

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental



Jornadas **IBE'2016**

VOLUMEN 8(1): 1-172 (2016)

ISSN 1316-7510

Depósito Legal pp 199802DF268

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental

**Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela**

Universidad Central de Venezuela

Cecilia García Arocha

Rectora

Nicolás Bianco

Vicerrector Académico

Bernardo Méndez

Vicerrector Administrativo

Amalio Belmonte

Secretario

Facultad de Ciencias

Ventura Echandía

Decano

Coordinadores

Académico: Blas Dorta

Postgrado: Alejandro Crema

Investigación: Pío Arias

Extensión: Ernesto Fuenmayor

Administrativo: Santiago Gómez

Directores

Escuela de Biología: Jesús Romero

Escuela de Computación: Robinson Rivas

Escuela de Física: José Antonio López

Escuela de Química: Mary Lorena Araujo

Escuela de Matemáticas: Mariela Castillo

Instituto de Biología Experimental: Ernesto González

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos: María Estela Matos

Instituto de Ciencias de la Tierra: Ramón Montero

Instituto de Zoología y Ecología Tropical: Ana Bonilla

Centro de Computación: Alberto Bellorín

Instituto de Biología Experimental

Ernesto González

Director

María Valentina Salas

Coordinadora del Centro de Biología Celular

Beatriz Vera

Coordinadora del Centro de Botánica Tropical

Antonio Gutiérrez

Coordinador del Postgrado en Biología Celular

Aníbal Castillo

Coordinador del Postgrado en Botánica

Representantes de los profesores

Principales

Elizabeth Valdivieso

Concepción Hernández

Ana Herrera

María B. Raymúndez

Suplentes

Guillermina Alonso

Gustavo Benaim

Aníbal Castillo

Wilmer Tezara

Ernesto González
Editor

Comisión Editorial:

Alicia Cáceres
María Angélica Taisma
Eva de García
María Lorena Márquez
Elizabeth Merentes

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental

@Ediciones IBE

ISSN 1316-7510

Depósito Legal pp 199802DF268

Concepción y diseño editorial: Ernesto González

Fotografía de la portada: Luis Levin

Corrección, transcripción y compaginación: Ernesto González

Presentación

La realización de las **VII Jornadas de Investigación IBE'2016** se enmarca dentro del 21° aniversario de la creación del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, las cuales se realizaron a su vez bajo el marco de las Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias 2016, conmemorando el 58° aniversario de nuestra Facultad. Aunque de formalización relativamente reciente, el **IBE** es hoy una institución sólida, heredera de una amplia trayectoria científica basada en esfuerzos, iniciativas y vivencias de los fundadores de la Escuela de Ciencias, quienes lograron, al inicio del período democrático, su transformación en la primera Facultad de Ciencias del país. A la creación del **IBE** contribuyó en forma decisiva la generación de los pioneros que sentaron las bases para el desarrollo de la Biología Experimental en Venezuela.

La gradual transformación de laboratorios en grupos de investigación consolidados, entonces adscritos a los departamentos de la Escuela de Biología, abrió el camino para el establecimiento de los Centros de Botánica Tropical (CBT) y de Biología Celular (CBC) en 1985. La conversión de esta estructura organizativa transitoria en otra de rango administrativo y académico superior, fue lograda a través de un largo proceso de negociaciones que culminó cuando el Consejo Nacional de Universidades aprobó en forma definitiva la creación del Instituto de Biología Experimental, en su sesión ordinaria de fecha 24 de noviembre de 1994 (oficio CNU-SP-RI 338-94, publicado en la Gaceta Oficial Extraordinaria N° 4838, de fecha 18 de enero de 1995). Al instalarse la Asamblea de Investigadores del **IBE** elegimos democráticamente al Dr. Vidal Rodríguez Lemoine como el primer Director el 2 de junio de 1995, quien fuera ratificado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo Universitario. El acto académico que consagra el inicio formal de actividades del **IBE** lo realizamos el 8 de julio de 1995 en el Paraninfo de la Universidad Central de Venezuela. Al Dr. Rodríguez Lemoine le sucedieron en el cargo las Dras. Marcia Escala, Andrea Menéndez y Maira Oropeza, quienes mantuvieron el crecimiento del Instituto de Biología Experimental, dejando en manos del suscrito este importante legado desde el año 2011.

En el **IBE** hemos hecho modestas pero significativas contribuciones al conocimiento científico universal, participando muy activamente en la búsqueda de soluciones a muchos problemas que son de interés cercanos a nuestra realidad socio-económica. Esta afirmación tiene como base la orientación y alcances de la mayoría de los proyectos de investigación que se adelantan en nuestros laboratorios, así como en el número y calidad científica de los trabajos originales publicados en revistas especializadas, y en la activa participación de eventos científicos nacionales e internacionales. Detalles sobre cada uno de los aspectos relativos a la organización y composición académica de los laboratorios, sus proyectos de investigación y desarrollo, productividad científica y formación de recursos humanos, están recopilados en las ediciones bienales de la memoria descriptiva del Instituto, de las cuales hemos publicado consecutivamente las correspondientes a los bienios 1994-1995, 1996-1997, 1998-1999, 2000-2001, 2002-2003, 2004-2005, 2006-2007, 2008-2009, 2010-2011, 2012-2013. Este año publicaremos la *Memoria 2014-2015*, la undécima de esta secuencia de actividades científicas por parte de todos nuestros investigadores, personal técnico y estudiantes de pre y postgrado. Así mismo, la actividad académica diaria es recogida y difundida a través de la edición **IBE Hoja Informativa**, boletín del cual hemos publicado hasta la fecha 341 números.

Desde los comienzos hemos dedicado parte de nuestro esfuerzo a proyectar y difundir las actividades de investigación que se realizan en cada uno de los laboratorios del **IBE**. En 1998 realizamos exitosamente las I Jornadas de Investigación, denominadas **Jornadas IBE'98**, dirigidas a dar a conocer, en toda su extensión, la trayectoria de los grupos de investigación integrados a los Centros de Biología Celular y de Botánica Tropical. En esa oportunidad adoptamos un formato basado en la presentación de carteles y la publicación simultánea de mini-revisiones sobre las líneas de investigación en desarrollo. A partir de ese momento iniciamos la publicación de la revista **MIBE, Memorias del Instituto de Biología Experimental** (ISSN 1316-7550, Depósito Legal pp 19980DF268), cuyo primer volumen dedicamos por entero a las **Jornadas IBE'98**.

Estamos convencidos que la iniciativa de publicar una revista con las características de las **Memorias del Instituto de Biología Experimental** ha sido un acierto. Con su creación no intentamos generar un medio para soslayar institucionalmente las dificultades que pudiéramos tener los investigadores para colocar trabajos originales en revistas del sistema internacional de publicaciones científicas. Nuestro objetivo primordial ha sido,

y sigue siendo, la consolidación de un órgano de publicación, de alta calidad editorial y amplia difusión local, que sea capaz de servir de vínculo con la comunidad científica nacional, que nos permita tener presencia colectiva, divulgando – en conjunto – las actividades de investigación que se realizan en el Instituto. Así, el volumen 1, correspondiente al año 1998, lo dedicamos exclusivamente a las memorias de las *Primeras Jornadas de Investigación, Jornadas IBE'98*, realizadas en julio del mismo año. El volumen 2, correspondiente al año 1999, recoge las memorias del *Primer Simposio Venezolano de Etnobotánica*, realizado en julio de 1999, con la participación de investigadores del *IBE* y de todo el país. Los volúmenes 3, 4, 5, 6 y 7 recogieron las mini-revisiones de las *Jornadas de Investigación IBE'2001, 2005, 2008, 2012 y 2014*, respectivamente. Estos volúmenes contienen revisiones actualizadas sobre temas específicos que reflejan la trayectoria de los laboratorios en un período de tres años y fueron publicadas en formato único con una extensión de cuatro páginas. Para cada volumen designamos un cuerpo de editores. Por su naturaleza y objetivos, la revista *MIBE* no ha estado abierta para la publicación de trabajos originales. A nuestro juicio, éstos deben difundirse a través de las publicaciones especializadas o multidisciplinarias de mayor impacto y difusión internacional.

Para la realización de las *VII Jornadas de Investigación IBE'2016*, el Consejo Técnico decidió adoptar la misma estructura organizativa y los objetivos establecidos para las primeras jornadas. Para llevar a cabo nuestras jornadas, invitamos en marzo de 2016 a los profesores-investigadores y a los estudiantes de postgrado, y solicitamos la elaboración de revisiones actualizadas sobre el desarrollo de las líneas de investigación en los últimos cuatro años. En mayo de 2016 recibimos 43 mini-revisiones, representativas de los 30 laboratorios adscritos al CBC y al CBT. Luego de cumplidos los requerimientos editoriales, las revisiones fueron incorporadas en el presente volumen de las *Memorias del Instituto de Biología Experimental (MIBE 8(1): 1-172, 2016)*. Al igual que en años anteriores, su contenido revela la presencia de una amplia variedad de temas de investigación con variados niveles de desarrollo. Encontramos líneas de investigación con más de veinte años de vida ininterrumpida y, en consecuencia, con una alta productividad. En otras áreas de reciente implantación encontramos avances importantes. Es muy apreciable el uso cada vez más generalizado de métodos y técnicas derivadas de la biología molecular. Pero es todavía más relevante la marcada y beneficiosa tendencia a establecer vínculos reales de cooperación entre los laboratorios y las disciplinas científicas que en ellos se desarrollan, y entre éstos y los de otras instituciones nacionales o del exterior. En cada uno de los proyectos representados en las memorias se reconoce la participación tanto de colaboradores internos como externos. Queda así plasmada la participación de un universo formado por 130 investigadores, colaboradores, contratados, estudiantes de pre y postgrado y técnicos vinculados a proyectos realizados en el *IBE*.

Por último, agradecemos a los miembros del Consejo Técnico, a la comisión que actuó como asesora a la edición de este volumen, al personal secretarial de la Dirección y, sobre todo, a los investigadores que de nuevo se sometieron a las exigencias y rigores del formato, y dedicaron tiempo para entregar los manuscritos. Esta experiencia servirá para ponderar y revisar los objetivos y alcances de los próximos volúmenes, y para mejorar su calidad editorial.

Ernesto José González Rivas

Contenido

Papel del suero autólogo en la eliminación de los eritrocitos humanos viejos PEDRO J. ROMERO Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA	1
Fraccionamiento de extractos metanólicos de semillas de <i>Carica papaya L.</i> y su efecto sobre promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA, LUIS M. RODRIGUEZ Y PEDRO J. ROMERO	5
Proteasas presentes en el exoproteoma de <i>Leishmania mexicana</i> MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES, MILAGROS MÉNDEZ, EVA VONASEK, PEDRO J. ROMERO Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA	9
Reutilización de drogas aprobadas contra otras enfermedades, para el tratamiento la leishmaniasis VERÓNICA GARCÍA, VANESSA HERNÁNDEZ, JESSICA RODRÍGUEZ, ANDREA PINTO Y GUSTAVO BENAİM	13
Nuevas drogas de origen vegetal contra la leishmaniasis. Efecto de un nuevo flavonoide aislado de <i>Iresine diffusa</i> contra <i>Leishmania mexicana</i> YETSENIA DE GOUVEIA, VANESSA HERNÁNDEZ, JESSICA RODRÍGUEZ, ALÍRICA SUÁREZ Y GUSTAVO BENAİM	17
Posible mecanismo de acción de segundos mensajeros lipídicos sobre la Ca^{2+}-ATPasa de eritrocitos humano VINCENZA CERVINO, MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONEZ Y GUSTAVO BENAİM	21
Evidencia de la presencia de una Ca^{2+}-ATPasa sensible a Calmodulina en <i>Trypanosoma evansi</i> MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES, JOSÉ RAMÓN RAMÍREZ-IGLESIA, GRACIELA UZCANGA, GUSTAVO BENAİM, MARTA MENDOZA Y VINCENZA CERVINO	25
Efectos de drogas y compuestos derivados de productos naturales sobre la homeostasis de Ca^{2+} en <i>T. cruzi</i>. ALEJANDRA VILLARROEL, MARINÉS GARCÍA, VLADIMIR KOUZNETSOV, DIEGO MERCHAN ARENAS, FRANCISCO ARVELO, FELIPE SOJO, GUSTAVO BENAİM Y VINCENZA CERVINO	29
Diferenciación en <i>Leishmania</i> sp.: eventos celulares subyacentes FRANCEHULI DAGGER BOYER	33
Concentración de calcio en saliva en pacientes con Periodontitis Crónica y Agresiva antes y después del tratamiento periodontal JOSÉ MEJÍA, MARIA-ANTONIETA MÉNDEZ Y VALENTINA SALAS	37
Método para la cuantificación de triglicéridos en el gorgojo de arroz <i>Sitophilus oryzae L.</i> INGRID FONSECA, CARLOS AGUILAR Y MERIS CASOTTO	41
Biomatrices naturales en la bioingeniería de tejidos ELIZABETH MERENTES, MARIA VALENTINA CAMEJO, ELIANA NAVARRO Y MARÍA LORENA MÁRQUEZ	45
Nanopartículas: composición, carga y efecto antitumoral sobre células de cáncer de mama humano MCF-7 y SKBr3 SHELBY ORTIZ, MARCOS SABINO, FELIPE SOJO Y FRANCISCO ARVELO	49

Estudio de las corrientes de K⁺ en células de cáncer de mama MCF-7 en presencia de compuestos naturales y sintéticos con actividad citotóxica CHRISTIAN CALDERÓN, FELIPE SOJO, FRANCISCO ARVELO, FERNANDO GONZÁLEZ Y ANTONIO GUTIERREZ	53
Fundamentos teóricos y prácticos para el análisis de canales unitarios a través de un modelo cinético ALEJANDRO D. MATA DABOIN Y JESÚS G. ROMERO	57
Canales iónicos en <i>Leishmania</i> y en el Macrófago infectado: Posibles blancos terapéuticos ANGELES R. ZAMBRANO-ARNONE, NAILETH GONZALEZ-SANABRIA, YEIMAR PORTILLO, PHENELOPE RIVAS, ALEJANDRO D. MATA DABOIN, DANIEL LANDI-CONDE, LUIS OCTAVIO ROMERO, VINCENZA CERVINO Y JESÚS G. ROMERO	61
Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> usando subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela IRENE ALVARADO, BLAS DORTA Y ROXANA GAJARDO	65
Marcadores moleculares en <i>Kinetoplastida</i>: Variabilidad genotípica y fenotípica ROBERTO GARCÍA-ALZATE, DAISY LOZANO-ARIAS, RAFAEL MATÍAS REYES-LUGO, ORLANA LANDER, ANTONIO MOROCOIMA, LEIDI HERRERA Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN	69
Potenciales blancos de drogas en Kinetoplastidas. Modelaje y dinámica molecular de la 6PGDH MARÍA LUISA SERRANO, MARIANA GRATEROL Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN	73
La fluorescencia <i>in vivo</i> en Tripanosomatidae: un enfoque experimental para el estudio de la relación parásito hospedador y la eficacia de drogas PALMIRA GUEVARA TREJO, ANUSCHKA DA SILVA, ALI AGUDELO, NEREIDA PARRA Y ALFREDO MIJARES	77
Variaciones espaciales y temporales de la comunidad planctónica del embalse Camatagua (Estados Aragua y Guárico, Venezuela) ERNESTO J. GONZÁLEZ, DANIEL LÓPEZ Y LORENA RODRÍGUEZ	81
Elección de pareja en una situación del tipo “fiesta coctel” en la rana <i>Physalaemus pustulosus</i>: efecto de la complejidad del canto y el orden de emisión ZAIDA TÁRANO MIRANDA	85
Evaluación morfológica en el campo de ecotipos amazónicos de piña (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr), obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> EVA C. DE GARCÍA, HÉCTOR A. BLANCO, AMALIA BRITO, TERESA E. VARGAS Y FRANS TORRES	89
Organogénesis en piña (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.) ecotipo Erüwä Känä HÉCTOR A. BLANCO FLORES, TERESA E. VARGAS CEDEÑO Y EVA C. GARCÍA DE GARCÍA	93
Aplicación de biotécnicas al cultivo de plantas ornamentales y forrajeras de interés comercial TERESA E. VARGAS, LUIS HERMOSO, VANESSA MEDINA, ALEJANDRA BETANCOURT, ROSA MARVAL, MELVIN MAIQUETÍA, ANDREA MENÉNDEZ-YUFFA, MARCIA TORO Y EVA DE GARCÍA	97
Factores que afectan la propagación industrial <i>in vitro</i> de café en variedades de interés comercial ANDREA MENÉNDEZ-YUFFA, LUIS HERMOSO-GALLARDO, HIRANI HUGLE-MISLE, TERESA E. VARGAS, BILAL EL AYOUBI	101

Autoincompatibilidad en especies de <i>Bauhinia</i> L. (Fabaceae: Caesalpinioideae) en Venezuela OMAIRA HOKCHE Y NELSON RAMIREZ	105
Biología floral de las angiospermas de un humedal con <i>Copernicia tectorum</i> YENI BARRIOS Y NELSON RAMÍREZ	109
Sistema reproductivo de <i>Dimorphandra macrostachya</i> Benth. ssp. <i>macrostachya</i> (Fabaceae, Caesalpinioideae) NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO	113
Mirmecocoría en especies de los Altos Llanos Centrales Venezolanos NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO	117
Respuestas ecofisiológicas y productiva del cacao Venezolano y Ecuatoriano al estrés WILMER TEZARA, ANA HERRERA, JENNY DE ALMEIDA, MILTON BOLAÑOS Y VICTOR REYNEL	121
Comparación fisiológica y productiva entre el clon nacional ecuatoriano PMA 12 y el CCN 51 WILMER TEZARA, MÁXIMO PINCAY, JENNY DE ALMEIDA, VICTOR REYNEL Y MILTON BOLAÑOS	125
Establecimiento y caracterización del banco de germoplasma <i>in vitro</i> de ñame (<i>Dioscorea</i> sp.) MAYELI MORENO, EDER DURANGO, RUDY CABRITA, YAYFRE REINA Y MAIRA OROPEZA	129
Diagnóstico de bacterias patógenas de plantas RAIZA BARRIOS, FRANCESCA COPPOLA, MARY CARMEN FERNANDES, MAYBELING JUNCO, ANA KARINA MARCANO Y MAIRA OROPEZA	133
Genes relacionados con la respuesta de plantas a patógenos INGRID FONSECA, BEATRIZ ALVEZ Y MAIRA OROPEZA	137
Crecimiento y actividad enzimática en plantas micorrizadas del bosque seco tropical ALICIA CÁCERES, KARLA CÁCERES-MAGO, ARNELD SULBARÁN Y MAOLY MARQUEZ	141
Morfología y Anatomía Foliar. Aplicación e Importancia en Bromelias del Arboretum-IBE MARCIA ESCALA Y LUIS HERMOSO	145
Estudios morfoanatómicos de la hoja y los frutos en especies de Lauraceae con interés biosistemático HERNÁN FERRER PEREIRA, MARÍA B. RAYMÚNDEZ Y MARCIA ESCALA	149
Biosistemática y citogenética vegetal como fuente de apoyo al fitomejoramiento y la biotecnología vegetal HERNÁN FERRER PEREIRA, MARÍA B. RAYMÚNDEZ E IRIS PÉREZ ALMEIDA	153
Biosistemática vegetal en la caracterización y preservación de la biodiversidad MARÍA B. RAYMÚNDEZ, ANGIE SILVA, ALCIDES MONDRAGÓN Y REINA GONTO	157
Estudio dendrológico de los bosques secos del área Kempis-Santa Lucía, Municipio Paz Castillo y Zamora (Estado Miranda) ANIBAL CASTILLO, ALFONZO CARDOZO, MIGUEL PIETRANGELI, REINA BELANDRIA, ELIO MAYZ Y VERÓNICA ARISMENDI	161
Estatus actual de los estudios ficoflorísticos de la región Centro Occidental, en el marco de la ficoflora de Venezuela SANTIAGO GÓMEZ, MAYRA GARCÍA, YUSNEYI CARBALLO BARRERA Y NELSON GIL	165

