmacia de la U. Nacional y la U. Distrital. Otras interacciones que han servido como modelo de cooperación INVEMAR y la Universidad Nacional de Colombia y otros entre la U. Tecnológica de Pereira y la Universidad Nacional de Colombia. Algunas de estas experiencias bajo la figura de convenios marco de cooperación interinstitucional, otras de ellas como fruto de contactos personales entre los investigadores de los grupos, los cuales intercambian servicios y pasantes tanto de pregrado como posgrado. En algunos de los casos, las interacciones requirieron movilidades de los investigadores o estudiantes que fueron financiadas a través de proyectos de investigación conjuntos, pero en su mayoría el financiamiento proviene de recursos propios.

Al respecto se comentó la importancia de la interacción entre grupos nacionales, pues en muchos de los casos nuestros resultados dependen de interacciones con grupos en el exterior que requieren aún más tiempo y esfuerzos, desaprovechando el potencial de otros grupos de investigación nacionales. Un claro ejemplo de esto es la necesidad de realizar ensayos de actividad biológica en el

exterior, mientras que algunos de estos ensayos han sido implementados de manera satisfactoria por otros grupos en nuestro país.

A partir de este panorama se sugirió la necesidad de la formación de la **red temática en productos naturales** que incluya a todos aquellos grupos de investigación dedicados al tema o que tengan algunas de sus líneas de investigación relacionadas a los productos de origen natural, aquellos que hacen tanto la obtención de extractos, el aislamiento, la elucidación estructural, la síntesis, la biotecnología, como aquellos que buscan su aplicabilidad con fines terapéuticos, en la industria de alimentos, colorantes, recubrimientos, productos veterinarios, cosméticos, agroindustria y otros campos que por motivos de espacio, mas no de importancia, no mencionaremos en este momento.

Para la conformación de esta Red Temática se ofrecieron como voluntarios para su organización Norma Angélica Valencia del Departamento de Farmacia, José Hipólito Isaza de la U. Tecnológica de Pereira, Liliana Betancourt de la Universidad de la Salle Bogotá, Bárbara Moreno del Departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia-Bogotá, Jaime Martín de la Universidad del Cauca y Freddy Ramos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, quienes se reunirán y decidirán la cabeza visible de esta red.

Dentro de las funciones de este comité organizador se estableció la generación de un correo electrónico rpncolombia@gmail.com como primer punto de contacto a partir del cual se enviarán formularios-encuestas en los que se identifiquen los grupos integrantes de la red, sus enfoques investigativos y la posible oferta de servicios tales como bioensayos, equipos, posibilidades de intercambio de estudiantes, entre otros aspectos. Una vez cumplida una primera etapa de organización de la red, se propuso sea acogida o bien por la ACCEFYN, ACOFACIEN o COLCIENCIAS, o incluso por las tres instituciones para su fortalecimiento, al tiempo que se invita a todos los investigadores, aquellos de amplia y reconocida experiencia como aquellos de corta trayectoria, a participar de manera activa en esta iniciativa. Otra de las funciones propuestas para la red temática fue que ésta se encargue de organizar y difundir la programación de seminarios y cursos de actualización y capacitación en temas como la biología molecular como herramienta en PN, técnicas de elucidación estructural de alta sensibilidad, derreplicación, biotecnología, bioinformática, filogenética, nuevas técnicas analíticas LC, LC-MS, LC-MS-NMR, cursos en técnicas de cultivo, así como cursos acerca de bioensayos.

Otra de las estrategias de interacción es la participación en congresos. Ante este punto en el país existe como antecedente la institución del congreso

de Fitoquímica, cuya décima edición se realizará en la ciudad de Popayán en el 2009. Ante la existencia de experiencia en la realización de este evento, el antecedente de que en las últimas versiones se han presentado trabajos no sólo en el campo de la fitoquímica y con el ánimo de no ser excluyentes con las otras áreas de los productos naturales como la síntesis de productos naturales, los productos naturales marinos, productos naturales a partir de microorganismos, entre otros, se realizó la propuesta de cambiar el nombre del congreso por el de Congreso de Productos Naturales.

Una tercera forma de interacción de reciente existencia es la **Revista de Productos Naturales**, Una revista electrónica joven, que nació por iniciativa del Dr. José Hipólito Isaza, que es de libre acceso (tanto en consulta como en publicación) y que se encuentra indexada en **Cross Reference** y que se halla en el proceso de ser indexada ante otras entidades como REDALYC. La revista requiere del apoyo de los investigadores nacionales e invita a otros investigadores tanto nacionales como extranjeros a hacer la publicación de sus resultados mediante este medio. Se sugirió hacerle publicidad en otros medios de divulgación científica tales como la Revista Colombiana de Química y la Revista de la ACCEFYN.

Una cuarta estrategia de interacción que facilitará el trabajo entre los grupos nacionales es la suscripción de convenios marco dentro de los cuales se puedan desarrollar convenios específicos y proyectos de investigación conjuntos. En muchas de nuestras instituciones ya existen dichos convenios y entre otras de ellas deberá ser prioritario generarlos como herramienta para futuras colaboraciones. Estos convenios deberán incluir temas como la protección de los pasantes en intercambio por ARP, y otros seguros médicos que garanticen el total cubrimiento y protección de los pasantes.

Una agenda científica para los próximos cinco años. Prioridades de investigación

Dentro de las reuniones se consideró la necesidad de realizar estudios de Bioprospección de ecosistemas no tradicionales: páramos, desiertos, la selva húmeda, suelos, el mar, como fuentes poco exploradas o incluso inexploradas de diversidad biológica y metabólica.

Ecología terrestre: estudio de relaciones aleloquímicas planta-planta, planta-insecto, insecto-insecto para el control de plagas.

Se deben continuar los trabajos en Fitoquímica y Farmacognosia, que además de su compromiso con la generación de conocimiento ayuden a for-

talecer las relaciones con otras entidades del estado como el Invima y el Ministerio de Protección Social. Estos esfuerzos conjuntos entre los investigadores y el Estado se deben orientar hacia la generación de normas técnicas, de validación de procesos y productos, capacitación de los funcionarios de las entidades, convenios para la realización de ensayos y análisis en el laboratorio, control y aseguramiento de calidad de productos naturales, agrandar el vademécum, impulsar el conocimiento de nuestras plantas medicinales, generar normatividad en cuanto al cultivo y manejo de las plantas y realizar el desarrollo de productos fitoterapéuticos. También se ha mencionado la necesidad de iniciar con una lista de plantas Tóxicas de Colombia.

La reunión discutió la necesidad de investigación en posibles usos de subproductos agrícolas como fuente de extractos y compuestos de importancia industrial (farmacéutica, alimenticia, fitomedicamentos, cosmética, agroquímicos), y la realización de investigación en el contenido de plantas usadas como cosméticos (antioxidantes, emolientes, antiinflamatorias).

Se propuso como tema el estudio de insectos fitófagos de plantas con alto contenido alcaloidal como una fuente de bacterias y enzimas capaces de degradar este tipo de metabolitos, con aplicación al control de plantaciones ilícitas.

En cuanto a la bioprospección de productos naturales marinos se propuso avanzar e innovar en temas como el estudio de microorganismos marinos tales como hongos, bacterias, dinoflagelados, cianobacterias y especialmente escalado de cultivos. Trabajar con organismos difíciles tanto de colectar, como de cultivar o químicamente variables, tales como los corales duros, hidroides, organismos de alta profundidad y dinoflagelados.

Se propone aumentar la investigación en temas no abordados en Colombia como plantas marinas, gusanos, ascidias, briozoos, moluscos, equinodermos, en zonas no exploradas como la costa del Pacífico, Urabá, Guajira, Costas de Córdoba y del Departamento del Atlántico.

Interacciones microorganismos-invertebrados (exo y endosimbiontes) con el fin de responder preguntas de investigación como “¿qué hace quién?” haciendo referencia a casos como el de *P. elizabethae*, entre muchos otros, en el cual se ha establecido que es un microorganismo simbiote el productor de los compuestos de interés. Abordar de manera interdisciplinaria el problema de la dificultad en el cultivo de exo- y endosimbiontes como barrera para su estudio.

Incursionar temas de biología molecular que permitan por medio de análisis de los genes de los organismos conocer los clusters de genes que

producen ciertos compuestos si están en la bacteria o en el organismo y como herramienta de selección de organismos para su estudio químico.

Ecología Química Marina: interacciones hospedero-patógeno, afloramientos de algas potencialmente tóxicas y su importancia para Colombia, análisis de comunidades microbianas asociadas a invertebrados marinos.

Estudios en genómica marina para la búsqueda de aproximaciones a la exploración de metabolitos de interés ecológico o industrial. Un ejemplo de esta diversidad por explorar se encuentra en los dinoflagelados que tienen genomas enormes, entre 50 y 200 veces el genoma humano.

Como tópicos finales se propuso el desarrollo de la biotecnología marina como una de las herramientas de aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales marinos, y temas como la biotecnología marina y el estudio de usos étnicos de recursos marinos. En un aparte especial se propuso el impulso de líneas de estudio de microorganismos independiente de la fuente, como fuente de compuestos de origen natural. Un ejemplo del interés de estos organismos son los extremófilos (salinas, páramos, etc.), microorganismos que por las condiciones en las que viven poseen metabolitos y enzimas únicas con un potencial aprovechamiento importante para el desarrollo de nuevas tecnologías. Adicionalmente los microorganismos deben ser explorados como biorreactores para aplicaciones biotecnológicas y como fuente de nuevos antimicrobianos, que ayuden en el control del resurgimiento de enfermedades producidas por microorganismos resistentes. También se mencionó la importancia del estudio de líquenes como fuente novedosa de compuestos de importancia industrial con amplia gama de actividad biológica, ya que Colombia es el segundo país en biodiversidad y en el mundo son pocos los grupos dedicados a estudiar este tipo de organismos.

Impulsar estudios en nuevas aplicaciones de los productos naturales: saborizantes, aromas, antioxidantes, medicinas veterinarias, acaricidas, insecticidas, buscando aplicaciones industriales pensando en producción agrícola orgánica.