Ecología y Taxonomía de Macrofitas Marinas

BEATRIZ E. VERA, CELIA MORENO, SHEILA MARQUES-PAULS, CESAR PAZ, AIDÉ VELÁSQUEZ Y SONIA ARDITO

169

Papel del suero autólogo en la eliminación de los eritrocitos humanos viejos

PEDRO J. ROMERO Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA

*Laboratorio de Fisiología de Membranas, Centro de Biología Celular
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: romepe@yahoo.com*

Los eritrocitos humanos son selectivamente retirados del torrente sanguíneo después de 120 días de circulación bajo condiciones fisiológicas. Los mecanismos implicados aún no están totalmente esclarecidos. Un conjunto de evidencias involucran al ión calcio como principal responsable de la eliminación de tales células viejas. Los estudios realizados en este Laboratorio han propuesto la idea que el envejecimiento y la eritosis (destrucción programada de eritrocitos anormales: alterados o patológicos) son procesos fisiológicos distintos, con mecanismos comunes cuyo efector parece ser el Ca. Aun cuando el destino final de las células sea su fagocitosis por macrófagos profesionales, el secuestro de las senescentes parece ocurrir de manera diferente al eritótico. Es igualmente probable que la señalización para el reconocimiento e ingestión sea distinta en ambos procesos. En el presente trabajo continuamos con el estudio de estas posibilidades, determinando el efecto del Ca^{2+} intracelular en la eritofagocitosis por macrófagos profesionales y su modulación por la presencia de suero autólogo, con la intención de discriminar la contribución de las supuestas señales implicadas en el envejecimiento celular y diferenciarlas de aquellas asociadas a la eritosis.

Introducción

La sobrevivencia del eritrocito humano (EH) es de ~120 días, durante los cuales envejece paulatinamente al disminuir sus capacidades metabólicas y funcionales. En su transcurso recurrente por el organismo, el EH se halla sometido incesantemente a impactos microambientales ("stress") de diversa naturaleza. Entre ellos cabe destacar primero el de tipo mecánico, prominente durante el pasaje del EH a través de delgados capilares vasculares y de los sinusoides del bazo e hígado, de dimensiones muy inferiores a su tamaño (34). Para salvar exitosamente esta barrera, el EH debe conservar intacta su capacidad de deformación y elasticidad (33). El segundo tipo, no menos importante, lo constituye el stress oxidativo. Este es causado por aparición de oxidantes naturales (Fe^{3+} , O_2^- , H_2O_2 , OONO) y radicales libres ($\cdot\text{OH}$), producto de la auto-oxidación de la hemoglobina (Hb) ocurrida durante el transporte de O_2 y su exposición al óxido nítrico y nitritos (14,22). Para combatir eficientemente tal ataque oxidativo, la célula se halla dotada de una batería de agentes reductores, que incluye enzimas (superóxido dismutasa, peroxiredoxina2, catalasa, met-Hb y glutatión reductasas) y compuestos redox, tales como el glutatión, NADH y NADPH. Otro tipo de stress de destacada importancia es aquel osmótico, presente en la microcirculación medular renal, cuya magnitud puede superar hasta 3-4 veces la isotonicidad (15). El EH debe mantener intacta la capacidad para modular

el volumen a fin de subsistir. Para ello emplea distintos mecanismos que involucran al citoesqueleto (lo dotan de plasticidad) y a un conjunto de bombas (Na-K y Ca^{2+}), transportadores (intercambiador Cl-HCO_3 o Banda 3, cotransportador Na-K-2Cl , entre otros) y canales iónicos (K_{Ca} o canal de Gárdos, canal de aniones, etc), cuya activación depende directa o indirectamente de ATP y por ende, de su suministro adecuado por el metabolismo celular.

Es un hecho bien establecido que el EH viejo es secuestrado fundamentalmente a nivel esplénico, donde es reconocido como tal y destruido por los macrófagos del sistema reticulo-endotelial (20,21). Los mecanismos responsables del secuestro y destrucción de las células senescentes no están totalmente dilucidados. Se ha señalado una gama de factores presuntamente involucrados, entre los que destacan: la externalización de la fosfatidilserina (FS) (5), el enlazamiento de inmunoglobulina G (IgG) al antígeno de senescencia (13), la agregación de la banda 3 y consiguiente enlazamiento de IgG (19) y deposición de factores del complemento (2,31). No obstante la multiplicidad de factores, parece existir un común denominador entre ellos: el Ca^{2+} . Este ión es un conocido activador de la escramblasa e inhibidor de la translocasa de amino-fosfolípidos (3,36), disipando la distribución asimétrica de FS en la membrana. Asimismo, activa el complemento por la vía clásica (17) y promueve la agregación de las partículas intramembrana del EH (c.f. 31).

El Ca^{2+} ha sido señalado como principal responsable de los procesos que culminan con la remoción de los EHs viejos (24,26). Es ampliamente conocido el aumento de Ca^{2+} interno a medida que el EH envejece (27,29). Aunque tal incremento es un cambio gradual tiempo-dependiente, la consiguiente activación del canal de Gárdos (K_{Ca}) (9,10), lo convierte en un *transductor* de esa señal monotónica a una todo o nada, requerida para iniciar el (los) proceso(s) involucrado(s) en la eliminación de las células viejas (23,26). Así, la apertura del K_{Ca} provoca la salida masiva de K , la célula se hiperpolariza, impulsando directamente la salida de Cl^- (fundamentalmente a través de la banda 3 o AE1) para mantener la isoneutralidad eléctrica e indirectamente, la de agua (principalmente a través de la aquaporina AQP1) para mantener el equilibrio osmótico. Como resultado final el EH se deshidrata y contrae, reduciendo su volumen y aumentando la densidad. A esto último también contribuye la pérdida de áreas de membrana debida a vesiculación inducida por Ca^{2+} (1,28). De este modo, el EH viejo se hace mucho menos deformable, capaz de ser retenido a nivel esplénico y finalmente reconocido y eliminado por los macrófagos residentes (26). Tal idea es contradictoria con hallazgos más recientes que señalan una aparente disminución de la actividad del K_{Ca} durante el envejecimiento celular (30). No obstante, debemos destacar la presencia de otros mecanismos tales como el intercambiador Na-K-2Cl y el cotransportador KCl (sensible al envejecimiento) (7,12,18), posiblemente operando bajo las condiciones anteriores y que pudiesen afectar la variación volumen celular reportada.

Trabajos recientes postulan que el envejecimiento es un tipo de apoptosis (6). Otros sugieren que ambos procesos (apoptosis y envejecimiento) transcurren por vías diferentes (11,19,24), con mecanismos comunes y posiblemente distintos requerimientos de Ca^{2+} (24). El papel del canal de Gárdos en la apoptosis del EH (eriptosis) fue estudiado anteriormente por Lang y col. (16). Los autores concluyeron que dicho canal participa en la regulación de la apoptosis de los EHs. Sin embargo, sus hallazgos demuestran que el efecto de los moduladores del K_{Ca} utilizados (carybdotoxina, clotrimazol, incremento del K^+ externo) no está totalmente correlacionado con la exposición de FS, conocido marcador apoptótico. Ello sugiere un segundo proceso implicado en la externalización de la FS, además del canal de Gárdos.

Más aún, un cúmulo de trabajos recientes demuestra que la fracción de FS externalizada en la membrana de los EHs no es modificada durante el envejecimiento *in vivo* (8,11,35). Ello parece descartar a la externalización de FS como mecanismo

involucrado en la eliminación de los EHs senescentes. Sin embargo, ante un estrés (p.e. oxidativo) los EHs viejos exponen mayores cantidades de FS que los jóvenes (11).

En el presente trabajo continuamos abordando el papel del Ca^{2+} intracelular en la fagocitosis de los EHs por macrófagos profesionales y su modulación por el suero autólogo (SAL), a fin de discriminar la contribución de las diversas señales implicadas en el envejecimiento celular y diferenciarlas de aquellas asociadas a la eriptosis.

Se ha empleado como modelo de estudio la fagocitosis por macrófagos autólogos de los EHs cargados con Ca^{2+} , en presencia del sistema buffer Ca-EGTA y ausencia de Mg^{2+} (4,32).

La sangre proveniente de donantes sanos, fue recolectada en citrato de Na (3,8%), mezclada con solución salina isotónica glucosada (PBS) y fraccionada a través de un colchón de Ficoll-Hypaque (FH) (1,078 g/ml), como se reportó previamente (25). Una porción de sangre del mismo donante se conservó sin anticoagulante para la obtención de SAL. Este fue privado de IgG mediante adsorción a proteína A-Sefarosa CL-4B (3 mg proteína A/ml de gel), en proporción (vol:vol) 1 SAL + 2 gel, compactado a 12.000 xg, 15 min. La IgG fue posteriormente eluída con 0.1M ácido cítrico (pH 3.0) y neutralizada con 1M Tris-Cl (pH 9), siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Pharmacia). La isotonicidad de la fracción eluída de IgG fue restituida añadiendo (mM): 150 NaCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 y antibióticos (penicilina + estreptomycin). Las células mononucleares (banda en la interfase plasma-FH) se resuspendieron en medio RPMI-1640, conteniendo 10% suero fetal de ternera y antibióticos (100 U penicilina G/ml + 100 μg estreptomycin/ml). La suspensión se depositó sobre laminillas de vidrio ($\sim 3 \times 10^5$ cel/lam). Estas últimas se incubaron en placas de 6 pozos, por 24 h a 35°C en una atmósfera aire húmedo-5% CO_2 para promover la adhesión y maduración de los macrófagos. La viabilidad y capacidad macrofágica de las células mononucleares fueron evaluadas como se describió anteriormente (25). Los EHs (provenientes de la región más densa del sedimento fraccionado en FH) fueron expuestos al ionóforo A23187 (10 μM) con o sin 7 μM Ca^{2+} iónico (1 mM EGTA + CaCl_2 a concentraciones adecuadas) en un medio de Colina isotónica e incubados con agitación durante 30 min a 37°C. Inmediatamente, las células se lavaron sucesivamente en medios de Colina isotónica, conteniendo 2; 0,5 y 0% BSA para eliminar el ionóforo y finalmente, resuspendidas en un medio mínimo salino consistente de (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucosa, 10 Hepes (pH

7.4) y antibióticos (100 U penicilina G/ml + 100 µg estreptomycin/ml). Alícuotas de esta suspensión, suplementadas o no con SAL (30%), SAL privado de IgG (30%) o IgG (2 mg/ml) se depositaron sobre las laminillas anteriores (relación 30-50 EHs/macrófago) e incubaron durante 2 h a 35°C, en una atmósfera aire húmedo-5% CO₂. Después de lavar las laminillas, las células remanentes se fijaron (2,5% glutaraldehído) y tiñeron (Wright) por métodos convencionales. La magnitud de adhesión (fracción de macrófagos con EHs: adheridos + parcialmente ingeridos + enteramente fagocitados) se evaluó por análisis microscópico de 1000 macrófagos/condición. La efectividad del enlazamiento IgG-proteína A y posterior elución de IgG fue confirmada mediante electroforesis (SDS-PAGE).

La adhesión de los EHs cargados con Ca²⁺ (4,7±1,11%, n= 6) se duplicó al añadir SAL y casi triplicó en presencia de IgG o SAL libre de IgG. Estos resultados confirman experimentos previos que demuestran tanto la necesidad del Ca²⁺ intracelular para promover la eritrofagocitosis, como su potenciación por SAL (25). Asimismo, la potenciación de la fagocitosis por la IgG purificada, sugiere que SAL es requerido para este proceso por su contenido de IgG. Las evidencias anteriores claramente involucran a la IgG en la estimulación de la eritrofagocitosis por SAL. Ello es compatible con una interacción IgG-antígeno de senescencia (13) y/o con agregados de banda 3 (31). Su posible relación con el canal de Gárdos es una interrogante de gran importancia a considerar. Sorpresivamente, la presencia de SAL libre de IgG también potenció la fagocitosis, alcanzándose niveles similares a los de IgG. Se hace necesario ahondar en el efecto de SAL libre de IgG para aclarar la paradoja encontrada.

Agradecimientos

Al CDCH de la UCV (Proyecto N° PI-03-7272-2008) y FONACIT (PROYECTO PEI N° 2012-000767).

Referencias

- Allan, D. y Mitchell, R.H.** (1977). Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. **Biochem. J.** **166**: 495-499.
- Arese, P., Turrini, F. y Schwarzer, E.** (2005). Band 3/Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. **Cell Physiol. Biochem.** **16**: 133-146.
- Bitbol, M., Fellmann, P., Zachowski, A. y Devaux, P.F.** (1987). Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **904**: 268-282.
- Brajovich, M.L., Rucci, A., Acosta, I.L., Cotorruelo, C., García-Borrás, et al.** (2009). Effects of Aging on Antioxidant Response and Phagocytosis in Senescent Erythrocytes. **Immunological Investigations** **38**: 551-559.
- Boas, F.E., Forman, L. y Beutler, E.** (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 3077-3081.
- Bosman, G.J.C.G.M., Willekens, F.L.A. y Werre, J.M.** (2005). Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? **Cell Physiol. Biochem.** **16**: 1-8
- Ellory, J.C., Hall, A.C. y Stewart, G.W.** (1985). Volume-sensitive cation fluxes in mammalian red cells. **Mol. Physiol.** **8**: 235-246.
- Franco, R.S., Puchulu-Campanella, M.E., Barber, L.A., Palascak, M.B., Joiner, C.H., et al.** (2013). Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging. **Am. J. Hematol.** **88**: 44-51.
- Gárdos, G.** (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **30**: 653-654.
- Gárdos, G.** (1959). The role of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. **Acta Physiol. Hung.** **15**: 121-125.
- Ghashghaeinia, M., Cluitmans, J.C., Akel, A., Dreischer, P., Toulany, M., et al.** (2012). The impact of erythrocyte age on eryptosis. **Br. J. Haematol.** **157**: 606-614.
- Hall, A.C. y Ellory, J.C.** (1986). Evidence for the presence of volume-sensitive KCl transport in 'young' human red cells. **Biochim. Biophys. Acta** **858**: 317-320.
- Kay, M.M.B.** (1975). Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. **Proceed. Natl. Acad. Sci. USA** **72**: 3521-3525.
- Kiefer, C.R. y Snyder, M.L.** (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. **Current Op. Hematol.** **7**: 113-116.
- Kurbel, S., Dodig, K. y Radić, R.** (2002). The osmotic gradient in kidney medulla: a retold story. **Adv. Physiol. Educ.** **26**: 278-281.
- Lang, P.A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F. et al.** (2003). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis.

- Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** **285**: C1553-C1560.
17. **Leslie, R.G. y Nielsen, C.H.** (2004). The classical and alternative pathways of complement activation play distinct roles in spontaneous C3 fragment deposition and membrane attack complex (MAC) formation on human B lymphocytes. **Immunology** **111**: 86-90.
 18. **Lew, V.L., Daw, N., Etzion, Z., Tiffert, T., Muoma, A., et al.** (2007). Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. **Blood** **110**: 1334-1342.
 19. **Lutz, H.U. y Bogdanova, A.** (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. **Frontiers in Physiology**. doi: 10.3389/fphys.2013.00387.
 20. **Mollison, P.L.** (1962). The reticulo-endothelial system and red cell destruction. **Proc. Roy. Soc. Med.** **55**: 915-920.
 21. **Rifkind, R.A.** (1966). Destruction of injured red cells in vivo. **Am. J. Med.** **41**: 711-723.
 22. **Rifkind, J.M. y Nagababu, E.** (2013). Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging. **Antioxidants Redox Signaling** **18**: 2274-2283.
 23. **Romero, P.J.** (1978). Is the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel under metabolic control in human red cells? **Biochim. Biophys. Acta** **507**: 178-181.
 24. **Romero, P.J.** (2011). Calcium and cell ageing: The human red cell as a model. **Advances in Medicine and Biology** **24**: 1-133, (Berhardt L.V, ed.). Nova Science Pub., INC. ISBN 978-1-61209-796-1.
 25. **Romero, P.J. y Hernández-Ch, C.** (2014). ¿Desempeñan los canales de KCa algún papel en la eliminación de los eritrocitos viejos? **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **7**: 1-4. ISSN 1316-7510.
 26. **Romero, P.J. y Romero, E.A.** (1999). The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: A proposal. **Blood Cells Mol. Dis.** **25**: 9-19.
 27. **Romero, P.J., Romero, E.A. y Winkler B, M.D.** (1997). Ionic calcium content of light and dense human red cells separated by Percoll density gradients. **Biochim. Biophys. Acta** **1323**: 23-28.
 28. **Salzer, U., Hinterdorfer, P., Hunger, U., Borcken, C. y Prohaska, R.** (2002). Ca⁺⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. **Blood** **99**: 2569-2577.
 29. **Shiga, T., Sekiya, M., Maeda, N., Kon, K. y Okazawa, M.** (1985). Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **814**: 289-299.
 30. **Tiffert, T., Daw, N., Etzion, Z., Bookchin, R.M. y Lew, V.L.** (2007). Age decline in the activity of the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel of human red blood cells. **J. Gen. Physiol.** **129**: 429-436.
 31. **Turrini, F., Arese, P., Yuan, J. y Low, P.S.** (1991). Clustering of integral proteins of the human erythrocytes membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. **J. Biol. Chem.** **266**: 23611-23617.
 32. **Vaysse, J., Gattegno, L., Bladier, D. y Aminoff, D.** (1986). Adhesion and erythrophagocytosis of human senescent erythrocytes by autologous monocytes and their inhibition by (β-galactosyl derivatives. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 1339-1343.
 33. **Weed, R.I., La Celle, P.L. y Merrill, E.W.** (1969). Metabolic dependence of red cell deformability. **J. Clin. Invest.** **48**: 795-809.
 34. **Weiss, L.** (1962). The structure of fine splenic arterial vessels in relation to hemoconcentration and red cell destruction. **Amer. J. Anat.** **111**: 131-179.
 35. **Willekens, F.L., Werre, J.M., Groenen-Dopp, Y.A., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., de Pauw, B., et al.** (2008). Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? **Br. J. Haematol.** **141**: 549-556.
 36. **Woon, L.A., Holland, J.W., Kable, E.P. y Roufogalis, B.D.** (1999). Ca²⁺ sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. **Cell Calcium** **25**: 313-320.

Fraccionamiento de extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya L.* y su efecto sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*

CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA, LUIS M. RODRIGUEZ Y PEDRO J. ROMERO

Laboratorio de Fisiología de Membranas. Centro de Biología Celular.

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.

Correo-e: hernandezchinea@yahoo.com

Las especies del género *Leishmania* son protozoos parásitos que causan en humanos la enfermedad conocida como leishmaniasis. Las drogas empleadas en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad son altamente tóxicas y presentan una efectividad limitada. El desarrollo de nuevos medicamentos que reemplacen o complementen los utilizados en la actualidad es una tarea urgente. Una de las fuentes para la consecución de nuevas moléculas que permitan el desarrollo de nuevas terapias se encuentra en las plantas. *Carica papaya L.*, una especie perteneciente a la familia de las Caricáceas, es utilizada como tratamiento en regiones donde la leishmaniasis es endémica, pero hasta ahora no se ha reportado cual es el compuesto responsable de la actividad curativa de la enfermedad. Con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios responsables de la acción citotóxica sobre el parásito, se evaluó el efecto de las fracciones de extracto metanólico de semilla sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes de *Leishmania mexicana* y se observó mediante microscopía de contraste de fases el efecto sobre la morfología del parásito. Las fracciones obtenidas por cromatografía en sílica gel demostraron tener un efecto inhibitorio del crecimiento de los cultivos y causan alteraciones morfológicas típicas para cada fracción.

Introducción

El género *Leishmania* incluye varias especies de protozoos parásitos que causan la leishmaniasis. Esta enfermedad presenta diversas manifestaciones clínicas que van desde la forma cutánea hasta la visceral, siendo esta última la más mortal.

La leishmaniasis cutánea es la forma más común, presentándose alrededor de 1,5 millones de nuevos casos cada año a nivel mundial. Comprende un espectro variable de síntomas que van desde pequeñas lesiones cutáneas que pueden curar espontáneamente hasta la destrucción masiva del tejido mucoso (14).

El tratamiento clásico de la leishmaniasis requiere la administración de drogas que resultan ser tóxicas y poco toleradas por el paciente. Los antimoniales pentavalentes constituyen el tratamiento de primera escogencia tanto para la leishmaniasis visceral como para la cutánea. La Anfotericina B y la pentamidina son drogas de segunda línea que requieren largos períodos de administración parenteral (19). La resistencia de los parásitos a estos medicamentos convencionales reduce notablemente su eficacia (1,10), por lo que en las últimas décadas han surgido nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis. La miltefosina, un alquilfosfolípido, desarrollado como agente antineoplásico, resultó ser

efectivo como tratamiento oral de la leishmaniasis (18). La Sitamaquina para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (22) y el aminoglicosido Paromomicina para la leishmaniasis cutánea y visceral (2) han tenido un éxito parcial y están todavía muy lejos de ser drogas ideales para el tratamiento de esta enfermedad.

El desarrollo de nuevos medicamentos que reemplacen o complementen los utilizados en la actualidad es una necesidad urgente. Las investigaciones farmacéuticas de productos naturales derivados de plantas, representan una estrategia importante para el descubrimiento y desarrollo de drogas contra *Leishmania* (13,21).

La actividad biológica de extractos de plantas ha sido confirmada por la medicina tradicional y la etnobotánica (5,15). Reportes ancestrales dan pruebas sobre la efectividad de ciertas plantas en el tratamiento de la leishmaniasis (17).

Carica papaya L. es una especie originaria de América Central que pertenece a la familia de las Caricáceas. Las tribus indígenas de la Guyana Francesa (Teco y Wayapi) y Peru (Yanesha), regiones donde es endémica la leishmaniasis, utilizan diversas partes de la planta como tratamiento de la leishmaniasis (11,20). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado un estudio controlado sobre el efecto que extractos de semillas

y hojas tienen sobre el parásito ni tampoco cual es el compuesto o metabolito responsable de la actividad curativa de la enfermedad.

Extractos de Carica papaya L. con actividad antileishmanial

En nuestro laboratorio, como parte de la línea de investigación orientada al hallazgo de drogas para el tratamiento de la leishmaniasis, se estudia el efecto de extractos obtenidos de *Carica papaya L.* sobre *Leishmania mexicana*. Los resultados obtenidos indican que el extracto de las semillas de esta especie vegetal tiene una actividad citotóxica moderada sobre promastigotes de *L. mexicana* (4) y un elevado índice de selectividad hacia el parásito frente a la citotoxicidad evaluada en macrófagos (16).

Con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios responsables de la acción citotóxica sobre el parásito, se evaluó el efecto de fracciones de extracto metanólico de semilla sobre promastigotes de *L. mexicana*.

Actividad de fracciones de extractos metanólicos de semilla de C. papaya sobre promastigotes

Los extractos se obtuvieron de semillas previamente recolectadas, lavadas con agua destilada, desecadas en estufa a 40°C y pulverizadas en un molino casero. El polvo obtenido se maceró con metanol durante 48h, se filtró y se concentró por rotaevaporación a 50°C. El concentrado se adsorbió a gel de sílice y se colocó en una columna empacada con gel de sílice y equilibrada con isopropanol. Se cromatografió el extracto eluyendo secuencialmente con isopropanol, etanol, metanol y metanol:agua (8:2). Se recolectaron fracciones de 10 ml, se evaporaron en la estufa a 35°C y el sedimento de cada fracción se resuspendió en DMSO:H₂O (1:1).

La actividad inhibitoria de las fracciones se determinó mediante conteo celular en cámara de Neubauer. Los promastigotes se resuspendieron en medio T-Y suplementado con 5% de suero fetal de ternera, penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y se incubaron durante 48h a 25°C con extracto metanólico y con las fracciones obtenidas de la columna de sílica gel a una concentración de 5mg/ml. Como control se incubaron los parásitos con el mismo volumen de DMSO:H₂O (1:1) añadido en los ensayos con las fracciones.

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos de tres experimentos realizados por duplicado.

Se observó una inhibición mayor a 60% con las fracciones F1, F2 eluidas con isopropanol, F3 eluida con etanol y F7, F8 eluidas con metanol:H₂O. Sin embargo, el efecto inhibitorio de las fracciones es menor al observado con el extracto. Esto sugiere que los componentes o metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico pueden estar actuando aditiva o sinérgicamente.

La actividad citotóxica de las fracciones sobre los promastigotes es moderada, contrastando con el uso tradicional de esta planta en el tratamiento de las lesiones cutáneas presentes en la leishmaniasis. Se ha reportado la actividad inmunomoduladora de extractos de semilla de *C. papaya L.* (9) por lo que es esencial evaluar el efecto de los extractos y sus fracciones *in vivo* con la finalidad de determinar si la efectividad en el tratamiento de la parasitosis es debida tanto a la acción directa sobre el parásito como a la inducción de una respuesta inmune protectora por parte del hospedero.

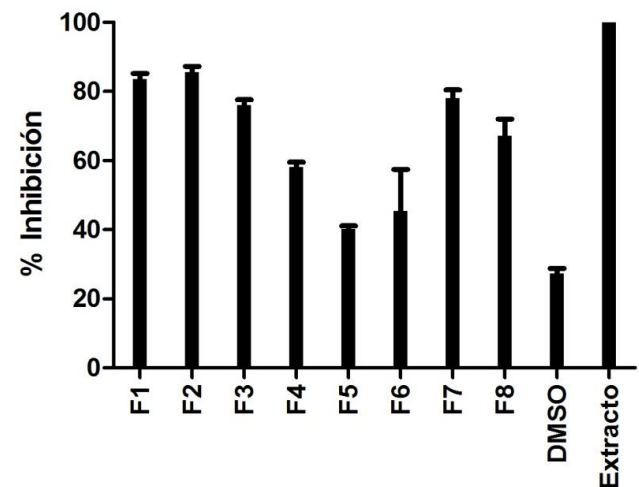


Figura 1. Efecto de fracciones del extracto metanólico sobre el crecimiento de los promastigotes. Se muestra el % de inhibición del extracto de semilla y de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel, eluidas con isopropanol (F1 y F2), etanol (F3 y F4), metanol (F5 y F6) y metanol-agua 1:1 (F7 y F8). Como control se evaluó el efecto del DMSO utilizado como disolvente de las muestras, a la misma concentración presente en los ensayos con el extracto crudo y las fracciones. Los datos son producto de tres experimentos realizados por duplicado.

Mediante microscopía de contraste de fases se evaluó el efecto de las fracciones con mayor actividad inhibitoria del crecimiento de los cultivos de promastigotes. Se observó que las fracciones eluidas

con isopropanol, etanol y metanol:H₂O provocaron alteraciones diferentes en los promastigotes. En los parásitos tratados con las fracciones de isopropanol (F1 y F2) se observaron alteraciones en la longitud del flagelo o la pérdida del mismo, así como la presencia de células vacuoladas y alteración de su forma alargada (Fig. 2b). Los promastigotes tratados con la primera fracción de etanol (F3) presentan alteraciones en el proceso de división celular. Las células parecen detenidas en la citocinesis, presentando formas aberrantes con dos o más flagelos (Fig. 2c). Los promastigotes tratados con las fracciones eluidas con metanol:H₂O (F7 y F8) adquirieron una forma redondeada con vacuolas grandes y se observaron células con estructuras peculiares que parecen extensiones delgadas de la membrana (Fig. 2d).

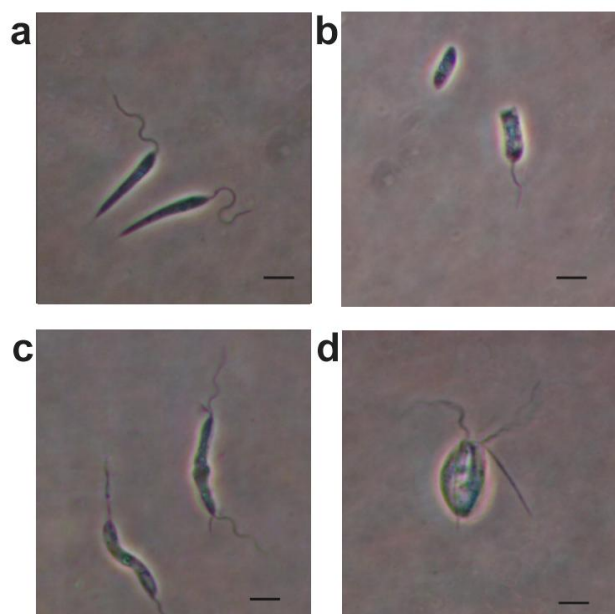


Figura 2. Cambios morfológicos producidos en promastigotes de *L. mexicana* por fracciones del extracto metanólico: Control (a), Fracciones de isopropanol (b), Fracción de etanol (F3) (c), Fracción de metanol:agua (F8) (d). Barra: 10µm.

Estos resultados indican que las fracciones de los extractos metanólicos afectan de manera diferente a los promastigotes. Las fracciones eluidas con isopropanol (F1 y F2), las cuales presentaron la mayor actividad inhibitoria del crecimiento de los cultivos de promastigotes, tienen un efecto preponderante sobre el flagelo y su movilidad. El efecto de extractos de semilla de *Carica papaya L.* sobre la movilidad flagelar ha sido demostrado en

células espermáticas de ratas, conejos, monos, perros y humanos (3,6,7,8,12). Este efecto sobre el flagelo es el responsable de las propiedades contraceptivas de las semillas de *C. papaya L.*

Aunque no se han realizado estudios sobre las alteraciones en la estructura del axonema flagelar de las células espermáticas, los metabolitos presentes en las semillas podría tener un efecto sobre el normal funcionamiento de las estructuras flagelares en general.

Conclusiones

Los resultados demuestran que el extracto metanólico crudo tiene mayor actividad leishmanicida que las fracciones obtenidas del mismo. Esto sugiere que los componentes o metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico pueden estar actuando aditiva o sinérgicamente.

Aunque la actividad citotóxica de las fracciones sobre los promastigotes es moderada, su evaluación *in vivo* es esencial, ya que se ha demostrado que muchos metabolitos secundarios pueden tener una actividad inmunomoduladora, pudiendo ser esta actividad la verdadera responsable de su efectividad en el tratamiento de la parasitosis.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, proyecto PI-03-8228-2011/1.

Referencias

1. Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.C. y Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** **195**: 1846-1851.
2. Croft, S.L., Yardley, V. y Kendrick, H. (2002). Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **96**: 127-129.
3. Goyal, S., Manivannan, B., Ansari, A.S., Jain, S.C. y Lohiya, N.K. (2010). Safety evaluation of long term oral treatment of methanol sub-fraction of the seeds of *Carica papaya* as a male

- contraceptive in albino rats. **J. Ethnopharmacol.** **127**: 286-291.
4. **Hernández-Chinea, C., Rodríguez, L.M. y Romero P.J.** (2014). El potencial de los metabolitos secundarios de *Carica papaya* para el desarrollo de drogas contra la leishmaniasis. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **7**: 5-8.
 5. **Iwu, M.M., Jackson, J.E. y Schuster, B.G.** (1994). Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol. Today** **10**: 65-68.
 6. **Lohiya, N. K., Pathak, N., Mishra, P. K., & Manivannan, B.** (1999). Reversible contraception with chloroform extract of *Carica papaya* Linn. seeds in male rabbits. **Reproductive Toxicology** **13**: 59-66.
 7. **Lohiya, N. K., Kothari, L. K., Manivannan, B., Mishra, P. K., y Pathak, N.** (2000). Human sperm immobilization effect of *Carica papaya* seed extracts: an in vitro study. **Asian J. Andrology** **2**: 103-110.
 8. **Lohiya, N.K., Manivannan, B., Goyal, S. y Ansari, A.S.** (2008). Sperm motility inhibitory effect of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in langur monkey, *Presbytis entellus entellus*. **Asian J. Androl.** **10**: 298-306.
 9. **Mojica-Henshaw, M.P., Francisco, A.D., De Guzman, F. y Tigno, X.T.** (2003). Possible immunomodulatory actions of *Carica papaya* seed extract. **Clin. Hemorheol. Microcirc.** **29**: 219-229.
 10. **Natera, S., Machuca, C., Padrón-Nieves, M., Romero, A., Díaz, E. y Ponte-Sucre, A.** (2007). *Leishmania* spp: proficiency of drug-resistant parasites. **Int. J. Antimicrob. Agents** **29**: 637-642.
 11. **Odonne, G., Berger, F., Stien, D., Pierre Grenand, P. y Bourdy, G.** (2011). Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi Indians. **J. Ethnopharmacol.** **137**: 1228-1239.
 12. **Ortega-Pacheco, A., Jimenez-Coello, M., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Gutierrez-Blanco, E., Luna-Flores, W.S., Zavala-Sanchez, M.A., Gonzalez-Robles, A. y Perez-Gutierrez, M.S.** (2011). Effects of papaya seeds extract on the sperm characteristics of dogs. **Anim. Reprod. Sci.** **129**: 82-88.
 13. **Rates, S.M.** (2001). Plants as source of drugs. **Toxicon** **39**: 603-613.
 14. **Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. y Brooker, S.** (2007). Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** **7**: 581-596.
 15. **Rocha, L.G., Almeida, J.R., Macedo, R.O. y Barbosa-Filho, J.M.** (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** **12**: 514-535.
 16. **Rodríguez, L.M.** (2015). Efecto de extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, UCV.
 17. **Seidi, Z.** (2014). The evaluation of herbal medicine efficacy on cutaneous Leishmaniasis. **Rev. Clin. Med.** **1**: 109-114.
 18. **Sindermann, H. y Engel, J.** (2006). Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **100**: 17-20.
 19. **Tiuman, T.S., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P. y Nakamura, C.V.** (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int. J. Infect. Diseases** **15**: e525- e532.
 20. **Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán-Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F. A., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D. y Bourdy, G.** (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **J. Ethnopharmacol.** **123**: 413-422.
 21. **Wang, J., Peng, Q. y Li, G.** (2009). New compounds of natural resources in 2008. **Afr. J. Biotechnol.** **8**: 4299-4307.
 22. **Wasunna, M.K., Rashid, J.R., Mbui, L., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J.M., Sabin, A.J., Albert, M.J. y Horton J.** (2005). A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **73**: 871-876.

Proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*

MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES¹, MILAGROS MÉNDEZ², EVA VONASEK²,
PEDRO J. ROMERO¹ Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA¹

¹Laboratorio de Fisiología de Membranas, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela y ²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. Centro de Biología Estructural. Unidad de Proteómica. Email: mariac.perez@ciens.ucv.ve

Para la supervivencia y transmisión de las diferentes especies de *Leishmania* dentro de sus células dianas, estas requieren de factores proteicos que interactúen y modifiquen los ambientes intracelulares de dichas células. Durante la última década, varios enfoques se han aplicado al estudio de las proteínas exportadas por organismos parasitarios en etapas particulares de su ciclo de vida. Al conjunto de proteínas exportadas al exterior celular en condiciones definidas se les denomina exoproteoma. Diferentes proteasas en *Leishmania* han sido vinculadas como factores de virulencia. Actualmente, es poca la información existente sobre proteasas presentes en el exoproteoma que pudieran estar asociadas con el proceso de infección y mantenimiento del parásito. Por tal motivo, nuestro objetivo es el de profundizar en la identificación de proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, con el fin de establecer comparaciones entre ambos. Mediante técnicas de espectrometría de masas hemos identificado varias familias de proteasas en promastigotes, siendo las más abundantes las familias de las metalo y cisteín proteasas. La identificación y caracterización de proteasas exportadas por este parásito, permitirá evaluar su participación en mecanismos de mantenimiento y supervivencia del parásito en la célula huésped.