Finalmente se discutió la generación de una red de laboratorios capaces de ofrecer servicios de bioensayos contra enfermedades prioritarias para la nación y otras aplicaciones industriales, enfatizando en dos factores primordiales para la realización de estos bioensayos: el primero de ellos, el requerimientos de cantidad de muestra, para el cual se hacen necesarios esfuerzos en la miniaturización de los bioensayos con el fin de reducir la cantidad de muestra empleada para estos ensayos, sin sacrificar la veracidad de los datos; el segundo de los aspectos mencionados es la velocidad en los análisis

como herramienta fundamental que permita hacer más ágiles las investigaciones. Se mencionó la necesidad de la implementación de bioensayos para control de plagas, y el establecimiento de condiciones para el mantenimiento de crías que permitan hacer los bioensayos. La generación de esta red será acogida dentro de la Red Colombiana de Productos Naturales.

Se planteó como punto fundamental de la agenda el seguimiento a las actividades principales de ésta, como lo es la formación de la RCPN, la conformación del banco de datos, así como el desarrollo de los eventos programados.

Grupo 2. Estrategias para el fortalecimiento del intercambio científico y tecnológico entre los países participantes. Agenda para los próximos cinco años

A. COOPERACIÓN CON ESPAÑA

1. Ayuda y becas de las universidades españolas

Algunas universidades españolas tienen convocatorias de becas administradas por ellas mismas, por ejemplo Universidad de Salamanca (en colaboración con el Banco de Santander: programa de Becas de pos-Grado para estudiantes Iberoamericanos), Universidad de la Laguna (en colaboración con el Cabildo Insular de Tenerife: programa de Becas de pos-Grado para estudiantes Iberoamericanos), Universidad de Granada (Plan propio de investigación: Programa de Profesores y científicos visitantes).

Otras universidades ofrecen becas para hijos de emigrantes españoles como por ejemplo las de las universidades gallegas (Universidad de Vigo, Universidad de la Coruña y Universidad de Santiago de Compostela), para descendientes de gallegos en Latinoamérica.

Muchas otras universidades ofrecen la posibilidad del intercambio de profesores e investigadores, previo convenio, con la universidad colombiana. Estos convenios de intención son fáciles de elaborar.

2. Ayudas y becas de las comunidades autónomas

Algunas comunidades autónomas españolas tienen programa de apoyo a extranjeros, por ejemplo Junta de Andalucía, a través de la Consejería de Presidencia, y la Agencia Andaluza de Cooperación Internacional tiene una convocatoria de becas de formación (septiembre 2007-2008) y una convocatoria de proyectos (sin fecha).

3. Ayudas y becas del gobierno español

Proyectos a través del PCI Iberoamérica MAEC-AECID. Para detalles se puede consultar BOE núm. 165, Miércoles 9 julio 2008, de la Presidencia de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, por la que se convocan ayudas para la realización de las diversas modalidades que conforman el Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica entre España e Iberoamérica (PCI-Iberoamérica), y el manual de usuario recogido on line de solicitudes de ayuda PCI Iberoamérica MAEC-AECID CONVOCATORIA 2008.

Proyectos conjuntos de investigación. Información tipo A. Ayudas para la movilidad y otros gastos de un equipo conjunto procedente de Centros españoles e iberoamericanos, para desarrollar un proyecto conjunto de investigación, según la memoria y el plan de ejecución del mismo. Financiación a transferir al centro/universidad española. Cantidad en euros, un máximo de 30.000 euros.

Proyectos conjuntos de docencia. Información tipo B. Ayudas para la movilidad de un equipo conjunto procedente de centros españoles e iberoamericanos, para desarrollar un proyecto conjunto de postgrado, según la memoria y el plan de ejecución del mismo. Financiación a transferir al centro/universidad española: cantidad en euros, un máximo de 30.000 euros.

Acciones complementarias. Información tipo C. Ayudas para la asistencia a reuniones, seminarios, talleres, encuentros, etc., según un plan de movilidad para la ejecución de las acciones previstas con el fin de estrechar vínculos entre equipos de investigadores y/o docentes y sentar las bases para el desarrollo de futuros proyectos de investigación y/o docencia, pudiendo la acción llevarse a cabo en España y/o en el país iberoamericano. Financiación a transferir al centro/universidad española (Cap. 4): cantidad en euros, un máximo de 10.000 euros.

Acciones integradas para el fortalecimiento institucional. Tipo D. Ayudas para la financiación de acciones consistentes en la articulación de actividades que consoliden y fortalezcan institucionalmente unidades, departamentos o laboratorios de una universidad o centro de investigación de un país iberoamericano, mediante la organización e impartición de cursos de formación y pasantías, movilidad, gastos de material fungible y adquisición de equipamiento de apoyo y científico. También podrá contratarse personal docente e investigador y, en su caso, de Administración y Servicios en la entidad contraparte del país iberoamericano. En este supuesto los fondos necesarios serán transferidos por el centro responsable español a su contraparte. Excepcionalmente, también podrá contratarse a

personal docente, investigador y técnico no administrativo, en el centro español, para tareas concretas y debidamente justificadas mediante la correspondiente memoria. Las acciones integradas son definidas en un marco temporal de acción y presupuestario. Las acciones integradas serán de carácter bilateral, obligadamente recogidas por convenio interinstitucional, y deben contar con la conformidad o visto bueno de la universidad o centro de investigación contraparte iberoamericano y en su presupuesto se hará constar explícitamente los fondos que deberán ser puestos a disposición de los mismos, partiendo del hecho de que los fondos serán siempre transferidos directamente al exterior. Presentará la solicitud la universidad o centro de investigación español, a través de su representante legal.

De estos cuatro programas, el Dr. Fernández resalta el cuarto, por ser una posibilidad de lograr financiación para material fungible y equipamiento. Adicionalmente, mediante estos programas se pueden conseguir recursos para viajes de los investigadores, con el fin de conocer la contraparte extranjera y madurar la idea de un proyecto en común.

Programas de “Becas MAEC-AECID” para ciudadanos extranjeros y españoles de la convocatoria del verano 2008 y del curso académico 2008-2009

Programa II.A: Becas para Extranjeros para Estudios de Postgrado, Doctorado e Investigación en Universidades españolas y sus Centros adscritos (excepto para estudios de Lengua y Cultura Españolas –Ver Programa I.A) (Programa denominado MUTIS, para solicitantes iberoamericanos). Plazo de presentación de solicitudes: desde el día siguiente a la publicación en el BOE, hasta el 14 de enero de 2008. **Duración:** hasta un año, a partir de octubre 2008. Prorrogable hasta un segundo año más para estudios de postgrado e investigación, y hasta un tercer año final, exclusivamente para estudios de doctorado y con carácter improrrogable. En el caso de que el beneficiario hubiera iniciado el doctorado con anterioridad a la concesión de la beca, la duración total de la misma, según lo indicado, se reducirá en igual proporción al tiempo que el beneficiario llevara realizando los estudios de doctorado antes de su concesión. **Requisitos específicos:** para realizar estudios de postgrado (máster, especialización y experto), poseer título universitario superior, equivalente a licenciado español. Para realizar estudios de doctorado o investigación, poseer título universitario superior, equivalente a licenciado español, preferentemente tres años antes del momento de incorporarse al centro de estudios de destino, con perspectiva avalada de proseguir carrera docente o investigadora en universidades o centros de su país de origen al regreso. Tener la preadmisión del centro de destino. **Dotación:** para estudios en el término municipal de Madrid y de un curso académico, 600 euros mensuales, más alojamiento y

manutención en una de las dos residencias universitarias de la Fundación de Colegios Mayores MAEC-AECID (C.M. África y C.M. Guadalupe), valorados en 900 • al mes, a cargo de AECID. Para estudios fuera del término municipal de Madrid, o en caso del agotamiento de la modalidad anterior, 1.200 euros mensuales. Matrícula: hasta 2.000 euros de ayuda individual, si lo requieren los estudios para los que se concede la beca.

Programa II.B: Becas para Extranjeros para Investigaciones y Estudios de Postgrado y Especialización en Organismos Públicos Españoles y Centros Docentes No Universitarios (Programa denominado MUTIS, para solicitantes iberoamericanos). Plazo de presentación de solicitudes: desde el día siguiente a la publicación en el BOE, hasta el 14 de enero de 2008. **Duración:** Hasta un año, a partir de octubre 2008. Prorrogable, excepcionalmente, hasta un segundo año más para estudios de postgrado e investigación. **Requisitos específicos:** para realizar estudios de postgrado (máster, especialización y experto), poseer título universitario. Para realizar estudios de investigación, poseer título universitario superior, equivalente a licenciado español, preferentemente tres años antes del momento de incorporarse al centro de estudios de destino, con perspectiva avalada de proseguir carrera docente o investigadora en universidades o centros de su país de origen al regreso. Tener la preadmisión del Centro de destino. **Dotación:** para estudios en el término municipal de Madrid y de un curso académico, 600 euros mensuales, más alojamiento y manutención en una de las dos residencias universitarias de la Fundación de Colegios Mayores MAEC-AECID (C.M. África y C.M. Guadalupe), valorados en 900 • mensuales, al cargo de AECID. Para estudios fuera del término municipal de Madrid, o en caso del agotamiento de la modalidad anterior, 1.200 euros mensuales. Matrícula: hasta 2.000 euros de ayuda individual si lo requieren los estudios para los que se concede la beca.

4. Grupo Especializado de Química de Productos Naturales de la Real Sociedad Española de Química

El presidente actual es el profesor Alejandro Fernández-Bermejo, y cuenta con más de 120 miembros de 20 grupos de investigación españoles. Este grupo busca promover la ciencia básica y aplicada, apoyando la creación de empresas que aprovechen el conocimiento generado por la investigación básica; ya tienen varias empresas creadas con éxito.

Los objetivos de este grupo especializado son: a) Promover el desarrollo de la investigación en cualquier aspecto de la Química de P.N. b) Auspiciar una docencia de calidad en el área de los P.N. c) Facilitar contactos y establecer acuerdos con otros Grupos Especializados de la Real Sociedad Española de Química y otras Sociedades Nacionales e Internacionales para

facilitar la creación de redes científicas, proyectos de investigación y otras actividades científicas y docentes conjuntas. d) Promover la difusión y divulgación de resultados científicos en este ámbito de la Ciencia a través de Seminarios, Congresos, Revistas y medios de comunicación en general. e) Potenciar la transferencia de resultados científico-técnicos hacia empresas de Química interesadas en ellos. f) Facilitar la creación de nuevas empresas de base tecnológica en Química de P.N.

A través de este grupo Especializado de Química de Productos Naturales se puede acceder a información de los grupos de investigación, de sus temas de trabajo, de sus intereses y de los líderes de cada uno de ellos. El Dr. Alejandro Fernández, que es el presidente de este grupo, podrá ser la persona de contacto. Por medio de la página web de la sociedad se pueden ver los boletines de la real sociedad, donde se encuentra la información de cursos, seminarios y demás actividades de la sociedad; además se pueden ver los contratos de doctorado ofrecidos por los diferentes grupos de investigación, los cuales en muchas ocasiones se quedan sin ocupar por falta de estudiantes españoles interesados: puede ser una buena opción para estudiantes colombianos de encontrar financiación para sus estudios de doctorado. Adicionalmente, se convino que la Sociedad Colombiana de Ciencias haga los contactos con la Real Sociedad Española de Química para que se distribuya en Colombia dicho boletín.

5. Programa CYTED (<http://www.cytmed.org/>)

Se puede acceder al CYTED A través de a) Convocatoria anual de Acciones CYTED, o b) Convocatoria permanente de Proyectos de Innovación IBEROEKA

En cuanto a la primera, se puede hacer a través de a) Redes Temáticas, b) acciones de Coordinación y c) Proyectos de Investigación Consorciados

En la última convocatoria del CYTED no salió el programa de productos naturales, pero se pueden aprovechar las áreas 3 y 4. La primera busca la promoción del Desarrollo Industrial. Esta área cubre los tres sectores tradicionales de la actividad industrial: a) Industrias extractivas, b) Industrias manufactureras y c) Industrias de proceso. A su vez, y en relación con estas tres vías de participación en el Programa CYTED:

En cuanto a los Proyectos de Innovación IBEROEKA, el Programa CYTED mantiene abierta, de forma permanente, una convocatoria de solicitudes para la certificación de proyectos de innovación, basados en la cooperación científica y tecnológica de empresas e instituciones iberoamericanas. El primer paso para acceder a la certificación de un proyecto de innovación se inicia con el contacto con la Red de Organismos Gestores IBEROEKA a

través de la página Web del Programa CYTED, y más en concreto con el coordinador o coordinadores designados por cada país. Se tienen en cuenta los siguientes campos: las materias primas y otros insumos involucrados, y los procedimientos empleados en la transformación de tales materias primas, donde los productos naturales tienen cabida. El área 4, Desarrollo Sostenible, Cambio Global y Ecosistemas, cuyo objetivo es promocionar el desarrollo de los recursos naturales y culturales, alimentación, salud, biodiversidad, medio ambiente y recursos energéticos limpios, de forma que se atiendan las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de Iberoamérica.

6. Fundación Carolina

Ofrece becas para posgrado en universidades españolas, que hayan aceptado ese sistema de becas. La información está disponible en la página web de la fundación y en Colciencias.

B. Programas de apoyo con la Unión Europea

1. Séptimo programa marco Europeo FP7

Busca generar redes de excelencia y puede ser intrincada la burocracia. Se deben presentar grupos de excelencia de Colombia, a través de un líder europeo de excelencia. Hay pocos líderes identificados en España con posibilidad de liderar en el FP7, por ejemplo el Dr. Francisco Antonio Macías (alelopatía) y algunos grupos que trabajan en vinos. Inicialmente el programa exige solo una pequeña documentación, y el proyecto, si se pasa (que es muy difícil), se debe anexar el resto del papeleo que es mucho y complejo. En Colciencias el contacto es la Dra. Sara Araujo y el Dr. Carlos Mauricio Nupia.

2. Redes COST

No tienen límite en participantes y pueden convertirse en acciones FP7; ya se generó (y finalizó) una en productos naturales como fuente de medicamentos, y ahora se busca una en principios bioactivos. Buscar meterse en las redes de las acciones COST (redes temáticas formativas). Se espera que a través de la real sociedad española de ciencias se puedan generar membresías y vínculos con las redes COST.

3. Programa Alfa y Aban

Son apoyos y becas de alto nivel y muy competidos; sin embargo, en la actualidad no están vigentes, probablemente esperando la decisión que se tome en el FP7.

C. Programas de apoyo con México

CONACYT. Programa de Cooperación Internacional: Multilateral

¿Qué es? Debido a la variedad de disciplinas y modalidades de cooperación que ofrece cada uno de los organismos internacionales, se ha establecido, en cada caso, una forma de colaboración específica que permite la canalización de recursos a instituciones mexicanas de investigación y la comunidad científica y tecnológica del país.

Objetivo. Vincular, difundir, promocionar la participación de expertos mexicanos en las actividades que brindan los diversos programas y organismos multinacionales. **Beneficios del Programa.** Financiamiento de proyectos; intercambio de investigadores; participación en cursos, premios; participación en foros de política científica y tecnológica; establecimiento de relaciones con grupos de investigación o instituciones homólogas que permitan a los científicos mexicanos mantenerse actualizados en su área de trabajo; redes de investigación sobre ciencia y tecnología.

¿A quién va dirigido? Comunidad científica y tecnológica nacional. Comunidad científica y tecnológica internacional. Instituciones de educación superior nacional. Instituciones de educación superior extranjeras.

¿Cómo acceder al apoyo? La información necesaria para acceder a los programas de cooperación multilateral se encuentra en las convocatorias de cada uno de los organismos multilaterales.

¿A quién contactar para mayor información? Subdirección de Organismos Multilaterales y Estrategia de Cooperación. Av. Insurgentes Sur 1582 Primer Piso, Ala Norte. Crédito Constructor, 03940 Del. Benito Juárez. Conmutador: (+52) 55 5322-7700. Fax: (+52) 55 5322-7647. Lic. Clara Morán Andrade. Subdirectora de Organismos Multilaterales y Estrategias de Cooperación. Correo electrónico: cmoran@conacyt.mx

D. Programas de apoyo con Brasil

1. Programas con el PEG-PG

Ofrece becas para que extranjeros estudien en Brasil, los cuales deben pasar el examen de portugués, y aplicar a programas de posgrado bien calificados en el Brasil. Para lo anterior el candidato debe ponerse en contacto con profesores brasileños (las hojas de vida se pueden consultar en la página del CNPq), y puede consultar las páginas Web de las universidades (federales en especial). La información de las becas, y el proceso mismo,

están centralizados a través de la embajada del Brasil en Bogotá, que tiene una oficina encargada de todos estos asuntos.

2. Prosul

Patrocina la cooperación entre grupos de países latinoamericanos, con el liderazgo de un grupo del Brasil. En la Universidad Nacional de Colombia se han tenido experiencias exitosas al respecto.

3. CABIO

Cooperación en el área de la biotecnología entre Brasil-Argentina-Colombia. En la Universidad del Valle se han tenido experiencias exitosas al respecto.

4. CNPq Colciencias

Ofrecen la posibilidad de proyectos de investigación en conjunto, y de financiación de movilidades. Información página de Colciencias.

También se puede optar a plazas de posdoctorado, que se pueden conseguir con relativa facilidad, tanto a realizar en el Brasil, por parte de colombianos, como en Colombia, por parte de brasileños. Las becas para doctorado son muy competidas, aunque en el campo de los productos naturales no hay tanta competencia y se pueden conseguir con menos dificultad.

F. Intercambio con CANADÁ

Los gobiernos locales de cada provincia en Canadá tienen apoyos específicos para investigación, en el caso de la Provincia de la Isla del Príncipe Eduardo se ha seleccionado la biotecnología (conversión de compuestos naturales en productos industriales, por ejemplo drogas, cosméticos, nutraceuticos, etc.) como una de las áreas de interés para financiar proyecto de investigación. En estos proyectos de investigación deben participar tanto el sector académico como el industrial, y deben contar con el liderazgo de grupos y empresas canadienses además de los participantes extranjeros (por ejemplo Colombia). Inicialmente, el profesor R. Kerr propuso a los grupos de PNM de las Universidades Nacional de Colombia, Córdoba, Cauca y Valle, e INVEMAR, participar en un proyecto académico-empresarial, el cual tomará forma después de que cada una de las instituciones de los participantes firme la carta de intención.

E. Programas de movilidad al interior de Colombia

Como punto más relevante se vio la necesidad de consolidar un directorio nacional de grupos e investigadores en productos naturales, en el que se haga referencia a los intereses, productos que puede ofrecer cada grupo (por ejemplo bioensayos, clasificación de organismos, etc.), equitación y expectativas de éstos.

Entre las universidades públicas y algunas privadas existen convenios de cooperación y movilidad que no son muy funcionales, estos ofrecen la posibilidad de hacer cursos y parte de la investigación en otra universidad; lo primero se ha llevado a cabo con algún éxito pero lo segundo ha presentado mayores problemas, en especial por los seguros médicos de los estudiantes o investigadores que hacen la pasantía en otra universidad. Adicionalmente, se presenta el problema de la financiación de la pasantía, que usualmente es asumida por la universidad receptora; se propone que Colciencias genere una bolsa común como apoyo inicial a estas movilidades al interior del país, al igual que la generación de becas de movilidad al interior del país; no obstante, se mencionó que ésta no es una decisión autónoma de Colciencias y que debe ser consultada con el Banco Mundial, quien juzgará su conveniencia. Se propone que se diseñen políticas que hagan más funcional el programa, haciendo más visibles los programas existentes.

Adicionalmente, se mencionó la existencia del Programa Sígueme (sistema interinstitucional de un grupo de universidades encaminado a la movilidad estudiantil) que permite la movilidad de estudiantes de pregrado. La información se puede consultar en la página web www.unal.edu.co/dirnalpre/sigueme, y cada universidad debe tener una oficina encargada de este asunto. Se propone aprovechar esta experiencia y ampliarla a los estudiantes de posgrado. Finalmente, y apoyados en la experiencia de Brasil, se propone la creación de un sistema similar a “Las becas de iniciación científica del CNPq” con el fin de patrocinar las pasantías de estudiantes de pregrado en los grupos de investigación, y de esta manera motivarlos, entrenarlos y así iniciarlos en la investigación científica. Lo anterior teniendo en cuenta que los estudiantes de pregrado, en muchas de las universidades colombianas, para obtener el título tienen la posibilidad de realizar pasantías en la industria, monografías, curso de posgrado, además del trabajo de grado tradicional que en el pasado los iniciaba en la investigación.