Introducción

Los parásitos tripanosomatídios del género *Leishmania*, son los agentes causantes de las diferentes manifestaciones clínicas conocidas como leishmaniasis. Dependiendo de la especie del parásito implicada, las infecciones pueden ir desde lesiones leves en la piel hasta infecciones fatales a nivel visceral (7). Se estiman actualmente 12 millones de personas afectadas por esta enfermedad a nivel mundial, con una posible incidencia de 2 millones de casos nuevos anuales en zonas tropicales, subtropicales y en la cuenca mediterránea (16). El control eficiente de la leishmaniasis ha sido obstaculizado por la ausencia de una vacuna, la eficacia limitada de fármacos de primera línea y el aumento de la transmisión como resultado de coinfecciones con el VIH (4). Por tal motivo, una comprensión detallada de todos los aspectos involucrados en los procesos biológicos del parásito permitirá formular nuevas estrategias antiparasitarias (12).

Las diferentes formas morfológicas presentes en el ciclo de vida de *Leishmania* (promastigote en el insecto vector y amastigote en la vacuola fagolisosomal de células de mamíferos infectados), representan una adaptación del parásito a las diferentes condiciones ambientales dentro de sus dos hospedadores. Es decir, los parásitos requieren de factores proteicos que interactúen y modifiquen los ambientes intracelulares en los cuales se desarrollan

(12). Estas proteínas exportadas, garantes del proceso infeccioso, desempeñan un papel activo en las primeras interacciones huésped-parásito. Al conjunto de proteínas extracelulares liberadas de un organismo en condiciones definidas se le denomina exoproteoma (3,17).

Importancia de las proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania* en el proceso de integración hospedador-parásito

Durante el ciclo de vida de *Leishmania*, la supervivencia del parásito es garantizada gracias a las diferentes estrategias con que éste cuenta para contrarrestar los mecanismos de defensa de la célula huésped (3). Actualmente hay evidencias de que tanto promastigotes como amastigotes, son capaces de exportar al citoplasma de la célula huésped proteasas que modulan directamente las diferentes rutas de señalización celular del hospedador (9). Diferentes proteasas han sido identificadas en los exoproteomas de *Leishmania donovani* (14) y *Leishmania infantum* (12). Entre estas, cabe destacar: **1.** La Leishmanolisina o GP63, endoproteasa que comparte características con las metaloproteasas de mamíferos y es la proteína de superficie más abundante en promastigotes (18). A esta se le adjudica un rol central en los procesos de invasión tanto en las células epiteliales del vector como en el hospedador vertebrado (13). **2.** La cisteín proteasa B (CP-B) (5) y **3.** Una serín proteasa (1,2), ambas asociadas con

procesos de virulencia, invasión celular y la interacción hospedador-parásito.

Dada la importancia de las proteasas secretadas en los procesos adaptativos y de sobrevivencia en varias especies de *Leishmania* (9), se proponen como potenciales candidatas responsables del mantenimiento del parásito en la célula hospedera. Por tal motivo, nuestro interés es el de profundizar en la identificación de las proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*, como primer paso para establecer diferencias con las proteasas exportadas por amastigotes de la misma especie, a fin de identificar cuáles de ellas son específicas de cada estadio del parásito.

Proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de Leishmania mexicana

Trabajos previos realizados en el laboratorio, nos han permitido demostrar la presencia de la actividad proteolítica de varias familias de peptidasas en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* (10). Interesantemente, hemos evidenciado un patrón proteolítico diferencial entre ambos estadios (10,11). Sugiriéndose con ello, la exclusividad de exportación de proteasas en los diferentes ambientes en que se desarrolla el parásito. Sin embargo, dada la baja expresión de estas peptidasas, la identificación de las mismas mediante técnicas de bioquímica clásica se hace muy difícil. Por tal motivo, nos hemos propuesto identificar las proteasas presentes en el exoproteoma mediante técnicas de proteómica como la espectrometría de masa, la cual gracias a su alta sensibilidad permite identificar proteínas presentes con un bajo número de copias (6).

Para proceder a la identificación de las proteínas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*, promastigotes de la cepa Bel21, en fase estacionaria de crecimiento, fueron incubados durante 24 h a temperatura ambiente en medio RPMI libre de suero (2×10^8 células/ml). Posteriormente los parásitos fueron removidos por centrifugación. Las proteínas presentes en el exoproteoma fueron precipitadas con metanol y se prepararon para su análisis por espectrometría de masas de tipo LC-MS/MS (Orbitrap). Los resultados obtenidos fueron analizados con el servidor de identificación de proteínas (MASCOT) utilizando las bases de datos SwissProt y NCBIInr. La lista de genes identificados, fue clasificada según su función biológica y tipo de proteína, mediante el programa "Gene Ontology Consortium/PANTHER" utilizando la base de datos de *Leishmania major* (8).

Bajo nuestras condiciones de estudio, se lograron identificar 124 proteínas en los productos excretados por promastigotes (Fig. 1). La caracterización de las proteínas en base a su función biológica (Fig. 1A), indica que la mayoría presentan función catalítica (59%) seguida de función de unión (22%) y función estructural (5%).

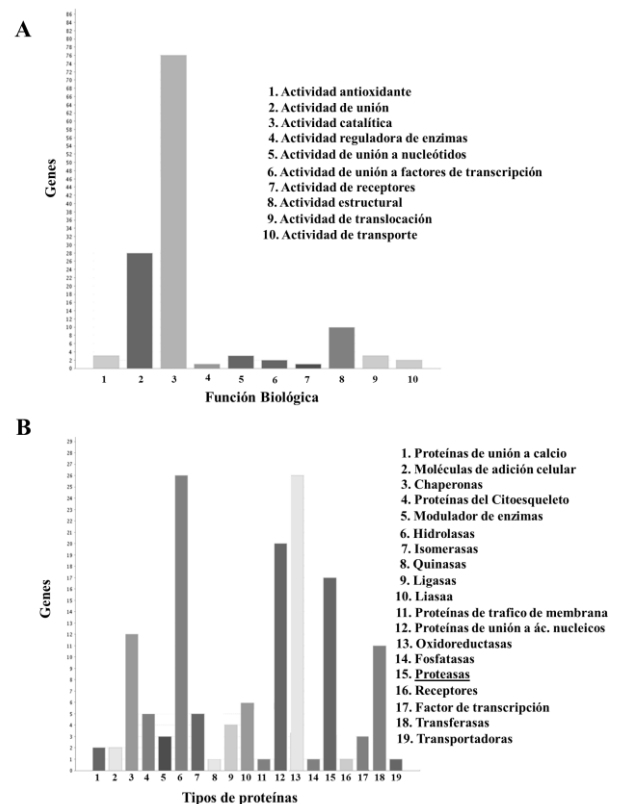


Figura 1. Clasificación de las proteínas presentes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*. **A.** En base a su función biológica. **B.** En base al tipo de proteínas. La clasificación de proteínas identificadas por espectrometría de masas fue realizada utilizando el programa "Gene Ontology Consortium/ PANTHER" (8).

Con respecto a la clasificación según el tipo de proteínas (Fig. 1B), las oxidoreductasas e hidrolasas resultaron ser las más abundantes (18%) seguidas de las proteínas de unión a nucleótidos (14%). Por su parte, las proteasas ocuparon la cuarta posición en abundancia (12%), siendo las familias de las metalo y cisteín proteasas las más abundantes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Fig. 2). Las proteasas fueron identificadas mediante su análisis a través de relaciones evolutivas utilizando el programa "PANTHER" (8). El número de identificación del gen (GI), los pesos moleculares

aparentes y función molecular de las proteasas identificadas, se resumen en la Tabla 1.

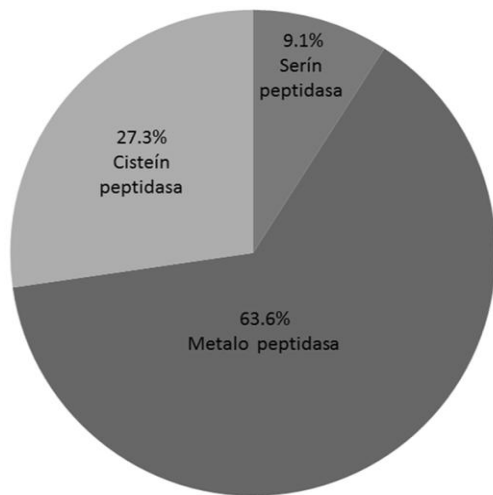


Figura 2: Familias de proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. La clasificación de las familias de proteasas identificadas por espectrometría de masas fue realizada utilizando el programa “Gene Ontology Consortium/PANTHER” (8).

Tabla 1. Proteasas identificadas en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Nombre ID <i>L. mexicana</i>	Familia	PM KDa	Función molecular (GO)
Oligopeptidasa b GI:401416529	Serín peptidasa, Clan SC, Familia S9A	83.4	•Serín peptidasa.
Cisteín proteinasa B GI:1730100	Cisteín peptidasa B tipo catepsina, Familia C1	47.7	•Cisteín peptidasa. •Primordialmente expresada en amastigotes.
4-methyl-5(beta-hidroxiethyl)-tiazol monofosfato GI:401425479	Cisteín peptidasa	20.5	•Cisteín peptidasa. •Factor de transcripción. •Péptido de unión al DNA y RNA.
Cisteín peptidasa tipo Calpaina Putativa GI:401424277	Cisteín peptidasa Clan CA, Familia C2	48.8	•Cisteín peptidasa. • Péptido de unión a Ca ²⁺ •Péptido de interacción con Calmodulina y con fosfolípidos dependiente de Ca ²⁺ .
Metallo peptidasa GI:401415676	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M1	96.3	•Metallo peptidasa.
GP63, Leishmanolisina GI:401416776 GI:401416778	Leishmanolisina	69.5 63.6	•Metallo peptidasa.
N-acil-L-aminohidrolasa Putativa GI:401426292	N-acil-L-amino aminohidrolasa Putativa	43.7	•Metallo peptidasa. •Actividad deacetilasa.
Peptidil dipeptidasa Putativa GI:401414348	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M3	76.4	•Metallo peptidasa.
Dipeptidil-peptidasa III GI:401414979	Metallo peptidasa, Clan M-, Familia M49	75.6	•Metallo peptidasa.
Oligopeptidasa putativa GI:401423944	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M3	76.9	•Metallo peptidasa.

En escala creciente de grises se indica el tipo de familia de proteasa identificada (serín, cisteín y metallo peptidasas, respectivamente).

Cabe destacar que además de la Leishmanolisina (GP63), la Cisteín peptidasa B y la Oligopeptidasa b, previamente identificadas como proteasas excretadas e importantes factores de virulencia (15), logramos identificar siete proteasas putativas cuya función como factor de virulencia aún se desconoce (Tabla 1).

En estos momentos nuestros esfuerzos están dirigidos a la identificación de proteasas en el exoproteoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*, con el fin de establecer posibles diferencias en cuanto a los mecanismos de mantenimiento y supervivencia del parásito dentro de sus dos hospedadores. Ello conduciría a establecer posibles nuevos blancos quimioterapéuticos que pudieran permitir el control de las enfermedades generadas por esta familia de parásitos.

Referencias

1. Choudhury, R., Bhaumik, S., De, T. y Chakraborti, T. (2009). Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.* **320**: 1-14.
2. Choudhury, R., Das, P., Bhaumik, S.K., De, T. y Chakraborti, T. (2010). In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**: 660-667.
3. Corrales, R., Sereno, D. y Mathieu-Daude F. (2010). Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**: 27-38.
4. Croft, S., Sundar, S. y Fairlamb, A. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 111-126.
5. Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. y Olivier, M. (2011). Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PloS One* **6**: 1-10.
6. Lin, D., Tabb, D. y Yates, J. (2003). Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1646**: 1-10.
7. McMahon-Pratt, D. y Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol. Rev.* **201**: 206-224.

8. **Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. y Thomas, P.** (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature Protocols** **8**: 1551-1566.
9. **Mottram, J., Coombs, G. y Alexander, J.** (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology** **7**: 375-381.
10. **Pérez-Gordones, M.C., Romero, P.J. y Hernández-Chinea, C.** (2012). Estudio de factores proteolíticos excretados por amastigotes de *Leishmania*. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **6**: 9-12.
11. **Pérez-Gordones, M.C., Romero, P.J. y Hernández-Chinea, C.** (2014). Análisis de la actividad proteolítica presente en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **7**: 9-12.
12. **Santarém, N., Racine, G., Silvestre, R. Cordeiro-da-Silva, A. y Ouellette, M.** (2013). Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. **Journal of Proteomics** **84**: 106-118.
13. **Santos, A., Branquinha, M.H. y D`Avila-Levy, C.M.** (2006). The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Cienc.** **78**: 687-714.
14. **Silverman, M., Chan, S., Robinson, D., Dwyer, D., Nandan, D., Foster, L. y Reiner, N.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology** **9**: R35 1-21.
15. **Silvia-Almeida, M., Santini, A., Lopes, M., y Roberto, C.** (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp.* Infection in mammals **Parasites & Vectors** **5**: 160-170.
16. **Stuart, K., Brun, R. y Croft, S.** (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** **118**: 1301-1310.
17. **Tonui, W., Mejia, J., Hochberg, L., Mbow, M., Ryan, J. y Chan A.** (2004). Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*. **Infect. Immun.** **72**: 5654-5661.
18. **Yao, C.** (2010). Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? **Infect. Immun.** **78**: 22-31.

Reutilización de drogas aprobadas contra otras enfermedades, para el tratamiento la leishmaniasis

VERÓNICA GARCÍA^{1,2}, VANESSA HERNÁNDEZ², JESSICA RODRÍGUEZ², ANDREA PINTO^{1,2} Y GUSTAVO BENAİM^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, y

²Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Carretera Nacional de Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas. Caracas – Venezuela.

Correo-e: gbenaim@gmail.com

La leishmaniasis es una enfermedad que representa un problema de salud pública a nivel mundial. Las drogas utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad son tóxicas. Esto impulsa la investigación para el descubrimiento de nuevas drogas contra la leishmaniasis. Teniendo en cuenta que este proceso consume tiempo y es costoso, la reutilización de drogas concebidas originalmente para otros fines es una aproximación atractiva para el desarrollo de nuevos tratamientos para la leishmaniasis. Drogas como la miltefosina y la amiodarona, que se utilizaron para el tratamiento del cáncer y como antiarrítmico, respectivamente, tienen actividad leishmanicida mediante la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular del parásito. Es por esto que nos propusimos determinar el efecto del SQ109, antibiótico contra la tuberculosis y que tiene actividad contra *Trypanosoma cruzi*, sobre *L. mexicana*. Demostramos que el SQ109 afecta la supervivencia de promastigotes de *L. mexicana* y disminuye el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana* con un IC_{50} de 11.2 nM, siendo parte de su mecanismo de acción la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, producto de la liberación de este catión de la mitocondria y los acidocalcisomas. Todos estos resultados indican que el SQ109 es una potencial droga leishmanicida.

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. Es transmitida al ser humano por la picadura de flebótomos (5), y menos frecuentemente mediante transmisión congénita y parenteral (transfusión de sangre, jeringas compartidas y accidentes de laboratorio) (11). Según La Organización Mundial de la Salud (2013), esta enfermedad representa un problema de salud pública a nivel mundial, afectando principalmente a las poblaciones más pobres del mundo.

Leishmania posee características morfológicas y moleculares diferentes, según sea el hospedador. En el intestino del vector invertebrado, el parásito se encuentra en forma de promastigote móvil el cual posee un flagelo libre que se sitúa por delante del kinetoplasto (estructura constituida de ADN y presente en la mitocondria del parásito). En el huésped vertebrado, el parásito se transforma en amastigote de localización intracelular, flagelo corto (no libre) y forma redonda (2). Cabe destacar que esta última es la forma clínicamente relevante del parásito debido a que es el causante directo de todos los síntomas de la enfermedad, por lo que sería conveniente que cualquier quimioterapia alternativa contra la leishmaniasis se base en la eliminación de

este estadio del parásito (5). La amplia variedad de especies de *Leishmania* responsables de la leishmaniasis, combinada con la respuesta inmunitaria del hospedador, resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas (17): leishmaniasis cutánea (localizada o difusa), leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, siendo esta última la que causa mayor mortalidad en humanos.

El Ca^{2+} ha sido ampliamente reconocido como un mensajero esencial en todos los eucariotas, desde protozoarios hasta mamíferos (5). Estos últimos son capaces de mantener una concentración citosólica de Ca^{2+} libre muy reducida (alrededor de 100 nM) en presencia de una concentración extracelular de Ca^{2+} mucho mayor (1-2 mM). Este hecho implica la presencia de diferentes mecanismos de transporte que permitan mantener dicho gradiente de concentración, algunos de ellos localizados en organelos intracelulares y otros en la membrana plasmática (3). En los tripanosomatidios tres organelos contribuyen con la regulación del Ca^{2+} intracelular: un gran mitocondrion, capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} , siendo la fuerza que dirige la acumulación de este catión el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna (4), un retículo

endoplasmático y unas vacuolas ácidas denominadas acidocalcisomas (20), asociadas a la bioenergética del parásito, ya que constituye un depósito de polifosfatos y pirofosfatos, que son una fuente alternativa de energía en estos parásitos e incluso más abundantes que el ATP. En los acidocalcisomas se acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} (5). La disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} en cualquier célula, usualmente tiene efectos letales que conducen a la muerte celular mediante apoptosis o necrosis (21). Lo anterior, junto con diferencias importantes descubiertas recientemente entre los mecanismos de regulación del Ca^{2+} de parásitos y humanos, nos permite sugerir que la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos podría ser una estrategia racional prometedora como blanco de nuevas drogas (5).

Los fármacos de primera línea utilizados en Venezuela y en gran parte del mundo para tratar la leishmaniasis siguen siendo los mismos desde hace más de 60 años: los antimoniales pentavalentes, el glucantime y el pentostam. Ambos medicamentos causan graves efectos secundarios en los pacientes y las distintas especies de *Leishmania* presentan diversos grados de susceptibilidad a estas drogas (1,13). Es por esto que existe un creciente interés en el descubrimiento de nuevas drogas con actividad leishmanicida. Debido a que el desarrollo de nuevas drogas consume tiempo y es costoso, encontrar nuevos usos para drogas existentes (un proceso conocido como reutilización de drogas o reposicionamiento) surge como una aproximación atractiva para el desarrollo de nuevas terapias para la leishmaniasis. Debido a que la seguridad, la eficacia y la toxicidad de una droga existente han sido ampliamente estudiadas, la reutilización de una droga ahorra tiempo y dinero en comparación con el proceso de síntesis de una droga *de novo* (14).

La miltefosina, una droga que se utilizó para el tratamiento del cáncer de mama (7), es activa por vía oral y es el mayor avance reciente en la batalla contra la leishmaniasis. Aunque originalmente se definió su mecanismo de acción como un inhibidor de la síntesis de la fosfatidilcolina (12,18), hemos demostrado que este compuesto también afecta la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de *Leishmania mexicana*, al inducir un incremento de la concentración de este ion mediante la activación de un canal de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática (16).

En 2009 reportamos que la amiodarona, un antiarrítmico ampliamente utilizado para el tratamiento de pacientes con mal de Chagas que presentan cardiomiopatía chagásica, tiene efecto

tripanocida a través de la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, como consecuencia de la liberación de este catión de la mitocondria y de los acidocalcisomas (15). Sin embargo, la presencia de un 2,5-diiodofenil en su estructura, la cual ha estado asociada con efectos secundarios no deseados relacionados a una toxicidad tiroidea, hace que su uso prolongado como antiarrítmico se convierta en una dificultad terapéutica. Por este motivo se sintetizó la dronedarona, un derivado de la amiodarona, en la cual se reemplaza la estructura 2,5-diiodofenil con un grupo fenil sustituto y se incorpora un grupo metil sulfonil, lo cual permitió la reducción de la toxicidad tiroidea, así como la alta hidrofobicidad de la droga parental. La dronedarona también afecta la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, al afectar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular del parásito como consecuencia de la liberación de este ion de organelos intracelulares, tales como la mitocondria y los acidocalcisomas (6).

Recientemente se reportó que el SQ109 (Figura 1), droga que se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples drogas (8), tiene actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, siendo parte de su mecanismo de acción el colapso del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi* (19). Por esta razón nos planteamos estudiar el efecto del SQ109 sobre *Leishmania mexicana*.

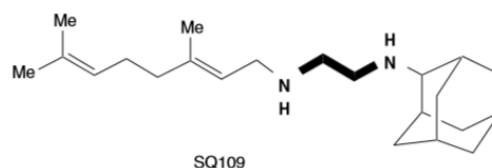


Figura 1: Estructura molecular del SQ109.

Los resultados obtenidos muestran que el SQ109 tiene un efecto dosis dependiente sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* (Figura 2), con una concentración mínima inhibitoria de 5 μM y un IC_{50} (calculado luego de 48 del tratamiento de los parásitos con SQ109) de 0,35 μM (9). Adicionalmente luego de 24 horas del tratamiento de promastigotes de *L. mexicana* con SQ109 (5 y 10 μM) los parásitos pierden la movilidad y adoptan una forma redondeada.

Además de afectar la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, el SQ109 disminuye el porcentaje

de macrófagos de la línea celular J774 infectados

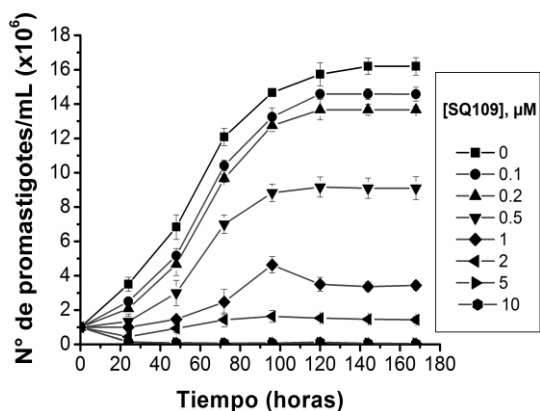


Figura 2: Efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.

con amastigotes de *L. mexicana* de una forma dosis-dependiente (curva inferior de la figura 3), obteniéndose un efecto máximo inhibitorio a una concentración de 1 μM y un IC_{50} de 11,2 nM (9), el cual es inferior al obtenido sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (1,2 μM). Adicionalmente, no se observó un efecto significativo sobre los macrófagos murinos en el rango de concentraciones utilizadas en este experimento (curva superior de la figura 3).

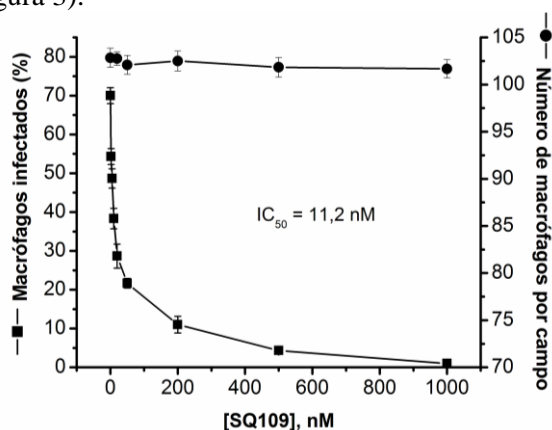


Figura 3: Efecto del SQ109 sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

Con el objeto de determinar el posible mecanismo de acción del SQ109 en estos tripanosomatidios, evaluamos el efecto de esta droga sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. La relación 340/380 nm es directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} intracelular (10). Obtuvimos que el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de los parásitos tanto en presencia (Figura 4A) como en ausencia de

Ca^{2+} extracelular (Figura 4B). Aún más, la pendiente del incremento en ambos casos es la misma (9). Esto indica que este incremento es debido a la liberación de este catión de compartimientos intracelulares.

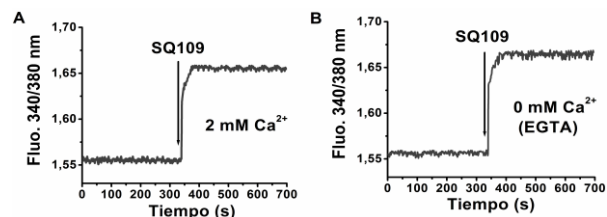


Figura 4: Efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana* tanto en presencia (A) como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA). Se representa la relación de fluorescencia (Fluo.) 340/380 nm (Unidades arbitrarias) en función del tiempo en segundos.

Debido a que la mitocondria y los acidocalcisomas son algunos de los organelos involucrados en la regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidios, evaluamos el efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. En la Figura 5A se observa que el SQ109 (5 μM) colapsa el potencial electroquímico mitocondrial de estos parásitos (9) sin observarse un efecto posterior del protonóforo FCCP (2 μM).

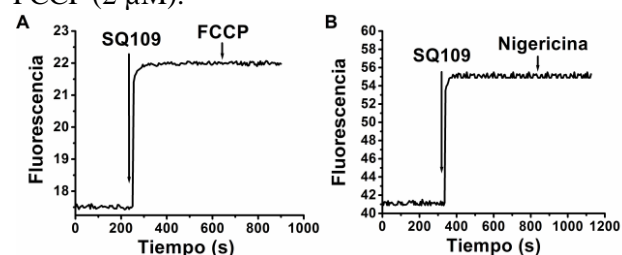


Figura 5: (A) Efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial y (B) sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Se representa la fluorescencia (Unidades arbitrarias) en función del tiempo en segundos.

Por otro lado, el SQ109 (10 μM) alcaliniza completamente los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana* (Figura 5B), pues no se observa un efecto posterior de la nigericina, un intercambiador K^+/H^+ que alcaliniza completamente los acidocalcisomas de estos organismos (6). Estos resultados indican que parte del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular es con alta probabilidad debido a la liberación de este catión de

la mitocondria y los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.

Todos estos resultados tomados en conjunto demuestran que el SQ109 es una droga con alto potencial leishmanicida.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos CDCH-UCV C-03-8728-2013/2 y FONACIT 2011000884.

Referencias

1. **Alvar, J.** (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: The first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.** **10**: 298-319.
2. **Becerril, M.** (2011). Parasitología médica. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., Tercera Edición, Distrito Federal, México.
3. **Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P., Laurentin, A.** (1993). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca^{2+} -ATPase. **Biol. Res.** **26**: 141-150.
4. **Benaim, G., Cervino, V.** 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling in Trypanosomatids. **Elect. J. Pathol. Histol.** **6**: 1-11.
5. **Benaim, G., Garcia, C.** (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas disease and leishmaniasis - a review. **Trop. Biomed.** **28**: 471-481.
6. **Benaim, G., Casanova, P., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, Parra-Giménez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J. y colaboradores.** (2014). Dronadronone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **58**: 2295-2303.
7. **Eibl, H., Unger, C.** (1990). Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer. Treat. Rev.** **17**: 233-242.
8. **Engohang-Ndong, J.** (2012). Antimycobacterial drugs currently in Phase II clinical trials and preclinical phase for tuberculosis treatment. **Expert Opin. Investig. Drugs.** **21**: 1789-1800.
9. **García-García, V., Oldfield, E. y Benaim, G.** (2016) Inhibition of *Leishmania mexicana* Growth by the Tuberculosis Drug SQ109. **Antimicrob. Agents Chemother.** **60**: 6386-6389
10. **Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.** (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J Biol. Chem.** **260**: 3440-3450.
11. **Herwaldt, B.** (1999). Leishmaniasis. **Lancet.** **354**: 1191-1199.
12. **Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., Opperdoes, F.** (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid analog. **Mol. Biochem. Parasitol.** **111**: 1-14.
13. **Pandey, S., Suryawanshi, S., Gupta, S., Srivastava, L.** (2005). Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. **Eur. J. Med. Chem.** **40**: 751-756.
14. **Sbaraglini, M., Vanrell, M., Bellera, C., Benaim, G., Carrillo, C., Talevi, A., Romano, P.** (2016). Neglected tropical protozoan diseases: Drug repositioning as a rational option. **Curr. Top. Med. Chem.** **16**: 1-22.
15. **Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G.** (2009a). Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{2+} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **53**: 1403-1410.
16. **Serrano, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J., Mendoza, A., Benaim, G.** (2009b). Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania Mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **53**: 5108-5113.
17. **Silva-Jardim, I., Thiemann, O., Anibal, F.** (2014). Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: A critical review. **J. Braz. Chem. Soc.** **25**: 1810-1823.
18. **Urbina, J.** (2006). Mechanism of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **100**: S9-S16.
19. **Veiga-Santos, P., Li, K., Lameira, L., de Carvalho, T., Huang, G., Galizzi, M., Shang, N., Li, Q., Gonzalez-Pacanowska D., Hernández-Rodríguez, V., Benaim, G., Guo, R., Urbina, J., Docampo, R., de Souza, W., Oldfield, E.** (2015). SQ109, a New drug lead for Chagas Disease. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **59**: 1950-1961.
20. **Vercesi, A., Moreno, S., Docampo, R.** (1994). $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **Biochem. J.** **304**: 227-233.
21. **Zhivotovsky, B., Orrenius, S.** (2011). Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. **Cell Calcium** **50**: 211-221.

Nuevas drogas de origen vegetal contra la leishmaniasis. Efecto de un nuevo flavonoide aislado de *Iresine diffusa* contra *Leishmania mexicana*

YETSENIA DE GOUVEIA^{1,2}, VANESSA HERNÁNDEZ², JESSICA RODRÍGUEZ², ALÍRICA SUÁREZ³ Y GUSTAVO BENAİM^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ²Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas – Venezuela. ³Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correo-e: gbenaim@reacciun.ve

El hemoflagelado *Leishmania* es el causante de la leishmaniasis, la cual dependiendo de la especie infectante, puede generar tres patrones clínicos: leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral. Es una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo y afecta principalmente a los países más pobres. El tratamiento actual para dicha enfermedad se basa en el uso de los antimoniales pentavalentes (glucantime y pentostam), así como las drogas de segunda línea. Sin embargo, estas drogas poseen efectos tóxicos para los pacientes y algunos parásitos ofrecen resistencia a las mismas. Varios investigadores han orientado sus esfuerzos en estudiar nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad, realizando diversos estudios con compuestos de origen natural, con el fin de conseguir una acción parasiticida con baja toxicidad en humanos. En este trabajo, nos propusimos estudiar el efecto del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3), aislado de *Iresine diffusa* (variedad de Valeriana), sobre *Leishmania mexicana*. Obtuvimos un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y disminución del porcentaje de macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*, observando también alteración sobre la concentración intracelular del Ca^{2+} . Los resultados permiten sugerir que el compuesto modificado químicamente podría ser la base de un futuro tratamiento en contra de esta enfermedad.

Introducción

La familia Trypanosomatidae comprende diferentes parásitos causantes de importantes enfermedades en humanos y otros mamíferos. Uno de ellos es *Leishmania* sp, un protozooario hemoflagelado intracelular obligatorio, el cual posee dos formas: promastigote y amastigote, siendo éste la forma clínicamente relevante. En este sentido, según la especie de *Leishmania* se puede producir una infección cutánea, mucocutánea o visceral, siendo esta última la que presenta mayor mortalidad en humanos. En nuestro país, se ha reportado casos para *L. mexicana* (12), la cual es el agente etiológico de la forma cutánea (16) y mucocutánea (17). Unas 350 millones de personas están expuestas al riesgo de contraer la enfermedad en 88 países del mundo, en su mayoría se trata de personas en situación de pobreza en áreas de escasos recursos económicos o con mala distribución de sus riquezas (13).

Los tripanosomatidios poseen una red de señalización dependiente del Ca^{2+} , que incluye mecanismos para el aumento del Ca^{2+} citosólico, y también para regresar esta concentración a su nivel basal (5). Este catión juega un papel crucial en la regulación de muchos procesos importantes para la viabilidad celular. A nivel de la membrana plasmática, ha sido reportado que una Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) es estimulada por calmodulina en *T. cruzi*, *T. brucei* y diferentes especies de *Leishmania* (2,3,4). En todos estos parásitos, la regulación del Ca^{2+} citoplasmático es realizado por tres organelos: el retículo endoplasmático, la

única mitocondria presente en estos parásitos y el acidocalcisoma, un organelo ácido capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} e involucrado en la bioenergética del parásito (5).

Desde el punto de vista terapéutico, los fármacos actualmente recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis incluye los antimoniales pentavalentes estibogluconato de sodio (pentostam) y antimoniato de meglumina (glucantime), los cuales tienen efectos tóxicos en el ser humano sobre riñón, corazón e hígado (14) y algunos parásitos ofrecen resistencia a los mismos. Además, se encuentran las drogas de segunda línea tales como: la anfotericina B, la pentamidina y la paramomicina, las cuales, al igual que los antimoniales pentavalentes, poseen efectos secundarios (19). En vista de la toxicidad de estas drogas utilizadas en la quimioterapia contra la leishmaniasis, se ha hecho necesaria intensificar la investigación en la búsqueda de nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad. Así, se han propuesto compuestos derivados de plantas, tales como los flavonoides, un grupo amplio de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos interconectados por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono. Estos compuestos se encuentran naturalmente en vegetales y frutas, siendo componentes importantes de la dieta diaria (10). Se han realizado muchos estudios con el fin de estudiar la actividad de flavonoides contra los protozoarios que afectan más frecuentemente a los

seres humanos, tales como *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas* (15).

Los investigadores Chen y col. en 1993 encontraron que la licochalcona A, una chalcona oxigenada aislada de las raíces de *Glycyrrhiza glabra*, inhibió el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes de *L. major* y *L. donovani*, encontrando que los amastigotes son más susceptibles a este compuesto a una concentración de 0,5 µg/mL. Además, reportaron que el organelo blanco de estas moléculas parece ser la mitocondria del parásito. En un estudio enfocado a evaluar la actividad antileishmanial *in vitro* de 20 chalconas aisladas de plantas contra promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enrieti* y *L. major*, y contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos murinos, la mayoría de los compuestos fueron activos contra el parásito extracelular con IC₅₀ entre 0,07 y 2,01 µg/mL (11). Por otro lado, flavonoides glicosidos también han sido reportados con actividad antileishmanial *in vitro*. Los más potentes fueron fisetina, 3-hidroxi-flavona, luteolina y quercetina con valores de IC₅₀ de 0,6; 0,7; 0,8 y 1,0 µg/mL, respectivamente; sólo la quercetina inhibió en un 15,3 % la infección en ratones Balb/c inoculados con *L. donovani* (21). Otros investigadores encontraron que este tipo de flavonoides poseen la capacidad para estimular mecanismos de defensa en células infectadas con *Leishmania*, ya que inducen liberación de TNF (factor de necrosis tumoral) e IL-6, esenciales en la proliferación y diferenciación de las células inmunocompetentes (9).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado mediante microscopía confocal que la amiodarona, un conocido antiarrítmico (18), así como la dronedarona, su derivado menos tóxico (6), generan un colapso del gradiente electroquímico de protones, lo cual eleva los niveles de Ca²⁺ citoplasmático por la salida del catión desde la mitocondria (1). Asimismo, se ha demostrado recientemente en nuestro laboratorio (Yeimy Nieves, 2014. Tesis de Grado) que un compuesto natural perteneciente al grupo de los flavonoides, el hidroxí-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF), produce la disrupción de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, producto de la liberación de este catión de los acidocalcisomas y de la mitocondria.

Tomando en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar el efecto antiparasitario de un flavonoide aislado por primera vez de *Iresine diffusa* (una planta reconocida en nuestro país como valeriana por sus propiedades sedantes (20)) por la Dra. Alfrica Suárez y sus colaboradores de

la Facultad de Farmacia, U.C.V. (20), y su posible mecanismo de acción sobre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* a través de la regulación del Ca²⁺ intracelular. Dicho flavonoide, el 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) (Fig. 1), presentó una buena efectividad sobre la viabilidad celular de promastigotes de estos parásitos frente a otros seis flavonoides que fueron evaluados en un ensayo de citotoxicidad (resultados no mostrados).

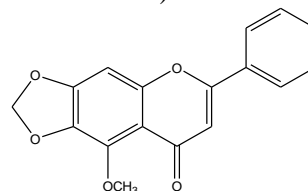
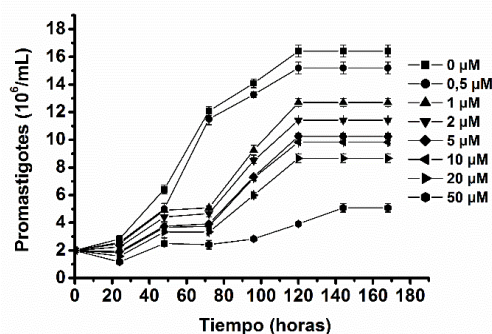


Fig. 1. Estructura química del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) (20).

En este sentido, estudiamos el efecto del compuesto sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, mediante una curva de crecimiento. Se observa en la Fig. 2 un efecto inhibitorio y dosis-dependiente de la concentración del compuesto sobre la proliferación celular. Se estimó un IC₅₀ de 12,62



µM a las 48 horas del crecimiento celular.

Fig. 2. Efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*.

Además, estudiamos el efecto del Flavonoide 3 sobre el porcentaje de células de mamífero infectadas con amastigotes de *L. mexicana* (Fig. 3). Las células huésped utilizadas fueron macrófagos murinos de la línea J774-G8, las cuales fueron infectadas con promastigotes de *L. mexicana* y tratadas 48 horas con varias concentraciones del Flavonoide 3. Los resultados demuestran que el compuesto afecta el porcentaje de macrófagos infectados de forma dosis-dependiente, pudiéndose observar también en la misma figura que el Flavonoide 3, aún hasta 25 µM, no afecta significativamente la proliferación de los macrófagos no infectados. A las 48 horas de exposición, el IC₅₀ obtenido fue de 1,47 µM.