Finalmente se identifican las siguientes instituciones o páginas web donde se puede consultar información sobre becas al extranjero: [feeblist](http://feeblist.org), [scholarshipnet](http://scholarshipnet.org) y [fundaciónbeca](http://fundaciónbeca.org).

Conclusiones

1. Se hizo evidente la necesidad de crear un directorio de investigadores en productos naturales, que haga visible sus fortalezas e intereses, y que permita el contacto entre los diferentes grupos. Este trabajo inicial apuntará a la formación de una red en productos naturales, que abarque a todas las disciplinas y profesiones que toquen estas temáticas; por ejemplo: biología, química farmacéutica, ciencias biomédicas, química, etc., de tal manera que se consiga un enfoque multidisciplinar, donde el profesional de cada disciplina haga lo que mejor sabe hacer, sin repetir esfuerzos por parte de otros profesionales.
2. Se identificaron los programas de cooperación internacional en investigación con los países participantes en este seminario.
3. Se estableció la necesidad de tener contactos con grupos extranjeros que trabajen en productos naturales para poder acceder a la financiación ofrecida por España, Brasil, Canadá, México y la Unión Europea. Una fuente importante de información al respecto es el grupo especializado de productos naturales de la Real Sociedad Española.
4. Se deben desarrollar estrategias por hacer que la movilidad entre los grupos nacionales sea funcional, pues si bien ya existen programas a nivel nacional (por ejemplo Sígueme o convenio U. Nacional-U. Andes y U. Javeriana), estos enfrentan problemas de visibilidad, financiación y claridad en cuanto a seguros médicos.

Fortalecimiento de programas doctorales. Recursos disponibles. Necesidades y nuevos retos

El Dr. Carlos Corredor recordó que en las facultades de ciencias se planteó la necesidad de realizar cursos de posgrado compartidos por las universidades bogotanas (y nivel de cada ciudad), a saber: U. Nacional de Colombia, U. de los Andes y U. Javeriana, con el fin de simplificar esfuerzos de profesores y logísticos por parte de las universidades. Los cursos deben ser compartidos por los profesores de las universidades participantes de tal manera que se aprovechen al máximo los saberes de cada uno de ellos, y no se dupliquen esfuerzos. El Dr. Corredor se encargará de recordar a las facultades de ciencias este convenio, y tratar de hacerlo funcional.

Grupo 3. Fortalecimiento de programas doctorales. Recursos disponibles. Necesidades y nuevos retos. Una agenda a cinco años

Integrantes de la mesa redonda
Coordinadora: Elena Stashenko
Relatora: Catalina Arévalo-Ferro

Asistentes:

- Carlos Corredor es director del postgrado en ciencias biológicas de la facultad de ciencias de la Universidad Javeriana.
- Luis Enrique Hernández es profesor de cátedra de la Universidad del Tolima, es especialista en química de productos naturales y trabaja en antiparasitarios. Su carrera es licenciatura en Biología y Química y luego especialización en química productos naturales.
- Giovanni Garavito, profesor del departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.
- Juan Carlos López, licenciado en química de la Universidad Pedagógica (Bogotá). Hizo la especialización en química de productos naturales en la Universidad del Tolima. Trabaja en líquenes, productos naturales.
- Eduardo Martínez Maure es director del programa en química de la Universidad del Atlántico.
- Edison Varón es biólogo de la Universidad del Tolima, está investigando en productos naturales en esa universidad y se va a España a hacer su doctorado.
- John Jairo Méndez es director de investigaciones de la Universidad del Tolima, trabaja con el grupo de investigación de productos naturales.
- John Jairo Rojas es estudiante de la maestría ciencias biológicas de la Universidad Javeriana, es licenciado en química y trabaja en un colegio creando un proyecto para que los estudiantes tengan acceso al conocimiento de la química de productos naturales.
- Ricardo Gaitán Ibarra es químico farmacéutico de la Universidad de Cartagena, es doctor en química medicinal y dirige el postgrado de ciencias farmacéuticas. Trabaja en el grupo de productos naturales con plantas y productos marinos (esponjas) y en síntesis de productos naturales.

- Jorge Eliécer Robles es director del departamento de química de la facultad de ciencias de la Universidad Javeriana.
- Hebelin Correa es estudiante de doctorado en ciencia química de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional. Trabaja en el grupo de productos naturales marinos.
- Hernando Sánchez es investigador en productos naturales y actual subdirector de Colciencias.
- Gloria González es profesora de la Universidad de la Sabana de la Facultad de Ingeniería, trabaja en ingeniería de alimentos.
- Herlide Prieto es química de la Universidad Nacional y tiene maestría en ciencias bioquímicas.
- Olga Lucía Hoyos, profesora de la Universidad del Cauca. Es licenciada en química de la Universidad del Valle, trabaja en alimentos y productos naturales en la Universidad del Cauca.
- Susana Fiorentino, Departamento de Microbiología de la Universidad Javeriana.

Introducción

La mesa redonda contó con la participación constante de 15 asistentes mínimo.

Los programas de doctorado en química en el país se iniciaron con el de la Universidad Nacional, luego siguieron la UIS, la U. del Valle, la U. de Antioquia. Posteriormente se crearon doctorados en otras áreas que se relacionan con los productos naturales como el de ciencias biomédicas de la U. Javeriana, y otros más. En el momento tenemos más de 50 egresados en los 10 a 20 años transcurridos.

Las premisas para iniciar estos programas doctorales fueron fundamentalmente dos:

1. Los estudiantes que realizan su doctorado en otros países y trabajan en proyectos propios de esos países, inevitablemente están resolviendo los problemas de países extranjeros en lugar de trabajar resolviendo los problemas específicos de Colombia. Ir al exterior es un buen ejercicio académico en el que se aprende a resolver problemas puntuales; es necesario que esos estudiantes apliquen esa experiencia en problemas nacionales (enfermedades tropicales, biodiversidad, etc).

Adicionalmente, al regresar al país, después de un largo periodo de tiempo, se quiere continuar con la línea de investigación en la que se invirtió el tiempo de un doctorado y no pensar en problemas nuevos, de esta forma se prolonga la investigación en líneas planteadas con los intereses de otros países.

2. Doctorados por periodos largos fuera del país conducen al regreso de personas desarraigadas que se enfrentan abruptamente con los problemas de investigación de nuestro país, burocracia, falta de reactivos a tiempo, tiempos de espera largos, resultados postergados, etc. Es necesario tener entrenamiento en otros países, entrenamiento en tecnologías de punta, por ejemplo; esto se fortalece con las pasantías de periodos cortos. Sin embargo, es importante que los estudiantes de doctorado conozcan las posibilidades nacionales para trabajar en su área, por esta razón deben realizarse también pasantías dentro del país. El trabajo de los doctorantes debe quedarse en Colombia y Colombia debe tener doctores propios.

El número de grupos a nivel nacional que están trabajando en productos naturales es de 20: Universidad Nacional 5, Universidad Industrial de Santander 1, Universidad de Antioquia 2, Universidad Javeriana 2, Universidad del Atlántico 1 (no lo encontramos en base de datos), Universidad de Cartagena 2 (no lo encontramos en Colciencias), Universidad de Sucre 1, Universidad Tecnológica de Pereira 2, U. Tecnológica del Chocó 1, Universidad del Cauca 2, Universidad del Tolima 1, Universidad de Caldas 1.

Y en formación hay grupos de PN en Yopal, Florencia y Leticia.

Otro punto importante que se debe tener en cuenta para el fortalecimiento de doctorados son las áreas de investigación prioritarias para Colombia, definidas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Son 8: Nuevos materiales, *Biotecnología y agroindustria, *Biodiversidad, *Enfermedades tropicales, Telecomunicaciones (call centers), Energía y minería (petróleo, minerales, oro, carbón) y resolución de conflicto armado. Entre estas áreas el tema de productos naturales está abarcado en tres: *Biotecnología y agroindustria, *Biodiversidad, *Enfermedades tropicales, con lo cual la investigación que hacemos puede entender el 37,5%.

La discusión que se llevó a cabo en la mesa cubrió las siguientes preguntas postuladas en la primera reunión:

- ¿Cómo podemos mantener el esfuerzo de formación de investigadores dentro del país?

- ¿Se considera estratégico crear un doctorado en PN?
- ¿Es estratégico determinar áreas de interés prioritario?
- ¿Cómo resolver el problema de infraestructura para formar doctores y para recibir doctores formados?
- ¿Cuándo vamos a saturar el mercado de doctores?
- ¿Cómo influir en la relectura, modificación o discusión de la Ley de Ciencia y Tecnología y de los decretos que conciernen a la creación de programas doctorales?

Discusión

La conclusión primaria a la que se llega cuando se habla del fortalecimiento de doctorados es la de aumentar la partida económica que los apoya. Para esto es importante mirar el apoyo que otras entidades, además de Colciencias, pueden dar para el fortalecimiento de estos programas. Otras entidades que financian tanto infraestructura como estudiantes de doctorado son el Ministerio de agricultura, el Ministerio de educación y entidades privadas como la Mazda, Loreal, la Fundación Carolina, la Agencia Española de Cooperación e Investigación, entre otras.

Una propuesta importante que se debe hacer es proponer a entidades como Colfuturo y el ICETEX que no solamente financien doctorados fuera del país, esto ayudaría a mantener el desarrollo de la investigación enfocada a los problemas nacionales. Colciencias financia y fomenta doctorados con convocatorias anuales, actualmente hay convocatorias abiertas para financiar estudiantes dentro o fuera del país, el monto disponible en esta ocasión es de \$18.531.000.000. Así mismo se financia infraestructura, el monto disponible en esta ocasión es de \$12.680.000.000; sin embargo, la mayor parte de la financiación de infraestructura la cubren los proyectos propuestos por los grupos de investigación que tienen la capacidad de graduar doctorantes. Un aporte importante que fue discutido para la solución de la falta de recursos que apoyen la investigación es la necesidad de fortalecer la consecución de capitales de riesgo.

El problema de la infraestructura se extiende, no sólo a los estudiantes de doctorado que la necesitan para desarrollar su investigación, sino a los doctores graduados que regresan al país o se gradúan de nuestros programas y no tienen un laboratorio donde establecerse. Este punto debe ser tenido en cuenta en un futuro muy próximo para poder cumplir con los requerimientos propuestos por CONACES (que pretende que al año 2017 todos los profesores tengan títulos de doctorado).

Otras propuestas de fortalecimiento son el uso y creación de convenios entre universidades que no tienen programas de doctorado con universidades que ya tienen experiencia en estos programas. Así mismo establecer movilidad entre grupos de PN para hacer parte de las pasantías de los doctorados. Es importante reiterar que la creación de convenios internos en el país promoverá el aprovechamiento de nuestra infraestructura. Para esto es necesario hacer la red de grupos nacionales en productos naturales.

Se discutió si la creación de un doctorado en PN fortalecería nuestra área; la conclusión de los participantes fue que no sería estratégico. Hacer un programa solo en Productos Naturales es especializar demasiado los campos de acción y no cumple con el objetivo de abrir el ejercicio académico de formar mentalidades que permitan resolver problemas de investigación. Hay otros doctorados en los que deben fortalecerse las diferentes áreas de investigación en PN. A estas áreas pueden ir estudiantes de doctorados en química, medicina, bioquímica y otros. Actualmente hay propuesta de un doctorado en ciencias del mar coordinado por varias universidades; este doctorado incluye todas las áreas relacionadas, desde economía de zonas costeras hasta microorganismos extremófilos. La línea de PN en este doctorado será muy importante.

Se discutió asimismo la estrategia de contratar investigadores para hacer postdoctorados que apoyen a grupos de investigación. Con este punto se fortalece la red de investigación interna en los grupos. El postdoctorante apoya al doctorante y este a su vez al estudiante de maestría que apoya a los estudiantes de pregrado.

El siguiente tema abordado en la discusión fue la definición de nuestras áreas de fortaleza con las que se atenderán las tres áreas prioritarias de las ocho que fueron definidas para el país. Es necesario proponer y definir en que somos fuertes en estos cuatro campos:

- Productos naturales de valor agregado, cadenas productivas y de valor.
- Compuestos bioactivos: aislamiento, análisis, caracterización, hemisíntesis.
- Etno-farmacología y bio-prospección.
- Bio-actividad.

Un punto álgido para la articulación tanto de consecución de recursos, como de funcionalidad en la investigación, es proponer una lectu-

ra profunda a la Ley de Ciencia y Tecnología para disminuir los trámites burocráticos para la legislación para importación de materiales y equipos y la devolución del IVA a programas de postgrado y no solo a proyectos.

Conclusiones

1. No se recomienda la creación de un programa de doctorado en PN sino el fortalecimiento de las líneas de investigación en esta área.
2. Fortalecer el intercambio de estudiantes doctorales e investigadores entre grupos nacionales.
3. Crear una red de grupos de investigación en productos naturales
4. Búsqueda de financiación de infraestructura y ayuda a estudiantes doctorales independiente de Colciencias.
5. Se proponen cuatro áreas fuertes de investigación en PN

Agenda

1. Crear una red de grupos de investigación en productos naturales.
2. Hacer un censo para saber cuándo saturaremos el mercado para doctores.
3. Hacer una plataforma de equipos, métodos y servicios para disponibilidad de los grupos pertenecientes a la red.
4. Unificar metodologías específicas para facilitar el tránsito de muestras y resultados.
5. Iniciar la movilidad de los estudiantes, la codirección de tesis, las pasantías y las posibilidades de doctorados sándwich entre universidades colombianas.
6. Crear bases de datos disponibles para la red.
7. Agilizar trámites de permisos de colecta, acceso a producto derivado y acceso a recurso genético.
8. Fomento de semilleros con desarrollo de proyectos en enseñanza de la ciencias en el área de PN.

PRINCIPALES ACUERDOS

Tema 1

1. Se debe incluir el tema de gestión y administración de proyectos en los programas de ciencias de las universidades nacionales.
2. COLCIENCIAS debería promover y apoyar el fortalecimiento de la capacidad de las instituciones del sistema de ciencia y tecnología nacional en la gestión y administración de macroproyectos nacionales e internacionales.
3. El país debe hacer una mayor inversión en investigación en Ciencias Básicas ya que es una prioridad per se y un pre-requisito para desarrollar investigaciones aplicadas e intervenciones de impacto en las enfermedades endémicas. Se recomienda a los organismos pertinentes el hacer convocatorias específicas para proyectos de investigación básica en salud.
4. El país debe desarrollar políticas que promuevan y prioricen el desarrollo de medicamentos y vacunas para enfermedades endémicas que permitan el ordenamiento y concentración de los esfuerzos de diversas instituciones con capacidades para aportar al desarrollo de productos.
5. Es necesario que los investigadores tomen en cuenta que el desarrollo de productos requiere fomento de capacidades desde investigación estratégica hasta ensayos pre-clínicos y clínicos, producción y buenas prácticas.
6. Se destaca la importancia de establecer políticas nacionales de salud para la generación de consorcios dirigidos hacia el desarrollo de productos (Pruebas diagnósticas, fármacos y vacunas) para las ETV y zoonosis. Los grupos/entidades podrían trabajar en diferentes etapas del desarrollo de los productos con el apoyo del Ministerio de Protección Social en la evaluación y regulación de los productos. Tales políticas orientarían la búsqueda de conocimiento y capacidad tecnológica hacia la generación de un producto a partir de la investigación básica. Las universidades y otras instituciones apoyarían la formación de recurso humano y desarrollarían componentes específicos en la generación de conocimiento y productos.
7. Se debe desarrollar la capacidad de Gestión del Conocimiento (Una prioridad del Plan Nacional de Salud) que optimiza el flujo de información con el fin de tomar decisiones basadas en evidencia. Una medida factible a corto plazo es la consulta y comunicación permanente entre autoridades de salud pública y la comunidad científica mediante:
 - a. Acceso de bases de datos estadísticos de indicadores de salud.
 - b. La convocatoria y participación de investigadores, instituciones profesionales biomédicas y de salud, con el conocimiento pertinente en la toma de decisiones técnicas y políticas específicas.
 - c. El fortalecimiento del diagnóstico y el informe de casos desde los municipios.
 - d. Comunicación pro-activa de los representantes de Sociedades profesionales biomédicas y de salud nacional (ACIN, Sociedad

- Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical, entre otros) con la Dirección de Salud Pública del Ministerio de Protección Social.
8. Es absolutamente prioritaria la identificación y desarrollo de fármacos a partir de productos naturales para el tratamiento de zoonosis y ETV endémicas.
 9. Es fundamental la interacción entre grupos nacionales, pues en muchos de los casos nuestros resultados dependen de interacciones con grupos en el exterior que requieren aun más tiempo y esfuerzos, desaprovechando el potencial de otros grupos de investigación nacionales. Un claro ejemplo de esto es la necesidad de realizar ensayos de actividad biológica en el exterior, mientras que algunos de estos ensayos han sido implementados de manera satisfactoria por otros grupos en nuestro país.
 10. Se debe crear la red temática en productos naturales que incluya a todos aquellos grupos de investigación dedicados al tema o que tengan algunas de sus líneas de investigación relacionadas a los productos de origen natural, aquellos que hacen tanto la obtención de extractos, el aislamiento, la elucidación estructural, la síntesis, biotecnología, aquellos que buscan su aplicabilidad con fines terapéuticos, en la industria de alimentos, colorantes, recubrimientos, productos veterinarios, cosméticos, agroindustria y otros campos que por motivos de espacio, mas no de importancia, no mencionaremos en este momento. Dentro de sus funciones también estaría el organizar y difundir la programación de seminarios y cursos de actualización y capacitación en temas como la biología molecular como herramienta en Productos Naturales, técnicas de elucidación estructural de alta sensibilidad, derreplicación, biotecnología, bioinformática, filogenética, nuevas técnicas analíticas LC, LC-MS, LC-MS-NMR, cursos en técnicas de cultivo, así como cursos acerca de bioensayos.
 11. Promover la difusión de nuestros hallazgos en revistas nacionales tales como: Revista de Productos Naturales, una revista electrónica de libre acceso, sin dejar por eso de publicar en revistas extranjeras de alto impacto.
 12. Se deben establecer convenios marco entre universidades que tengan grupos trabajando en la misma área del conocimiento con el objeto de maximizar las posibilidades de investigación.
 13. Se debe establecer una agenda para la bioprospección de ecosistemas no tradicionales: páramos, desiertos, la selva húmeda, suelos, el mar, como fuentes poco exploradas o incluso inexploradas de diversidad biológica y metabólica.
 14. Es importante reconocer que se debe impulsar el estudio de la ecología terrestre (estudio de relaciones aleloquímicas planta-planta, planta-insecto, insecto-insecto para el control de plagas).
 15. Se deben continuar los trabajos en Fitoquímica, Farmacognosia, que además de su compromiso con la generación de conocimiento ayuden a fortalecer las relaciones con otras entidades del Estado como el Invima

y el Ministerio de Protección Social. Estos esfuerzos conjuntos entre los investigadores y el Estado se deben orientar hacia la generación de normas técnicas, de validación de procesos y productos, capacitación de los funcionarios de las entidades, convenios para la realización de ensayos y análisis en el laboratorio, control y aseguramiento de calidad de productos naturales, agrandar el vademécum, impulsar el conocimiento de nuestras plantas medicinales, generar normatividad en cuanto al cultivo y manejo de las plantas y realicen el desarrollo de productos fitoterapéuticos. También se ha mencionado la necesidad de iniciar con una lista de plantas tóxicas de Colombia.

16. Se deben impulsar estudios en nuevas aplicaciones de los productos naturales: saborizantes, aromas, antioxidantes, medicinas veterinarias, acaricidas, insecticidas, buscando aplicaciones industriales y pensando en la promoción de la producción agrícola orgánica.
17. Se debe establecer una red de laboratorios capaces de ofrecer servicios de bioensayos contra enfermedades prioritarias para la nación y otras aplicaciones industriales.