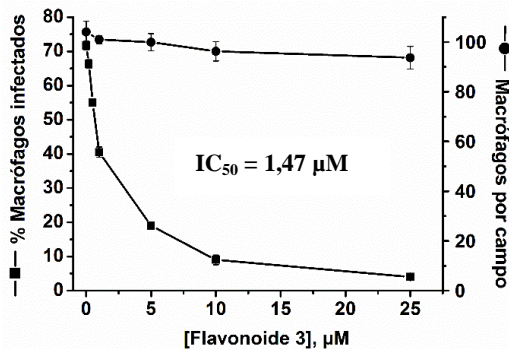


Fig. 3. (■) Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. (●) Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos murinos no infectados.

Como se mencionó anteriormente, el Ca^{2+} cumple un papel fundamental como señalizador celular, y por ende está involucrado en diversas funciones celulares en organismos eucariotas, desde mamíferos hasta parásitos. Esto conlleva a que la regulación intracelular de éste importante catión pueda ser considerada como un blanco quimioterapéutico (5). En este sentido, determinamos los posibles mecanismos de acción mediante los cuales el Flavonoide 3 afecta la viabilidad de *L. mexicana* utilizando técnicas de fluorescencia, empleando el fluoróforo fura 2. Así, logramos obtener el efecto del compuesto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de promastigotes de *L. mexicana* (resultados no mostrados), donde el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce en presencia y en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual indica que este incremento se debe a su liberación de organelos intracelulares y no a una entrada de Ca^{2+} proveniente del exterior celular. Asimismo, demostramos que dicha liberación intracelular de Ca^{2+} se produce desde organelos tales como la mitocondria y los acidocalcisomas, este último con altos niveles de pirofosfatos y polifosfatos. El Flavonoide 3 alcaliniza casi totalmente a estos organelos ácidos a una concentración de 50 μM (Fig. 4B) ya que es seguido por un pequeño incremento en la fluorescencia inducido por la nigericina a 2 μM , un ionóforo que cataliza el intercambio electroneutro de K^+/H^+ y conocido por su capacidad de alcalinizar los acidocalcisomas de estos parásitos (22). El aumento de la fluorescencia que se produce al añadir el compuesto es debido a liberación del fluoróforo naranja de acridina, el cual se acumula en compartimientos ácidos (8). Simultáneamente, el compuesto a 20 μM colapsa por completo el potencial electroquímico mitocondrial (Fig. 4A) debido a que la adición del protonóforo y desacoplador de la fosforilación oxidativa, el FCCP a 2 μM , no genera un aumento significativo en la fluorescencia. El aumento en la

fluorescencia producido por el compuesto es producto de la liberación del fluoróforo rodamina 123 acumulado en la mitocondria en función del gradiente electroquímico mitocondrial (6).

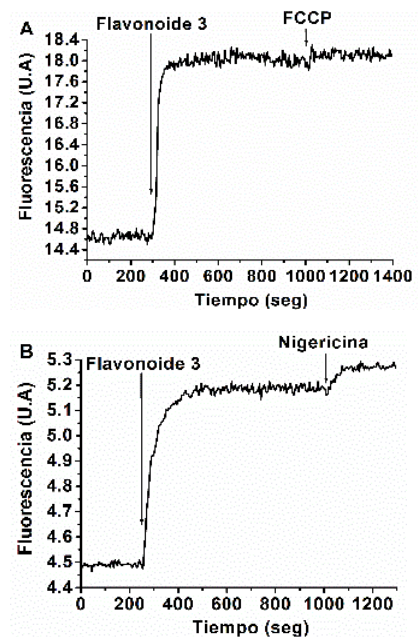


Fig. 4. (A) Efecto del Flavonoide 3 a 20 μM sobre el potencial electroquímico mitocondrial y (B) a 50 μM sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. *U.A: Unidades Arbitrarias.

Tomando en cuenta estos resultados, podríamos concluir que el Flavonoide 3 es un compuesto potencialmente ventajoso, ya que el IC_{50} sobre amastigotes resultó ser relativamente bajo, además de ser poco tóxico para la célula huésped. No obstante, en vista de la existencia de varias drogas sintéticas con un mayor potencial antiparasitario, cabe destacar que el compuesto objeto de este estudio es totalmente natural y su efecto antileishmanial podría ser potenciado en un futuro modificando químicamente su estructura. Además, podría ser utilizado en conjunto con otro compuesto con propiedades leishmanicidas conocidas, a fin de producir un efecto sinérgico.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el apoyo del Fondo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación, Venezuela (FONACIT) (Proyecto 2011000884), y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) (Proyecto PG-03-8728-2013-1).

Referencias

1. Benaim, G., Bermudez, R. y Urbina, J.A. (1990). Ca^{2+} Transport in Isolated Mitochondrial Vesicles from *Leishmania braziliensis* Promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 38: 61-68.

2. Benaim, G. y Romero, P. (1990). A Calcium Pump in Plasma Membrane Vesicles from *Leishmania braziliensis*. **Biochim. Biophys. Acta.** **1027**: 79-84.
3. Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F. R. y Docampo, R. (1991). A Calmodulin-Activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is Involved in Ca^{2+} Transport by Plasma Membrane Vesicles from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** **280**: 715-720.
4. Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1993). A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasmamembrane vesicles from *T. brucei*; selective inhibition by pentamidine. **Biochem. J.** **296**: 759-763.
5. Benaim, G., Garcia, C. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. **Trop. Biomed.** **28**: 471-481.
6. Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-González, S., Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J.L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A. y Suarez, A.I. (2014). Dronedarone an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. 2014. **Antimicrob. Agents Chemother.** **58**: 2295-2303.
7. Chen, M., Christensen, S.B., Blom, J., Lemmich, E., Nadelmann, L., Fich, K., Theander, T.G. y Kharazmi, A. (1993). Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Chemother.** **37**: 2550-2556.
8. Docampo, R., Scott, D., Vercesi, E. y Moreno, S. (1995). Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** **310**: 1005-1012.
9. Ercil, D., Kaloga, M., Radtke, O.A., Sakar, M.K., Kiderlen, A.F. y Kolodziej, H. (2005). O-galloyl flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and their *in vitro* antileishmanial activity. **Turk. J. Chem.** **29**: 437-443.
10. Harborne, J. y Williams, C. (2000). Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochem.** **55**: 481-504.
11. Kayser, O. y Kiderlen A.F. (2001). *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytother. Res.** **15**: 148-152.
12. Nuñez, J., Bompard, D., Charris, J., Camacho, J., Rodríguez, D., Rodríguez, T., Visbal, G., Álvarez, Á., García, Y. y Serrano, X. (2012). Efectos deletéreos del JC25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. **Revista Facultad de Farmacia.** **75(2)**: 50-58.
13. OMS. (2007). 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaria; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza.
14. Pandey, S., Suryawanshi, S., Gupta, S. y Srivastava, L. (2005). Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketenedithioacetals as antileishmanial agents. **Eur. J. Med. Chem.** **40**: 751-756.
15. Ramírez, M., Mendoza, J., Arreola, R. y Ordaz, C. (2010). Flavonoides con actividad antiprotozoaria. **Rev. Mex. Cienc. Farm.** **41**: 6-21.
16. Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial médica panamericana. México.
17. Salazar, M. y Castro, E. (2001). Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. **Dermatología peruana.** **11(1)**: 21-25.
18. Serrano, X., García, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G. y Benaim, G. (2009). Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca^{2+} Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents Chemoter.** **53**: 1403-1410.
19. Singh, S. y Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.** **10**: 307-315.
20. Suárez, A., Ramírez, C., Palacios, R., Rojas, K., DelleMonache, F. y Tillet, S. (2016). Flavonoides de *Iresine diffusa*. **Revista de la Facultad de Farmacia.** **79**.
21. Tasdemir D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T., Tosun, F. y Ruedi P. (2006). Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob. Agents Chemother.** **50**: 1352-1364.
22. Vercesi, A., Rodríguez, C., Catisti, R. y Docampo, R. (2000). Presence of a Na^+/K^+ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by antileishmanial drugs. **FEBS Lett.** **473**: 203-206.

Posible mecanismo de acción de segundos mensajeros lipídicos sobre la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos

VINCENZA CERVINO¹, MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONEZ¹ Y GUSTAVO BENAİM^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte y ²Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas – Venezuela. Correo-e: vincenza.cervino@ciens.ucv.ve.

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) juega un papel clave en la regulación del Ca^{2+} intracelular. Esta enzima es regulada por Calmodulina (CaM), fosfolípidos ácidos y etanol. El efecto del etanol es aditivo con la CaM. Utilizando formas truncadas en la región C-terminal de la PMCA expresadas en células Sf9, pudimos establecer una región con una extensión de 46 aa, cerca del dominio de unión de la CaM, donde interactúa el etanol. Importantes segundos mensajeros de origen lipídico, los cuales presentan en su estructura un grupo hidroxilo libre, como el diacilglicerol y la ceramida, estimulan la PMCA incrementando la V_{max} y la afinidad de la enzima por Ca^{2+} . El efecto estimulador del DAG y la ceramida permanece aún cuando la enzima ha perdido el dominio de unión de CaM y de etanol, indicando así que el DAG y la ceramida están interactuando con la enzima en una región diferente al sitio de interacción de la CaM y del etanol. Estudios sobre la enzima purificada demostraron que estos moduladores interactúan con la PMCA en una región localizada en uno de los dominios citoplasmáticos, entre los aminoácidos 296 y 349, donde ha sido reportado que esta enzima es estimulada por fosfolípidos ácidos.

Introducción

El Ca^{2+} ha sido ampliamente reconocido como un segundo mensajero intracelular responsable de la regulación de un gran número de funciones celulares (4). La concentración intracelular de Ca^{2+} en las células eucariotas se encuentra alrededor de los 100 nM, muy por debajo de la encontrada en el medio extracelular. La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) ha sido reconocida como una enzima fundamental en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmáticas basales, esenciales para su papel como segundo mensajero (2,13,17).

La PMCA es un miembro de la familia de ATPasas del tipo P reportada en todas las células eucariotas estudiadas (5). Esta enzima es altamente regulada, siendo estimulada por calmodulina (CaM) (10,12), fosfolípidos ácidos y ácidos grasos polinsaturados (14), fosforilación por proteínas quinasa dependientes de AMPc (11) y proteína quinasa C (PKC) (19). Esta enzima es estimulada también por proteólisis controlada, solventes orgánicos, autoagregación (13) y por etanol (1,6).

El etanol estimula la Ca^{2+} -ATPasa a niveles superiores a la estimulación inducida por los otros moduladores mencionados y su efecto es isoforma específica (6) y aditivo al efecto de la CaM, lo cual indica que ambos efectores estimulan a la enzima a través de mecanismos diferentes. Dado a que el etanol no es un efector fisiológico, se buscaron otros compuestos fisiológicos capaces de inducir efectos

similares sobre la PMCA. En este sentido, se estudió el efecto de lípidos anfífilos los cuales, al igual que el etanol, poseían en su estructura grupos hidroxilos libres, como son algunos esfingolípidos como la ceramida y esfingosina. Ambos compuestos, segundos mensajeros que actúan en muchos sistemas en combinación con el Ca^{2+} regulando la concentración intracelular de este catión (7,8). La ceramida es un esfingolípido señal que induce apoptosis en muchas líneas celulares de cáncer y regula otros procesos enzimáticos estimulando la PMCA de eritrocitos humanos y de células renales. La ceramida incrementa tanto la afinidad por Ca^{2+} como la V_{max} de la PMCA (7). Por otra parte, la esfingosina, la cual ha sido reportado que actúa como señal en muchos sistemas celulares de manera antagonista a la ceramida, tiene un efecto inhibitorio de la actividad de la PMCA (7).

El diacilglicerol (DAG) también es un segundo mensajero de gran importancia en las células, este compuesto se conoce que regula a la PMCA de una manera indirecta. El DAG se produce a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) por acción de una fosfolipasa C (PLC). Un producto, el inositol trifosfato (IP₃), difunde al citosol y estimula la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, el Ca^{2+} activa a la PKC anclada a la membrana, quien fosforila a la PMCA estimulándola (19). El efecto de la PKC y la CaM sobre la actividad de la PMCA no es aditivo. El DAG, al igual que la ceramida también posee en su estructura un grupo hidroxilo libre, estudios sobre la PMCA purificada demostraron que

este compuesto puede incrementar la actividad de esta enzima de manera directa y aditiva con la estimulación inducida por la PKC (16).

Si bien es evidente que el DAG, la ceramida y la esfingosina, todos segundos mensajeros de gran importancia dentro de las células, tienen efectos estimulatorios importantes sobre la actividad de la PMCA (7,8,16) no se conocen como actúan sobre la misma, por lo que profundizar en los posibles mecanismos de estimulación de estos compuestos sobre la enzima es uno de los objetivos de mayor importancia de nuestra línea de Investigación, siendo así de nuestro interés localizar posibles regiones en la estructura de la PMCA donde pudieran estar ejerciendo su efecto el etanol, el diacilglicerol, la ceramida y la esfingosina.

Mecanismo de acción del Etanol sobre la PMCA

El etanol tiene un efecto estimulatorio sobre la Ca^{2+} -ATPasa purificada de eritrocitos humanos y sobre el transporte de Ca^{2+} en vesículas invertidas (IOVs) de eritrocitos humanos. El etanol incrementa la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} y su V_{max} a más del doble con respecto a la actividad basal. El efecto estimulatorio del etanol y de la CaM son aditivos y el efecto del etanol se mantiene aún cuando el sitio de estimulación por CaM en la enzima ha sido removido mediante proteólisis controlada, lo cual indica que la región y el mecanismo de estimulación del etanol es diferente al de la CaM (1).

Estudios donde se expresaron en células Sf9, mediante un sistema de expresión por Baculovirus, diferentes formas de la PMCA truncadas en la región C-terminal, una carente de 44 aa (PMCA Δ 44), una carente de 118 aa (PMCA Δ 118) y otra carente de 139 aa (PMCA Δ 139), demostraron que la forma carente de 44aa es estimulada por el etanol, mientras que las formas carentes de 118 y 139 aa perdían dicho efecto estimulatorio, estableciéndose así una región con una extensión de 74 aminoácidos localizada en el dominio C-terminal de la Ca^{2+} -ATPasa, donde interactúa el etanol (6,15) (Fig. 1).

Esta región de 74 aa está enriquecida en aminoácidos polares y su carácter hidrofóbico, determinado mediante el uso de la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle, muestra que se encuentra expuesto hacia el citosol, contando con todas las características que permiten corroborar su posible participación en la interacción del etanol con la enzima. En esta región de 74 aminoácidos está incluida además la región responsable de la unión y estimulación por CaM, la cual comprende 28 aa bien caracterizados, conociéndose su participación en el mecanismo de

acción de la CaM sobre la Ca^{2+} -ATPasa (18). Dado a que el efecto estimulatorio del etanol y la CaM sobre la enzima son aditivos y por lo tanto sus sitios de interacción y mecanismos de acción son diferentes, al restar de la región de 74 aa C-terminales, los 28 aminoácidos donde ejerce su efecto la CaM, quedaría una región de 46 aminoácidos donde estaría interactuando y ejerciendo su efecto el EtOH con la enzima. Para continuar estos estudios se expresarán nuevas formas truncadas de la PMCA en esta región de 46 aminoácidos y mediante manipulaciones genéticas intentaremos identificar el o los aminoácidos de esta región involucrados en dicha interacción, ahondando así en el mecanismo de acción de este alcohol sobre la PMCA.

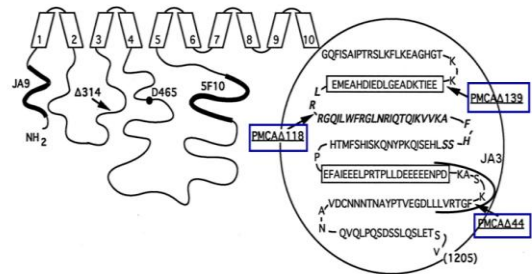


Fig. 1: Esquema de la PMCA donde se indican los sitios de corte de las diferentes formas truncadas utilizadas.

Mecanismos de acción del Diacilglicerol y la Ceramida sobre la PMCA.

El efecto estimulatorio de fosfolípidos ácidos como la fostatidilserina (PS) y fosfadidilinositol (PI) así como por ácidos grasos polinsaturados de cadena larga como el ácido oleico y araquidónico sobre la PMCA ha sido caracterizado (14), reportándose dos dominios en la enzima donde estos fosfolípidos interactúan, uno de ellos compartido con el sitio de unión de la CaM y el otro es un dominio proteico separado, rico en lisina y localizado en el dominio citoplasmático ubicado entre los dominios transmembrana 2 y 3, en la región comprendida entre los aa 296 y 349 de la enzima (3,9,20). Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos no está del todo definido y debe ser estudiado con mayor profundidad.

El Diacilglicerol y la Ceramida estimulan directamente la PMCA, aumentando su velocidad máxima y la afinidad por Ca^{2+} , observándose además una aditividad del efecto del DAG y la Ceramida con CaM y etanol. Estos estudios demostraron la importancia del DAG y la Ceramida, importantes segundos mensajeros en las células, como moduladores fisiológicos de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática. Sin embargo, se desconoce

donde ejercen su efecto y por lo tanto, cuáles son sus mecanismos de acción sobre la enzima.

El hecho que el DAG y la Ceramida mostraron tener un efecto estimulador sobre la PMCA aditivo con el efecto estimulador inducido por el EtOH, sugirió que el mecanismo de acción de estos compuestos debería ser diferente. Utilizando las mismas formas truncadas en la región C-terminal de la PMCA, donde se determinó el sitio de interacción del EtOH con la enzima, se pudo demostrar que tanto el DAG como la Ceramida, eran capaces de estimular tanto a la isoforma nativa de la PMCA como a todas las formas truncadas, incluso aquellas que perdían el dominio de unión de CaM (T118 y T139) (Fig. 2 y 3) y de EtOH (resultados no mostrados), sugiriéndose de manera evidente que la región C-terminal de la PMCA donde interactúan y ejercen su efecto la CaM y el EtOH no están involucrados en la interacción del DAG y de la Ceramida con la enzima.

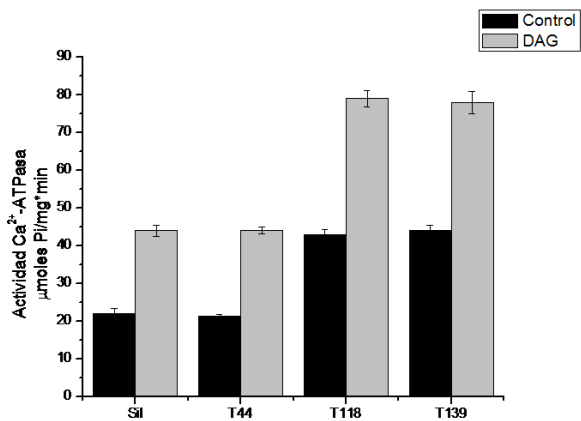


Fig. 2. Actividad de la isoforma nativa (Sil) y formas truncadas (T44, T118 y T139) de la PMCA, expresadas en células COS-7, en ausencia y presencia de DAG 20 μg/ml.