Tema 2

1. Hay muchas oportunidades de obtener financiación a través de cooperación internacional. Se identificaron muchos de los programas que se socializarán a través de ACOFACIEN.
2. Se propone ofrecer becas de iniciación científica del tipo de las del CNPq con el fin patrocinar pasantías de estudiantes de pregrado en grupos de investigación.
3. Se debe crear un directorio de investigadores en productos naturales y en Parasitología, que haga visible sus fortalezas e intereses, y que permita el contacto entre los diferentes grupos.

Tema 3

Los principales problemas identificados para la formación doctoral:

1. Carencia de becas adecuadas (no becas-crédito) suficientes para los doctorados.
2. Poca oferta de programas en Colombia. Los cupos de doctorado son pocos, solo se acepta a los estudiantes cuyos directores de tesis tengan la posibilidad de tener dinero para la investigación, donde también es difícil la consecución de fondos.
3. Falta de política estatal sobre formación de doctorados.
4. Falta de reconocimiento social a las personas con formación doctoral, dificultad en la consecución de empleo y de recursos para iniciar una línea de investigación.
5. Falta de madurez y consolidación de los programas existentes en Colombia.

6. Hace falta incluir en los programas de formación doctoral herramientas gerenciales, que le faciliten al futuro doctor la creación o consolidación de su grupo de investigación, la consecución y el manejo de recursos.
7. No hay mecanismos para fomentar transferencia de conocimiento y tecnología desde la investigación en parasitología o productos naturales hacia la empresa, hacia las entidades estatales encargadas de programas de salud pública y hacia la sociedad.
8. Los estudiantes que realizan su doctorado en otros países y trabajan en proyectos propios de esos países, inevitablemente están resolviendo los problemas de países extranjeros en lugar de trabajar resolviendo los problemas específicos de Colombia.
9. Doctorados por periodos largos fuera del país conducen al regreso de personas desarraigadas que se enfrentan abruptamente con los problemas de investigación de nuestro país.

Se propone:

1. Formación de una comisión de alto nivel para plantear la problemática, con propuestas de soluciones, ante las entidades estatales directamente relacionadas: Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Educación, Colciencias, ICETEX, etc.
2. Creación de programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
3. Hacer un inventario de los programas de doctorado existentes actualmente en biología y ciencias biomédicas y evaluar en cuántos de ellos se realizan estudios específicamente en las áreas de parasitología o entomología.
4. Difundir a través de las asociaciones científicas nacionales información sobre programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
5. Establecer los mecanismos necesarios para concienciar y sensibilizar a la sociedad y a la empresa, de la necesidad de una formación especializada con el máximo grado académico de doctores en parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
6. Fortalecer la participación en redes nacionales e internacionales de investigación.
7. Establecer consensos para unificar criterios de estructuración de programas doctorales.
8. Buscar mecanismos que permitan agilizar la validación de títulos de doctorado obtenidos en el extranjero.
9. Crear estímulos para el mejoramiento continuo de la calidad de los programas doctorales.
10. Promover jornadas científicas con la participación de las entidades estatales y de la empresa para divulgar los resultados de los trabajos de investigación y discutir su eventual aplicabilidad.

CONCLUSIONES GENERALES

Una revisión de las relatorías de los diferentes grupos permite identificar aspectos importantes compartidos y que son cruciales en el desarrollo y fortalecimiento de políticas de salud pública que aboquen el problema de las enfermedades tropicales transmitidas por vectores. Estos son los más significativos:

En cuanto a investigación

1. Es importante que el país y los demás países hagan inversiones significativas en ciencias básicas que permitan entender la historia natural, la genética y las vías de difusión tanto de los parásitos como de los vectores.
2. Se requiere la formación de personal con especialización en gestión de la financiación de proyectos y su administración. Esta no es la labor del investigador.
3. Es fundamental el desarrollar vacunas que prevengan la enfermedad y hacer los estudios clínicos pertinentes en nuestros países
4. Es prioritario incrementar la investigación en productos naturales promisorios para el tratamiento de enfermedades tropicales y llevar a cabo todas las fases de la investigación no sólo básica sino clínica en nuestros países. Los grupos fueron reiterativos en afirmar que los costos de la investigación clínica en nuestros países son una fracción del costo de dicha investigación en los países avanzados y que se puede hacer con los mismos criterios de calidad.
5. Es urgente establecer políticas nacionales de salud para la generación de consorcios dirigidos hacia el desarrollo de productos (Pruebas diagnósticas, fármacos y vacunas) para las ETV y zoonosis con el apoyo del Ministerio de Protección Social en la evaluación y regulación de los productos que orienten la búsqueda de conocimiento y capacidad tecnológica hacia la generación de un producto a partir de la investigación básica.
6. Se debe desarrollar capacidad de Gestión del Conocimiento para optimizar el flujo de información que permita tomar decisiones basadas en evidencia. Este desarrollo pasa por:
 - a. Acceso de bases de datos estadísticos de indicadores de salud a la comunidad científica.
 - b. Participación de investigadores y de asociaciones e instituciones científicas con el conocimiento pertinente en la toma de decisiones técnicas y políticas específicas.
 - c. El fortalecimiento del diagnóstico y el informe de casos desde los municipios.

- d. Comunicación pro-activa de los representantes de Sociedades profesionales biomédicas y de salud nacional (ACIN, Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical entre otros) con la Dirección de Salud Pública del Ministerio de Protección Social.
7. Es fundamental establecer redes de investigadores tanto entre universidades e instituciones colombianas, como entre éstas y sus contrapartes extranjeros. Estas redes deben comenzar por permitir intercambio de investigación, de investigadores y de estudiantes de posgrado para llegar a presentar propuestas compartidas a agencias financiadoras tanto nacionales como internacionales. Estas redes deben incluir tanto a parasitólogos como a científicos especializados en productos naturales. Existen diferentes medios de financiación, pero es necesario que haya un gestor de estas actividades, que bien podría ser ACOFACIEN con el apoyo y participación de las asociaciones de investigadores en estos campos.
8. Se debe fortalecer el estudio de relaciones aleloquímicas planta-planta, planta-insecto, insecto-insecto para el control de plagas y proponer acciones específicas de control a partir de los resultados.
9. Se deben continuar los trabajos en Fitoquímica y Fitofarmacognosia, que además de su compromiso con la generación de conocimiento ayuden a fortalecer las relaciones con otras entidades del Estado como el Invima y el Ministerio de Protección Social. Los esfuerzos conjuntos entre investigadores y el Estado deben incluir la generación de normas técnicas, validación de procesos y productos, capacitación de los funcionarios, convenios entre laboratorios para la realización de ensayos y análisis, control y aseguramiento de calidad de productos naturales, impulsar el conocimiento de nuestras plantas medicinales, generar normatividad en cuanto al cultivo y manejo de las plantas y desarrollo de productos fitoterapéuticos.
10. El estudio de los Productos Naturales no se debe circunscribir a la actividad terapéutica, sino que se deben impulsar estudios en nuevas aplicaciones tales como: saborizantes, aromas, antioxidantes, medicinas veterinarias, acaricidas, insecticidas, buscando aplicaciones industriales pensando en producción agrícola orgánica.

En cuanto a financiación

1. Existe un número importante de agencias que financian investigación interdisciplinaria en redes internacionales. Se identificó un número importante de ellas.
2. Es necesario tener un mecanismo a nivel regional y nacional que pueda iniciar contactos entre posibles participantes en redes y las agencias financiadoras.

En cuanto a formación doctoral

1. Los programas de doctorado en Colombia son muy incipientes y están muy mal financiados.
2. Se requieren becas de sostenimiento para todos los estudiantes, porque el número de becas de Colciencias no es suficiente, y financiación a largo plazo para asegurar que la investigación del estudiante llegue a feliz término.
3. Es necesario que los programas existentes se unan para lograr optimizar el número de tutores y las oportunidades de trabajo experimental en diferentes laboratorios
4. Es necesario identificar los programas de doctorado que tienen temas de parasitología y de productos naturales y tener un inventario de los mismos.
5. Es necesario hacer cursos regionales con apoyo internacional para entrenamiento y actualización en Parasitología y Productos Naturales.

En términos generales, las conclusiones de los grupos se pueden resumir diciendo que en cada uno de los temas se encontraron grandes problemas que inciden sobre la investigación, pero se propusieron ideas novedosas para el próximo futuro. Se reconoció el avance que se ha dado en la investigación básica que permitirá diseñar no sólo tratamientos sino posibles vacunas para malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis y se formularon redes iniciales de cooperación entre grupos que están abordando temas como la genética de los microorganismos y su difusión y aquellos que están estudiando metabolitos secundarios útiles. Estas redes incluyeron las posibilidades de intercambiar estudiantes de doctorado y de investigadores para cursos y para pasantías. Se analizaron las fuentes de financiamiento para estudiantes de doctorado y se propuso la importancia de determinar las necesidades del país en cuanto a doctores en general y en las áreas del seminario en particular. Se analizaron las diferentes fuentes de financiamiento para estudiantes doctorales y se decidió presentar propuestas específicas a COLCIENCIAS y a los Ministerios de Protección Social y de Educación. Se analizó el problema de las patentes de productos farmacéuticos basados en productos naturales y se propuso que la investigación en las fases clínicas se pueda hacer en Colombia, con lo que se disminuirían significativamente los costos y permitirían que la industria colombiana pudiera participar efectivamente en este campo. Se identificó el campo de los productos naturales como fuente de fármacos para el tratamiento de zoonosis y enfermedades transmitidas por vectores. Finalmente se analizó el hecho de que los investigadores se conocen a través de las redes temáticas, pero frecuentemente no conocen los otros grupos de su propia universidad y país que permitan, como en el caso del Seminario, hacer investigación interdisciplinaria.

AGENDA PARA LOS PRÓXIMOS CINCO AÑOS

Tema 1. Prioridades de investigación y fuentes de financiamiento

1. El país debe hacer una mayor inversión en investigación en Ciencias Básicas ya que es una prioridad per se y un pre-requisito para desarrollar investigaciones aplicadas e intervenciones de impacto en las enfermedades endémicas. Se recomienda a los organismos pertinentes el hacer convocatorias específicas para proyectos de investigación básica en salud.

Estrategia. Formación de una comisión de alto nivel para plantear la problemática, con propuestas de soluciones, ante las entidades estatales directamente relacionadas: Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Educación, Colciencias, ICETEX, etc. ACOFACIEN liderará una propuesta al respecto y deberá constituirse a más tardar a fines de 2009.

2. Para mejorar la capacidad de investigación en investigación se debe incluir el tema de gestión y administración de proyectos en los programas de ciencias de las universidades nacionales.

Estrategia. Se presentará a la próxima reunión de decanos de ACOFACIEN en marzo de 2009 una propuesta para que se incluya este tópico en las carreras de ciencias básicas y biomédicas. De la misma manera se debe proponer a **COLCIENCIAS** que promueva y apoye el fortalecimiento de la capacidad de las instituciones del sistema de ciencia y tecnología nacional en la gestión y administración de macroproyectos nacionales e internacionales.

3. El país debe desarrollar en los próximos años políticas que promuevan y prioricen el desarrollo nacional de medicamentos y vacunas para enfermedades endémicas a través del ordenamiento y concentración de esfuerzos de diversas universidades e institutos de investigación con capacidades para aportar al desarrollo de productos.

Estrategia. Establecer políticas nacionales de salud para la generación de consorcios dirigidos hacia el desarrollo de productos (Pruebas diagnósticas, fármacos y vacunas) para las ETV y zoonosis. Los grupos/entidades podrían trabajar en diferentes etapas del desarrollo de los productos con el apoyo del Ministerio de Protección Social en la evaluación y regulación de los productos. Tales políticas orientarían la búsqueda de conocimiento y capacidad tecnológica hacia la generación de un producto a partir de la investigación básica. Las

universidades y otras instituciones apoyarían la formación de recurso humano y desarrollarían componentes específicos en la generación de conocimiento y productos.

4. Desarrollar capacidad de Gestión del Conocimiento (una prioridad del Plan Nacional de Salud) que optimiza el flujo de información con el fin de tomar decisiones basadas en evidencia.

Estrategia. Diseñar un mecanismo para consulta y comunicación permanente entre autoridades de salud pública y la comunidad científica mediante:

- a. Acceso de bases de datos estadísticos de indicadores de salud.
 - b. La convocatoria y participación de investigadores, instituciones profesionales biomédicas y de salud, con el conocimiento pertinente en la toma de decisiones técnicas y políticas específicas.
 - c. El fortalecimiento del diagnóstico y el informe de casos desde los municipios.
 - d. Comunicación pro-activa de los representantes de sociedades profesionales biomédicas y de salud nacional (ACIN, Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical, entre otros) con la Dirección de Salud Pública del Ministerio de Protección Social.
5. Es necesario priorizar los trabajos en Fitoquímica y Farmacognosia, que además de producir conocimiento básico, agranden el vademécum e impulsen el conocimiento de nuestras plantas medicinales, y permitan la generación de normas técnicas de validación de procesos y productos.

Estrategia. Capacitación de los funcionarios de las entidades estatales para interpretar los resultados de la investigación básica; celebración de convenios para la realización de ensayos y análisis en el laboratorio; formulación de mecanismos de control y aseguramiento de calidad de productos naturales; generación de normatividad en cuanto al cultivo y manejo de las plantas y el desarrollo de productos fitoterapéuticos. Para iniciar esta estrategia se debe hacer una lista de plantas tóxicas de Colombia.

6. Incrementar la interacción ente grupos nacionales para llevar a cabo proyectos y programas de envergadura utilizando los aparatos disponibles en las diferentes universidades.

Estrategia. Crear la red temática en productos naturales que incluya a todos aquellos grupos de investigación dedicados al tema o que

tengan algunas de sus líneas de investigación relacionadas a los productos de origen natural, aquellos que hacen tanto la obtención de extractos, el aislamiento, la elucidación estructural, la síntesis, la biotecnología, como aquellos que buscan su aplicabilidad con fines terapéuticos, en la industria de alimentos, colorantes, recubrimientos, productos veterinarios, cosméticos, agroindustria y otros campos que por motivos de espacio, mas no de importancia, no mencionaremos en este momento. Dentro de sus funciones también estaría el organizar y difundir la programación de seminarios y cursos de actualización y capacitación en temas como la biología molecular como herramienta en productos naturales, técnicas de elucidación estructural de alta sensibilidad, derreplicación, biotecnología, bioinformática, filogenética, nuevas técnicas analíticas LC, LC-MS, LC-MS-NMR, cursos en técnicas de cultivo, así como cursos acerca de bioensayos.

7. Establecer una red de laboratorios capaces de ofrecer servicios de bioensayos contra enfermedades prioritarias para la nación y otras aplicaciones industriales.

Estrategia. Implementar a través de ACOFACIEN la lista de equipos robustos y ensayos ofrecidos por las universidades, para lo cual se cuenta con un primer inventario que debe ser complementado.

8. Promover la difusión de nuestros hallazgos en revistas nacionales.

Estrategia. Apoyar con trabajos la Revista de Productos Naturales, revista electrónica de libre acceso, sin por eso dejar de publicar en revistas extranjeras de alto impacto.

9. Establecer una agenda para la bioprospección de ecosistemas no tradicionales: páramos, desiertos, la selva húmeda, suelos, el mar, como fuentes poco exploradas o incluso inexploradas de productos naturales bioactivos.

Estrategia. Reunir a un grupo de expertos en productos naturales que establezca la agenda y proponga un programa con cronograma para comenzar la bioprospección.

10. Impulsar estudios en nuevas aplicaciones de los productos naturales: saborizantes, aromas, antioxidantes, medicinas veterinarias, acaricidas, insecticidas, buscando aplicaciones industriales y pensando en la promoción de la producción agrícola orgánica.

Estrategia. Reunir el próximo semestre a un grupo de expertos para establecer un programa nacional al respecto.

Tema 2. Estrategias para el intercambio científico y tecnológico entre los países participantes

1. Diseñar una estrategia para aprovechar las oportunidades de obtener financiación a través de cooperación internacional.

Estrategia. Colocar a disposición de los grupos de investigación la información acerca de los programas disponibles, de sus exigencias y requisitos y demás condiciones, lo que se hará a través de ACOFACIEN. Se propone ofrecer becas de iniciación científica del tipo de las del CNPq con el fin de patrocinar pasantías de estudiantes de pregrado en grupos de investigación.

2. Crear un directorio de investigadores en productos naturales y en Parasitología, que haga visible sus fortalezas e intereses, y que permita el contacto entre los diferentes grupos.

Estrategia. Encargar a ACOFACIEN de promover la compilación del directorio y de tenerlo actualizado y disponible.

Tema 3. Fortalecimiento de los doctorados nacionales

1. Buscar la cooperación entre Colciencias, Minprotección, ICETEX y Mineducación para tener un fondo adecuado de becas completas (no becas-crédito) que cubran los gastos de sostenimiento de los doctorandos en ciencias básicas y ciencias biomédicas.
2. Buscar que los programas de financiación de proyectos y programas aseguren que hay fondos suficientes para cubrir las necesidades de reactivos y otros insumos tales como animales, etc. para asegurar la formación doctoral.
3. Tratar de que las universidades tengan políticas de contratación de nuevos doctores en condiciones atractivas de salarios y de recursos para investigación.
4. Fomentar transferencia de conocimiento y tecnología desde la investigación en parasitología o productos naturales hacia la empresa y hacia las entidades estatales encargadas de programas de salud pública y hacia la sociedad.
5. Fortalecer los Doctorados nacionales ya que estudios por periodos largos fuera del país conducen al regreso de personas desarraigadas

que se enfrentan abruptamente con los problemas de investigación de nuestro país.

6. ACOFACIEN debe hacer un inventario de los programas de doctorado existentes actualmente en biología y ciencias biomédicas y determinar en cuántos de ellos se realizan estudios específicamente en las áreas de parasitología o entomología con el objeto de difundir a través de las asociaciones científicas nacionales información sobre programas de doctorado en las áreas de parasitología, medicina tropical, enfermedades infecciosas y entomología.
7. ACOFACIEN debe liderar procesos para establecer consensos para unificar criterios de estructuración de programas doctorales.
8. Formación de personal del más alto nivel en ambas áreas con metas definidas y con la participación de los Ministerios de Protección Social y Colciencias.

Estrategia: para los ocho puntos anteriores, ACOFACIEN buscará el mecanismo de que se lleven a cabo a través de propuestas a los diferentes entes reguladores y financiadores. Se llevará a cabo un curso avanzado en Parasitología y Productos Naturales para estudiantes de doctorado nacionales y de la región en el segundo semestre de 2009.

CONFERENCIA DE CLAUSURA

HITOS DE LA INVESTIGACIÓN EN PARASITOLOGÍA

Gustavo Malagón Londoño¹

Merece una felicitación este encomiable esfuerzo realizado por La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, la Asociación Colombiana de Facultades de Ciencias con el impulso vivificante de la Universidad de los Andes y la presencia moral de la Academia Nacional de Medicina, para realizar el importante Seminario Internacional sobre Tendencias y Futuro de la Investigación en Parasitología y las Tendencias en Productos naturales. Cae de su propio peso la excelencia del evento realizado si se consideran los objetivos fijados por el Comité organizador de contrastar los avances, las experiencias y los resultados logrados en nuestro país con los de los países más desarrollados; de crear vínculos entre los grupos líderes de investigación que participen en este seminario; de poner en contacto directo a los investigadores con profesores y estudiantes con miras a fortalecer las investigaciones; y de lograr caminos para intercambios de docentes y estudiantes de posgrado, especialmente de quienes adelantan programas de doctorado. Pero además hay un valor agregado indiscutible, constituido por la convocatoria de los más sobresalientes profesores, todos de reconocido prestigio nacional e internacional, lo anterior sin mencionar la importancia y repercusión que puedan tener las discusiones que surjan de los grupos de trabajo, posibles semilleros de futuras investigaciones.