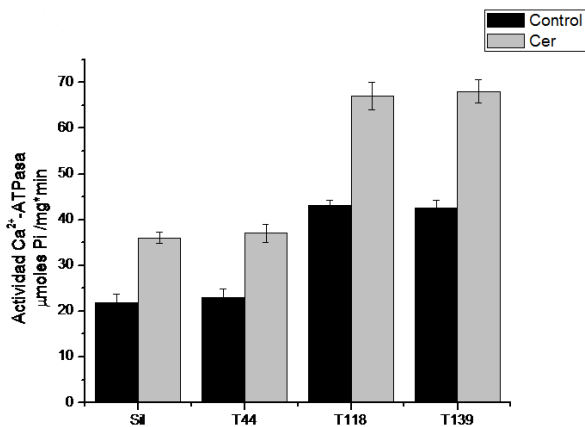


Fig. 3. Actividad de la isoforma nativa (Sil) y formas truncadas (T44, T118 y T139) de la PMCA, expresadas en células COS-7, en ausencia y presencia de Cer 10 μM.

Dado a que estos moduladores no parecen ejercer su efecto en la región C-terminal de la PMCA, se planteó una posible interacción de los mismos con el sitio de interacción de los fosfolípidos ácidos localizado en el dominio citoplasmático ubicado entre los dominios transmembrana 2 y 3, en la región comprendida entre los aa 296 y 349 de la enzima (3, 20). Estudios realizados sobre la Ca²⁺-ATPasa purificada de eritrocitos humanos donde se determinó el efecto del DAG y la Ceramida en ausencia y presencia de un fosfolípido ácido como la fosfatidilserina (PS), demostraron que no hay aditividad entre los efectos de PS-DAG, PS-Ceramida, DAG-Ceramida y DAG-PS-Ceramida, sugiriéndose por lo tanto que los tres moduladores lipídicos posiblemente interactúan con la enzima en el mismo dominio y mediante un mecanismo de acción similar (Fig. 4).

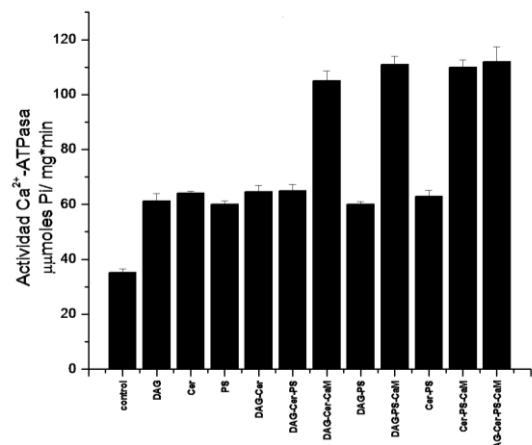


Fig. 4. Estimulación de la PMCA purificada de eritrocitos humanos por Diacilglicerol, Ceramida y Fosfatidilserina. Actividad Ca²⁺-ATPasa purificada en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de DAG 20 μg/ml, Ceramida 10 μM, Fosfatidilserina 20 μg/ml, CaM 5 μg/ml y combinaciones de los moduladores mencionados.

Los estudios realizados mostraron que el DAG y la Ceramida estarían ejerciendo su efecto al interactuar en la región comprendida entre los aminoácidos 296 y 349 de la PMCA. Quedan por realizar estudios de manipulaciones genéticas de la enzima en esta región de 53 aa, los cuales nos permitirán profundizar en el posible mecanismo de acción del DAG y la Ceramida sobre la PMCA.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el FONACIT S1-2001000789; CDCH-UCV PI 03-00-6375-2006 a V. C. y Proyecto UCV No C. I. 2013-122 a V. C. y G. B.

Referencias

1. **Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estraño, C. y Weitzman, C.** (1994). Ethanol stimulate the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **1195**: 141-148.
2. **Brini, M. y Carafoli, E.** (2009). Calcium pumps in health and disease. **Physiol Rev.** **89**: 1341-1378.
3. **Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T. y Carafoli, E.** (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. **Eur. J. Biochem.** **204**: 939-946.
4. **Carafoli, E.** (1987). Intracellular Calcium Homeostasis. **Ann. Rev. Biochem.** **56**: 395-433.
5. **Carafoli, E. y Stauffer, T.** (1994). The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. **J. Neurobiol.** **25**: 312-324.
6. **Cervino, V., Benaim, G., Carafoli, E. y Guerini, D.** (1998). The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform specific. **J. Biol. Chem.** **273**: 29811-29815.
7. **Colina, C., Cervino, V. y Benaim, G.** (2002). Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. **Biochem. J.** **362**: 247-251.
8. **Colina, C., Flores, A., Rojas, H., Acosta, A., Castillo, C., Garrido, R., Israel, A., DiPolo, R. y Benaim, G.** (2005). Ceramide increase cytoplasmic Ca^{2+} concentration in Jurkat T cells by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel. **Arch. Biochem. Biophys.** **436**: 333-345.
9. **Filoteo, A. G., Enyedi, A. y Penniston, J.T.** (1992). The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca^{2+} pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid. **J. Biol. Chem.** **267**: 11800-11805.
10. **Gopinath, R.M. y Vincenzi, F.F.** (1977). Phosphodiesterase protein activator mimics the red blood cell cytoplasmic activator of the ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ATPase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **77**: 1203-09.
11. **James, P., Pruschy, M., Vorherr, T., Penniston, J.T. y Carafoli, E.** (1989). Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. **Biochemistry** **28**: 4253-4258.
12. **Jarret, H. W. y Penniston, J.T.** (1977). Partial purification of the ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase activator from human erythrocytes: Its similarity to the activator 3'-5'Cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **77**: 1210-16.
13. **Lopreiato, R., Giacomello, M. y Carafoli, E.** (2014). The plasma membrane Calcium Pump: New ways to look at an old enzyme. **J. Biol. Chem.** **289**: 10261-10268.
14. **Niggli, V., Adunyah, E.S. y Carafoli, E.** (1981). Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. **J. Biol. Chem.** **256**: 8588-8592.
15. **Pérez-Gordones, M.** (2011). Una contribución al estudio de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de humanos y proteínas reguladoras de calcio de *Trypanosoma evansi*. **Tesis Doctoral**. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
16. **Pérez-Gordones, M., Lugo, M., Winkler, M., Cervino, V. y Benaim, G.** (2009). Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction. **Arch. Biochem. Biophys.** **489(1-2)**: 55-61.
17. **Schatzmann, H. J.** (1966) ATP-dependent Ca^{2+} -extrusion from human red cells. **Experientia** **22**: 364-365
18. **Verma, A., Enyedi, A., Filoteo, A. y Penniston, J.** (1994). Regulatory región of plasma membrane Ca^{2+} -pump. 28 residues suffice to bind calmodulin but more are needed for full auto-inhibition of the activity. **J. Biol. Chem.** **269(3)**: 1687-1691.
19. **Wang, K. K. W., Wright, L. C., Machan, C. L., Allen, B. G., Conigrave, A. D. y Roufogalis, B. D.** (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxil terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. **J. Biol. Chem.** **266**: 9078-9085.
20. **Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., Modyanov, N y Carafoli, E.** (1990). Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis. **Biochemistry** **29**: 8070-8076.

Evidencia de la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa sensible a Calmodulina en *Trypanosoma evansi*

MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES¹, JOSÉ RAMÓN RAMÍREZ-IGLESIA²,
GRACIELA UZCANGA³, GUSTAVO BENAİM^{1,4}, MARTA MENDOZA² Y VINCENZA
CERVINO¹

¹Laboratorio de Biofísica. Instituto de Biología Experimental (IBE). Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas, Venezuela. ²Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). ³Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) Universidad Central del Ecuador. ⁴Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas/Venezuela
Correo-e: vincenza.cervino@ciens.ucv.ve

La familia tripanosomatidae comprende organismos causantes de enfermedades tropicales que afectan a humanos y animales, como la tripanosomosis equina causada por *Trypanosoma evansi*. La identificación y caracterización de proteínas del parásito como blancos terapéuticos es la línea actual del desarrollo de nuevos tratamientos para estas enfermedades. Algunas drogas, alteran la homeostasis de Ca^{2+} afectando la viabilidad del parásito. Una enzima clave en este proceso es la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la cual comparte características funcionales y regulatorias con la PMCA de humanos, pero molecularmente carece del dominio típico de unión de Calmodulina (CaM). En *T. evansi* pudimos identificar una PMCA inhibida por Vanadato y estimulada por CaM, la cual fue marcada con CaM biotinilada y purificada mediante una columna de CaM-sefarosa, mostrando interacción directa con la CaM. El gen de la PMCA fue identificado, mostrando una alta homología con las PMCA de tripanosomatidios. El análisis de esta secuencia predijo dos dominios no clásicos de unión a CaM en la misma región C-terminal donde interactúa la CaM con la PMCA de humanos. Estas diferencias estructurales podrían ser consideradas para el estudio de esta enzima como blanco para el desarrollo de nuevas drogas para combatir infecciones causadas por estos parásitos.

Introducción

La familia Tripanosomatidae comprende a los Trypanosomas, parásitos protozoarios que afectan un amplio rango de organismos, incluyendo animales y humanos. En Latinoamérica, la Tripanosomosis animal es causada principalmente por las especies de hemoparásitos *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*, los cuales pueden ser transmitidos de forma mecánica por insectos hematófagos pertenecientes a los géneros *Tabanidae* y *Somoxydae* (7,10). En Venezuela, *T. evansi* afecta primordialmente a los caballos, causando una enfermedad conocida como “Derrengadera”. La Tripanosomosis animal produce signos clínicos como fiebre, anemia, pérdida de peso, susceptibilidad a abortos y lesiones en varios órganos, llegando a provocar la muerte del animal (7,17), afectando el desarrollo de actividades relacionadas con la producción agropecuaria en Venezuela.

La identificación y caracterización de proteínas en el parásito como blancos quimioterapéuticos representa la línea actual del desarrollo de nuevos tratamientos contra estas enfermedades parasitarias. Algunas drogas utilizadas en tratamientos experimentales ejercen su acción a través de la interrupción de la

homeostasis de Ca^{2+} , la cual usualmente resulta en muerte celular por apoptosis o necrosis (1).

En los Tripanosomatidios, el mantenimiento de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} es esencial para garantizar su supervivencia, regulando numerosas funciones que dependen de este catión como: despolimerización de microtúbulos, movimiento flagelar, liberación de glicoproteínas de superficie asociada a la apertura de canales iónicos de la membrana (16), diferenciación celular, muerte celular programada o apoptosis (8) y en el proceso de interacción e invasión celular (13). También se ha demostrado que la alteración en la homeostasis del Ca^{2+} presenta como consecuencia el desarrollo de formas anormales en los parásitos junto con una inhibición en su crecimiento (15), indicando así la importancia que representa la homeostasis del Ca^{2+} en estos organismos.

Homeostasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios

La homeostasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios al igual que en mamíferos es mantenida gracias a la acción combinada de distintos sistemas transportadores como son: 1) un uniporte electroforético de Ca^{2+} en el mitocondrion, 2) una Ca^{2+} -ATPasa de retículo

endoplasmático (SERCA) y 3) una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), siendo esta última la enzima clave en mantener los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en estos parásitos (1,11). También ha sido demostrada la existencia de reservorios intracelulares de Ca^{2+} diferentes del retículo y la mitocondria como son los acidocalcisomas, los cuales también podrían jugar algún papel en la regulación del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos. Todos estos mecanismos actúan en conjunto manteniendo los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el rango nM, garantizando así la función de éste como segundo mensajero.

La Calmodulina (CaM) en los tripanosomatidios

La señal del Ca^{2+} es traducida mediante su asociación directa o indirecta con proteínas que actúan en diferentes procesos celulares, como es el caso de la CaM, una proteína ubicua que actúa como sensor de las concentraciones de Ca^{2+} en las células. La CaM modula la actividad de diversas proteínas blanco asociadas al proceso de homeostasis del Ca^{2+} como es el caso de la PMCA. Esta proteína une con alta afinidad hasta cuatro Ca^{2+} , la unión del Ca^{2+} genera un cambio conformacional en su estructura, exponiendo dominios hidrofóbicos que permiten su interacción con diferentes proteínas blanco (20). Adicionalmente, la CaM puede ser fosforilada por proteínas quinasas, provocándose así cambios en su afinidad por las distintas proteínas con las cuales interactúa, ampliando aún más su variedad de blancos en la célula (6).

Las proteínas con las cuales interactúa la CaM pueden presentar motivos en su estructura primaria caracterizados por patrones de residuos hidrofóbicos, una carga neta positiva y una estructura α -hélice formada por aproximadamente 20 aminoácidos (12). Los sitios de unión clásicos a CaM pueden ser agrupados en 2 clases designadas como motivos 1-5-8-14/1-8-14 y 1-5-10, basados en la posición de sus residuos hidrofóbicos conservados. Los lóbulos de la CaM se anclarán a estas secuencias flanqueadas por residuos hidrofóbicos, bien sean 1-14 o 1-10, ejerciendo su efecto modulador (19). Recientemente, se han descrito dos nuevos motivos no clásicos de unión a CaM, que conserva las características anteriormente mencionadas pero con la particularidad de exhibir un patrón 1-18, con aminoácidos conservados tanto hidrofóbicos como hidrofílicos necesarios para el anclaje de la CaM (14).

La PMCA en los tripanosomatidios y su estimulación por CaM

Se ha demostrado la existencia de una PMCA con alta afinidad por Ca^{2+} , dependiente de Mg^{2+} y estimulable por CaM en la membrana plasmática de *L. braziliensis* (5), *T. cruzi* (3), *L. mexicana* (2) y *T. brucei* (4). En estos tripanosomatidios al igual que en células de eucariotas superiores, esta enzima expulsa el Ca^{2+} al medio extracelular y es clasificada como una ATPasa tipo P, pues forma un intermediario fosforilado de alta energía durante su ciclo catalítico y es inhibida por vanadato. Estructuralmente esta enzima presenta 10 dominios transmembrana y dos grandes dominios citoplasmáticos donde se encuentra el sitio activo de la enzima así como un extenso dominio C-terminal donde se encuentran la mayoría de los sitios de regulación de la PMCA (11), entre ellos el sitio de unión y estimulación por CaM. En células de eucariotas superiores este dominio está bien definido y corresponde a una región de 9 KDa localizada en el extremo C-terminal de la enzima, la cual en ausencia de CaM interactúa con dos regiones localizadas en los dominios citoplasmáticos de la enzima, dificultando el acceso de los sustratos a su sitio activo. En presencia de CaM, este dominio pierde su interacción con dichos dominios liberando a la bomba del efecto de auto inhibición (9). En los tripanosomatidios el fenómeno de la modulación por CaM ha sido un tema controversial. Diversos estudios aportan evidencias bioquímicas y fisiológicas de la estimulación de la PMCA por CaM en diferentes tripanosomatidios. Incluso en algunos de ellos, al igual que con la PMCA de humanos, esta enzima ha sido purificada empleando una cromatografía de afinidad mediante una columna de CaM-sefarosa demostrando así su interacción directa con la CaM. Sin embargo, a nivel molecular se ha descrito la ausencia de secuencias con un motivo clásico de unión a CaM en la región C terminal de la PMCA de *T. brucei* y *T. cruzi*. (15), indicándose la posible existencia de otra secuencia de unión a CaM no identificada en la enzima que indica la posibilidad de una forma de regulación de la bomba diferente a la estudiada en eucariotas superiores (15), siendo necesario profundizar en el mecanismo de acción de la CaM sobre la PMCA en estos parásitos ya que estas diferencias estructurales entre la PMCA de tripanosomatidios y humano podrían ser consideradas para el estudio de esta enzima como posible blanco terapéutico.

Caracterización bioquímica, inmunológica y molecular de la PMCA de Trypanosoma evansi.

Una PMCA en *T. evansi* (TePMCA) pudo ser identificada y caracterizada utilizando una fracción altamente enriquecida en la membrana plasmática

aislada de este parásito (Fig. 1). Como puede ser observado en la gráfica mostrada en la Fig. 1, la afinidad de esta enzima por Ca^{2+} es saturada a concentraciones micromolares de Ca^{2+} , alcanzando una V_{max} de $8,2 \pm 0,72$ nmoles de $\text{Pi}/\text{mg} \times \text{min}$ y un K_m aparente para Ca^{2+} de $0,35 + 0,03 \mu\text{M}$ correspondiente a la actividad basal de la enzima (18).

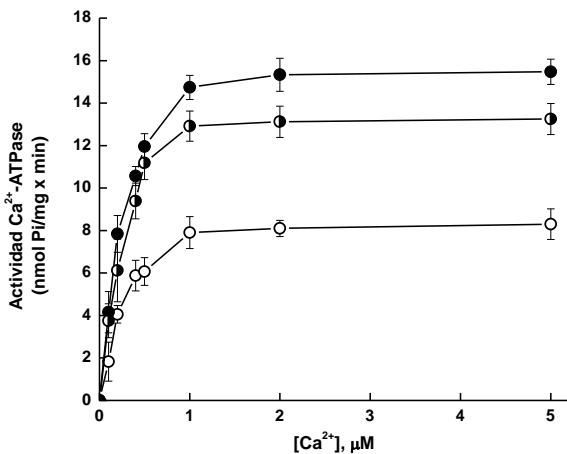


Fig. 1: Actividad de la PMCA de *Trypanosoma evansi* y su estimulación por CaM. (○) Actividad basal; (□) Actividad en presencia de $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ de CaM de bovino y (●) actividad en presencia de $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ de CaM de *T. cruzi*.

La TePMCA resultó ser estimulada por CaM aislada de cerebro bovino alcanzando una V_{max} de $13,24 \pm 0,61$ nmol $\text{Pi}/\text{mg} \times \text{min}$, aproximadamente un 60% de estimulación con respecto a la actividad basal. Interesantemente, la CaM de *T. cruzi* estimuló a la enzima a un mayor nivel que la estimulación obtenida con la CaM de mamíferos, alcanzando una V_{max} de $15,47 \pm 0,59$ nmol $\text{Pi}/\text{mg} \times \text{min}$, aproximadamente un 90% de estimulación con respecto al control.

Profundizando en la caracterización de la PMCA identificada, se pudo demostrar que la misma es una ATPasa tipo P, ya que fue inhibida por Vanadato ($20 \mu\text{M}$). Asimismo, la estimulación por CaM fue inhibida utilizando un antagonista de CaM como el Calmidazolium (CMZ) (Fig. 2).