Los dos temas propuestos en el Seminario Internacional, de ambiciosa cobertura, dan peso para prolijas disquisiciones, pero la capacidad de organización y la exposición de complejidad creciente llevó a abarcar lo fundamental en un espacio reducido de tres días de ferviente disciplina intelectual, quizás suficientes para generar inquietudes científicas entre los participantes quienes tomarán de lo expuesto los puntos de partida para profundizar e incursionar sobre los varios tópicos tratados y probablemente para generar propuestas.

En lo relacionado con Parasitología, si partimos de lo básico expuesto desde antaño por los precursores de la investigación que en este campo descollaron en el mundo, apreciamos el esfuerzo, la iniciativa y hasta los sacrificios dignos de admiración con que emprendieron la cruzada para

¹ Presidente Academia Nacional de Medicina.

neutralizar o doblegar las acciones de tripanosomas, leishmanias, vibriones, plasmodios, faciolas y amebas, entre otros que por mucho tiempo han convertido en víctimas indefensas a grandes grupos de población del mundo. Aseguran los investigadores que los primeros parásitos humanos fueron herencia de los primates africanos, antecesores del homo sapiens, aparecido hace más de 150.000 años en el este del continente africano. Hoy las infecciones causadas por protozoos y helmintos patógenos afectan a más de 3.000 millones de personas y ocasionan en ausencia del adecuado manejo, elevada morbilidad y mortalidad. Alrededor de 300 especies de helmintos y de unas 70 de protozoarios pueden afectar a los seres humanos; aproximadamente las dos terceras partes de ellas son parasitosis accidentales, siendo solo unas 90 las especies más frecuentemente responsables de enfermedades. Resulta paradójico que del estudio de los parásitos y de las infecciones parasitarias se hayan sacado datos fundamentales para entender las migraciones, las actividades y las costumbres de las civilizaciones.

Séneca, el inmortal filósofo de todos los tiempos, en el libro 7, “Cuestiones Naturales” escribía: *“llegará una época en que la investigación diligente y prolongada, sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una persona aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta”*. Esa frase con la que el sabio resaltaba el inconmensurable valor de la investigación cobra cotidiana vigencia y quizás se constituye en una pieza motivadora y promotora del vivir académico del hombre de ciencia. Es la investigación el factor fundamental que fija los cimientos para llegar a la verdad. Gracias a ella, la tecnología avanza, la vida tiene un significado, vivir es un halago y cada vez más se avanza a ganar la batalla ante la amenaza tremenda de los implacables enemigos milenarios, bacterias y parásitos.

William Herschell, investigador del siglo XVIII, anotaba: *“He visto más lejos de lo que ningún ser humano ha visto antes”*. La investigación profunda, la de todos ustedes, ilustres maestros del saber, convocados con acierto a este evento, permite poner en evidencia aspectos antes desconocidos y que significan factores determinantes de novedosos procedimientos que enfrentan positivamente al vector y evitar así su acción victoriosa sobre un huésped desprevenido. El hombre de ciencia, el investigador, rompe el proceso biológico del parásito y aún controvirtiendo anteriores teorías se acerca cada vez más a la verdad. El científico Hubble, en 1929, hizo que el hombre más famoso de la física de entonces, se sintiera profundamente equivocado: Einstein había incluido en sus ecuaciones de campo un término en la Geometría que garantizaba un universo estático. Hubble con espectros de más de 52 galaxias, advirtió un corrimiento al rojo de sus líneas espectrales, de acuerdo con el efecto Doppler. Esto significaba que las fuentes de luz, las galaxias, se alejaban de nosotros. Este descubrimiento definió la expansión del universo y marcó el nacimiento de la cosmología moderna.

La Universidad de hoy, dignamente representada por quienes en su calidad de profesores y científicos han transmitido en este escenario el fruto de sus investigaciones, pone en evidencia los avances que en un campo sofisticado como el de la Parasitología se han logrado en el presente y sientan las bases para proseguir en la tarea de buscar nuevos derroteros. En poco tiempo, cuando se desarrolle un evento de la trascendencia de éste, los aportes serán cada vez más novedosos y valiosos gracias al impulso que ellos le imprimen a la investigación en este campo y a la metodología didáctica con que orientan a sus discípulos.

Cabe recordar el papel fundamental que han significado los investigadores nacionales pioneros de los grandes avances logrados en la detección de vectores, en la identificación de los parásitos y su curso biológico, igual que en el campo de acción desde el punto de vista de salud pública. Es imprescindible mencionar la labor meritoria y destacada del Instituto Nacional de Salud creado en 1917 como el Laboratorio Privado de Samper y Martínez, cuando la atención de la salud era asistencial e individual. Recogió en encomiable labor las experiencias del siglo anterior en materia de investigación parasitológica y bacteriológica y las cotejó y prosiguió con los trabajos publicados en ese entonces.

Por parte de la Academia Nacional de Medicina de Colombia **Roberto Franco Franco**, especializado en París y Londres en enfermedades tropicales, ingresó a la Academia en 1909 con el trabajo “Anemia tropical, uncinariasis, anquilostomiasis”; en asocio con los Doctores Gabriel Toro adelantó el trabajo sobre las fiebres de Muzo, vale decir que por primera vez se denunciaba la existencia de la fiebre amarilla selvática.

César Uribe Piedrahita es quizás uno de los profesionales más sobresalientes en el área de la salud en la primera mitad del pasado siglo. Además de investigador destacado, profesor egregio, trabajó en las campañas de erradicación de vectores y en la educación para implantar medidas sanitarias especialmente en regiones selváticas.

Santiago Rengifo Salcedo, ameno y muy versado profesor universitario; además de sus trabajos en investigación epidemiológica, impulsó desde su posición de Ministro de Salud campañas efectivas contra malaria, tuberculosis y leishmaniasis.

Jorge Cavalier Jiménez, a pesar de su especialidad en Urología, durante su ejemplar desempeño como Ministro de Salud, fortaleció las campañas directas a nivel nacional para develar endemias y epidemias que azotaban el país. Además de fomentar las vacunaciones masivas para rabia, polio y las campañas antituberculosas, impulsó los programas contra malaria.

Luis Patiño Camargo, quien en asocio con Jorge Martínez Santamaría y Bernardo Samper adelantó la investigación sobre tifo negro o exantemático en Bogotá e identificó a la rickettsia como agente etiológico. Cuando ingresó a la Academia Nacional de Medicina presentó su experiencia sobre fiebre amarilla en Muzo y Santander y más adelante en la misma Academia comunicó sus experiencias sobre mosquitos anofelinos en los Valles de Cúcuta y sobre fiebre amarilla en Colombia. Escribió sobre tratamiento del paludismo, sobre parasitismo intestinal y fue motor en la encuesta sobre brucelosis en Colombia.

Hernando Groot Liévano, destacado profesor universitario y académico sobresaliente, ha sido sin duda uno de los más consagrados investigadores del país. Estudió a profundidad la tripanosomiasis y fue quien descubrió el *Tripanosoma Rangeli* en el vector. En asocio con el Dr. Carlos Sanmartín trabajó en la descripción de la primera epidemia conocida de encefalitis equina venezolana. Adelantó estudios sobre fiebre amarilla, dengue y describió el agente etiológico de este último; como investigador incansable es sin duda uno de los más preciados valores nacionales en el campo epidemiológico.

Carlos Sanmartín Barberi, especialista en Medicina tropical, desarrolló memorable labor desde la dirección del Instituto Carlos Finlay. Y a partir de su trabajo inicial que publicó bajo el título de *Haemosporoidea* y otros parásitos sanguíneos continuó en su afán investigativo, trabajó al lado de Hernando Groot Liévano y dejó grandes enseñanzas.

Felipe Ghul Nanneti, Biólogo de la Universidad de los Andes, Magíster en Epidemiología, actualmente profesor de esta Universidad, publicó una valiosa reseña sobre la Enfermedad de Chagas en Colombia y ha continuado sus trabajos de investigación en esa y otras patologías tropicales.

Cornellis Marinkelle, también vinculado a la docencia de esta ilustre Universidad, se ha destacado en sus trabajos de investigación en el área parasitológica, con interesantes publicaciones sobre esos temas.

Manuel Elkin Patarroyo Murillo, Médico de la Universidad Nacional, postgrados en Virología en Yale (New Haven, USA) e Inmunología en Rockefeller (New York, USA), Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia). Más de 25 doctorados *Honoris Causa* nacionales e internacionales. Fundador y actual director del Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) de la Universidad Nacional, centro colaborador con la OPS/OMS para la investigación y el desarrollo de vacunas sintéticas contra la Malaria, la Lepra y la Tuberculosis.

De su “*peptidoteca*” (33.000 péptidos sintetizados para reconocer cómo se infecta el ser humano) podría salir la base de las vacunas sintéticas para inmunizar contra éstas y otras patologías.

Hizo los primeros ensayos en micos *Aotus trivirgatus* y luego en humanos. Es el científico más recordado en el país, según una encuesta realizada por Colciencias en el 2004.

Alrededor de este mosaico de ilustres maestros, pioneros de la investigación epidemiológica en Colombia, se ha tejido el historial de la evolución en tan importante campo y se ha marcado el hito de referencia que se seguirá con atención en pro del ideal de ganar la batalla en que la ciencia está hoy comprometida.

El ejemplo y la trayectoria trazada por los eminentes científicos dedicados con altruísmo a este inagotable, arduo pero fascinante campo de la parasitología, es seguramente el mayor estímulo para los investigadores de hoy y un acicate para las nuevas generaciones de profesionales, quienes seguramente entregarán toda su energía a continuar las tareas iniciadas por los maestros, a seguir muchos de sus derroteros y a marcar nuevos hitos que significarán una nueva respuesta positiva a la comunidad expectante.

Gracias al Comité organizador de este importante certamen por la oportunidad que me ha brindado de dirigirme a tan selecto auditorio y para cada uno de ustedes mi reconocimiento por la paciencia de escucharme.

La conferencia final, Hitos de la Investigación en Parasitología en Colombia, presentada por el Presidente de la Academia Nacional de Medicina, fue un excelente modo de terminar el Seminario, pues evocó las figuras colombianas cimeras de la Investigación en Parasitología y dejó un ejemplo para los asistentes en cuanto a dedicación y logros para la salud no solo en Colombia sino en los países tropicales.