Estudios Inmunológicos de esta enzima mostraron una reacción cruzada de un anticuerpo policlonal generado a partir de la PMCA de eritrocitos humanos y un anticuerpo comercial 5F10 dirigido contra esta proteína mostrando una banda de aproximadamente 120 kDa. Asimismo, el anticuerpo 5F10 fue capaz de inmunoprecipitar el antígeno correspondiente, corroborándose que su peso molecular es de 120 kDa. La TePMCA fue marcada con CaM biotinilada en presencia de Ca^{2+} y purificada mediante una columna de CaM-sefarosa, demostrando así la interacción directa de la CaM con esta enzima.

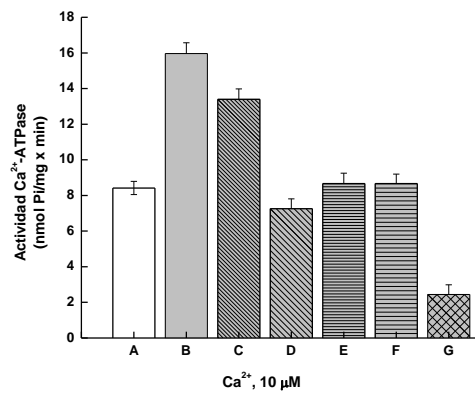


Fig. 2: Efecto de diferentes moduladores sobre la PMCA de *Trypanosoma evansi*. (A) Actividad basal; (B) CaM *T. cruzi* ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$) (C) CaM Bovino ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$); (D) CMZ ($10 \mu\text{M}$); (E) CMZ ($10 \mu\text{M}$) + CaM *T. cruzi* ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$); (F) Oligomicina ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) y (G) Vanadato ($20 \mu\text{M}$).

Desde el punto de vista molecular, mediante PCR utilizando oligos diseñados a partir de la secuencia reportada de la PMCA de *T. brucei*, pudimos obtener una secuencia de 3543 pb correspondiendo al posible gen de la PMCA. Este gen codifica para una proteína de 1080 aa, con un peso molecular estimado de 118,9 KDa y presenta un 99% de homología con la PMCA de *T. brucei* y 31% con la PMCA4b de humanos. Sólo 3 aa varían entre la secuencia de la TePMCA y la misma enzima de *T. brucei*, siendo estas sustituciones localizadas en dominios no funcionales de la proteína (18).

Por otra parte, a pesar de la baja homología de la TePMCA con la PMCA4b de humanos, los dominios funcionales en ambas proteínas se encuentran altamente conservados. Una diferencia importante en la secuencia de la TePMCA con respecto a la enzima análoga de eucariotas superiores es que tiene un extremo C-terminal más corto y carente de los dominios clásico de unión de CaM reportados en células de eucariotas superiores. Sin embargo, en esta región C-terminal se encuentran dos posibles sitios no clásicos de unión a CaM, donde podrían estar interactuando este modulador proteico. Estas diferencias estructurales son prometedoras ya que podrían ser consideradas para el estudio de esta enzima como posible blanco para el desarrollo de nuevas drogas con miras a combatir las infecciones causadas por estos parásitos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Proyecto FONACIT S1-2001000789, CDCH-UCV PI

Referencias

1. Benaim, G. y García, C.R.S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis- a review. **Trop. Biomed.** **28**: 471-481.
2. Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Fellibert, P. y Laurentin, A. (1993a). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca^{2+} -ATPase. **Biol. Res.** **26**: 141-150.
3. Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F. y Docampo, R. (1991). A calmodulin-activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** **280**: 715-720.
4. Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1993b) A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. **Biochem. J.** **296**: 759-763.
5. Benaim, G. y Romero, P. (1990). A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. **Biochim. Biophys. Acta** **1027**: 79-84.
6. Benaim G. y Villalobo A. (2002). Phosphorylation of Calmodulin: Functional implications. **Europ. J. Biochem.** **269**: 3619-3631.
7. Desquesnes, M. (2004). Trypanosomes, pathogenecity, clinical sings, diagnosis and characterisation of livestock Trypanosome in Latin America. En: **Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America**. CIRAD French Agricultural Research Centre for International Development. OIE World Organization for Animal Health, Paris, France. Cap. 1 y 2: 7-32.
8. Docampo R. y Lukeš J. (2012). Trypanosomes and the solution to a 50-year mitochondrial calcium mystery. **Trends Parasitol.** **28**: 31-37.
9. Falchetto R., Vorherr T. y Carafoli, E. (1992). The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. **Protein Sci.** **1**: 1613-1621.
10. Gonzatti, M., Gonzalez-Baradat, B., Aso, P.M. y Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. En: **Trypanosomas and Trypanosomiasis**. Springer. Cap 11: 261-262.
11. Guerini D., Coletto L. y Carafoli E. (2005). Exporting calcium from cells. **Cell Calcium.** **38**: 281-289.
12. Hoefflich, K. P. e Ikura, M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. **Cell.** **6**: 739-742.
13. Huang, G., Vercesi, A.E. y Docampo, R. (2013). Essential regulation of cell bioenergetics in *Trypanosoma brucei* by the mitochondrial calcium uniporter. **Nat. Commun.** **4**: 2865.
14. Juranic, N., Atanasova, E., Filoteo, A.G., Macura, S., Prendergast, F.G., Penniston, J.T. y Strehler, E.E. (2010). Calmodulin wraps around its binding domain in the plasma membrane Ca^{2+} pump anchored by a novel 18-1 motif. **J. Biol Chem.** **6**: 4015-4024.
15. Luo, S., Rohloff, P., Cox, J., Uyemura, S.A. y Docampo, R. (2004). *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca^{2+} -ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca^{2+} -ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca^{2+} homeostasis and growth. **J. Biol. Chem.** **14**: 14427-14439.
16. Mendoza, M., Uzcanga, G.L., Pacheco, R., Rojas, H., Carrasquel, L.M., García-Marchan, Y., Serrano-Martín, X., Benaím, G., Bubis, J. y Mijares, A. (2008). Anti-VSG antibodies induce an increase in *Trypanosoma evansi* intracellular Ca^{2+} concentration. **Parasitology** **135**: 1303-1315.
17. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). 2004. Tripanosomiasis. En: **Manual Estándar para Pruebas Diagnósticas y Vacunas**. World Organization for Animal Health, Paris, France. Cap. 2: 815-822.
18. Pérez-Gordones, M. (2011). Una contribución al estudio de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de humanos y proteínas reguladoras de calcio en *Trypanosoma evansi*. **Trabajo de Tesis Doctoral**. Universidad Central de Venezuela.
19. Rhoads, A.R. y Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. **FASEB J.** **5**: 331-340.
20. Yáñez, M., Gil-Longo, J. y Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. **Adv. Exp. Med. Biol.** **740**: 461-82.

Efectos de drogas y compuestos derivados de productos naturales sobre la homeostasis de Ca^{2+} en *T. cruzi*

ALEJANDRA VILLARROEL¹, MARINÉS GARCÍA¹, VLADIMIR KOUZNETSOV²,
DIEGO MERCHAN ARENAS², FRANCISCO ARVELO^{3,4}, FELIPE SOJO^{3,4}, GUSTAVO
BENAÏM^{1,5} Y VINCENZA CERVINO¹

¹Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte.

²Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia ³Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, ⁴Centro de Biociencias, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y ⁵Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas/Venezuela.

Correo-e: vincenza.cervino@ciens.ucv.ve.

La enfermedad de Chagas, es una afección parasitaria, sistémica y crónica cuyo agente causal, es el *Trypanosoma cruzi*. Las únicas drogas comerciales disponibles para su tratamiento son el benznidazol y el nifurtimox, quienes presentan efectos tóxicos colaterales, una eficiencia limitada en pacientes crónicos y resistencia. Actualmente, se ha dirigido la búsqueda hacia posibles nuevas drogas, basadas en derivados de productos naturales minimizando los efectos secundarios en el paciente. Distintas drogas afectan la viabilidad del parásito al actuar sobre sistemas encargados de mantener su homeostasis de Ca^{2+} . Drogas como la pentamidina y el cristal violeta afectan la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) sin afectar la PMCA de humanos, sugiriéndose a la PMCA como posible blanco de acción de nuevas drogas. Aceites vegetales de plantas aromáticas tropicales como las Tetrahydroquinolinas, resultan atractivos como nuevos compuestos químicos a estudiar. Evidencias experimentales demostraron que 3 derivados de Tetrahydroquinolinas de la serie DMs, (DM5, DM8 y DM12) tienen un efecto inhibitorio importante (> 85%) sobre la proliferación del *Trypanosoma cruzi* sin mostrar un efecto significativo sobre fibroblasto, ni sobre la actividad de la PMCA de humanos, pudiendo ser potencialmente explotados desde el punto de vista farmacológico, como posibles agentes terapéuticos sobre este parásito.

Introducción

La enfermedad de Chagas, es una afección parasitaria, sistémica y crónica. Su agente causal, es el *Trypanosoma cruzi*, un protozooario flagelado transmitido vectorialmente por Triatomíneos. La enfermedad de Chagas originalmente descrita por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909, está fuertemente vinculada con aspectos socio-económicos-culturales deficitarios, considerándose una enfermedad desatendida (14). Esta enfermedad es una patología endémica en 21 países de América Central y América del Sur incluyendo a Venezuela. Si bien su principal mecanismo de transmisión es vectorial, también puede ser transmitido mediante transfusiones, vías congénitas, trasplantes de órganos y vía oral. Asimismo, las migraciones de personas infectadas pueden llevarla a países no endémicos de América y del Mundo (14).

Se estima que actualmente, cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, unos 8 millones están infectadas, con 56000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión, motivando 12000 muertes anuales (14) donde aproximadamente

el 99% ocurren en la fase crónica de la enfermedad (17). En Venezuela, el Ministerio de la Salud estableció un programa nacional de control de la enfermedad de Chagas en el año 1966, en los que se incluía el control del vector y de la sangre para transfusión, reduciéndose el área endémica de 750000 Km² a 360000 Km², mientras la seroprevalencia de la enfermedad en poblaciones rurales disminuyó de 44.5% a 9.2% (1). Sin embargo, hubo un repunte de la enfermedad de Chagas en Venezuela, siendo descrita incluso en regiones no catalogadas como endémicas de la enfermedad (2).

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Chagas puede dividirse en tres fases que varían dependiendo de los síntomas que presente el paciente. Una fase aguda que dura de 2 a 4 meses, donde se presentan manifestaciones clínicas como: inflamación de un párpado (signo de Romana), conjuntivitis, fiebre, taquicardia, inflamación de ganglios linfáticos, edema y esplenomegalia. La mortalidad en esta fase alcanza un 5 a 10% en los pacientes sintomáticos. Después de esta fase las manifestaciones clínicas desaparecen y el paciente entra en la fase crónica de la enfermedad, en la que no hay síntomas aparentes

de infección. Se observa un período de latencia, llamada usualmente fase indeterminada, que puede durar entre 10 y 30 años y posteriormente, entre el 30 y 40% de los pacientes infectados vuelven a presentar manifestaciones clínicas relacionadas, con el compromiso de órganos como el intestino, esófago y corazón produciendo entre los daños más importantes cardiomiopatía chagásica (16). En este caso ocurre daño al miocardio por las formas intracelulares del parásito produciendo pérdida de la función contráctil y por ende cambios en los patrones electrocardiográficos (6) que pueden desencadenar en la muerte del paciente.

Drogas comerciales utilizadas actualmente para la enfermedad de Chagas. Posibles blancos quimioterapéuticos en T. cruzi.

A pesar de que la enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de un siglo, las únicas drogas comerciales disponibles para el tratamiento de esta enfermedad son el Nifurtimox (Lampit®, Bayer) y el Benznidazol (Rochagan®, Radani®, Roche) cuyo mecanismos de acción sobre el parásito se basan en inducir estrés oxidativo o reductivo respectivamente. El nifurtimox reduce el grupo nitro de radicales nitroaniónicos, lo cual conlleva a la formación de radicales libres del tipo peróxido de hidrógeno o superóxidos, también acelera la producción de metabolitos electrofílicos e incrementa el consumo de oxígeno en *T. cruzi*. Por otra parte, el benznidazol inhibe la enzima fumarato reductasa del parásito y los metabolitos resultantes de la reducción de este compuesto producen efectos deletéreos en el parásito mediante modificaciones covalentes de macromoléculas, incluyendo el ADN (8,11). Sin embargo, ambas drogas presentan efectos tóxicos colaterales como vómitos, anorexia, polineuropatías periféricas, alergias dermopáticas por lo que los tratamientos tienden a ser abandonados por los pacientes (16). El nifurtimox y el Benznidazol son usados en la fase aguda de la enfermedad y su efectividad es variable dependiendo de la región, probablemente debido a variaciones de la cepa de los parásitos (19) y de la fase de la enfermedad, teniendo una eficacia limitada en la fase crónica observándose que si bien la parasitemia disminuye en el tiempo, no hay mejorías en la cardiomiopatía asociada a la enfermedad, no disponiéndose entonces de un tratamiento idóneo para la fase crónica de esta enfermedad, surgiendo así la necesidad de buscar nuevas moléculas activas contra este estadio. Debido a esto, la investigación ha sido enfocada a la búsqueda de posibles nuevas drogas, principalmente

basadas en derivados de productos naturales para minimizar los efectos secundarios sobre el paciente y a sus posibles blancos de acción. En este sentido, se han propuesto una gran variedad de blancos para el diseño de drogas contra estos parásitos como: Inhibidores de síntesis de esteroides, Inhibidores de cisteín-proteasas, Inhibidores de la síntesis y metabolismo del tripanotión, Inhibidores del metabolismo del pirofosfato, Inhibidores del transporte de Purinas (18) y las que afectan sistemas encargados de la homeóstasis del Ca^{2+} (5,9). En esta línea de investigación estamos interesados en los sistemas reguladores del Ca^{2+} intracelular como posibles blancos quimioterapéuticos contra *T. cruzi*.

Drogas que afectan la homeostasis de Ca^{2+} en T. cruzi. La PMCA como posible blanco.

La regulación del Ca^{2+} en *T. cruzi* está dada por la actividad de un uniporte electroforético de Ca^{2+} en el mitocondrion, una Ca^{2+} -ATPasa en el retículo endoplasmático (SERCA) y una Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática (PMCA), siendo esta última la más importante al ser la responsable de mantener los niveles basales de Ca^{2+} (4). Se ha demostrado también la existencia de reservorios intracelulares de Ca^{2+} diferentes del retículo y la mitocondria como son los acidocalcisomas, los cuales también podrían jugar algún papel en la regulación del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos. Se ha estudiado el efecto de diferentes posibles drogas sobre los mecanismos que afectan la homeóstasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios, ya que su perturbación conlleva a la muerte de estos parásitos. Así, la amiodarona, un medicamento actualmente utilizado para las arritmias, produce la disrupción de la regulación del Ca^{2+} intracelular del *Trypanosoma cruzi*, colapsando el potencial mitocondrial y alcalinizando los acidocalcisomas (3,7). Sin embargo, esta droga, presenta efectos secundarios sobre los pacientes, debido a la presencia de yodo en su estructura. La Dronedarona, una droga desarrollada a partir de la amiodarona, pero que no posee yodo, tiene un efecto tripanocida similar, o aún superior, al de la amiodarona, afectando al parásito en su estadio intracelular amastigote, sin afectar a la célula de mamíferos. Esta droga induce tanto en *T. cruzi* como en *L. mexicana* un incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} , al alterar tanto el mitocondrion como los acidocalcisomas (3,15). Igualmente es capaz de producir un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular proveniente de organelos intracelulares en *L. mexicana* (3). La miltefosina, la primera droga en ser registrada en países como India, Alemania y Colombia, como un tratamiento oral efectivo contra la

leishmaniasis visceral, se ha reportado que induce un incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} , a través de la apertura de un canal en la membrana plasmática (13). Por otra parte, drogas como la pentamidina, una droga catiónica muy utilizada para la terapia y profilaxis de la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, también inhiben la PMCA en *T. brucei* y el transporte de Ca^{2+} de vesículas de membrana plasmática de estos parásitos, sin afectar la actividad de la PMCA de humanos (5). El cristal violeta, utilizado en los bancos de sangre de zonas endémicas para evitar la transmisión a través de transfusiones de la enfermedad de Chagas inhibe la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi* sin afectar la misma enzima de humanos, afectando la viabilidad del parásito (9).

Estas evidencias sugieren que los sistemas encargados de regular el Ca^{2+} en *T. cruzi* pudieran ser considerados como posibles blancos de drogas, en especial la PMCA, enzima clave en el mantenimiento de los niveles basales de Ca^{2+} en estos parásitos y crucial en el mantenimiento de sus funciones celulares. Sin embargo estos compuestos no han podido ser comercializados por diversas razones siendo el interés actual de muchas investigaciones la búsqueda de nuevos compuestos provenientes de productos naturales o derivados sintéticos de los mismos, los cuales pudieran ser menos tóxicos para el hospedador y que pudieran ser considerados de manera terapéutica.

Compuestos derivados de productos naturales como agentes terapéuticos que pudieran afectar la homeostasis de Ca^{2+} en los tripanosomatídios

Aceites vegetales de plantas aromáticas tropicales han resultado atractivos como nuevos materiales a utilizar como compuestos químicos, debido a su abundancia en la naturaleza, fácil extracción y sus grupos funcionales activos. Entre estos compuestos están las quinolinas encontradas en el cacao y el té negro y las tetrahydroquinolinas, encontradas en plantas de clavo y canela. Se han reportado varios trabajos donde se utilizaron diferentes derivados de quinolinas en tripanosomatídios, observándose su efectividad en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y visceral (10). Algunas de ellas tuvieron un efecto positivo *in vivo* al reducir las lesiones ocasionadas en ratones infectados con *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. donovani*. Asimismo, se ha reportado que algunas de la quinolinas y tetrahydroquinolinas estudiadas tienen un efecto citotóxico en amastigotes de *L. donovani* diez veces más activo que la droga de referencia utilizada (miltefosina) y con una baja toxicidad en las

células humanas (12). Es de interés de esta línea de investigación, estudiar el posible efecto de un grupo de compuestos derivados de Tetrahydroquinolinas (Serie DMs) sobre la proliferación del *Trypanosoma cruzi*, así como sobre su toxicidad en fibroblastos humanos. Asimismo, estudiar si aquellos compuestos que afectan la proliferación del parásito pudieran estar ejerciendo su efecto a través de la alteración de la funcionalidad de la PMCA. Un posible efecto diferencial de estos compuestos sobre la PMCA de *T. cruzi* y la PMCA de eritrocitos pudieran dar indicios para potencialmente explotar desde el punto de vista farmacológico los mismos con miras a ser considerados posibles agentes terapéuticos sobre el parásito. En este trabajo se analizaron 9 compuestos derivados de Tetrahydroquinolinas de la serie DM (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16) sobre la proliferación del *Trypanosoma cruzi*. De los 9 compuestos estudiados 3 de ellos tuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación de *T. cruzi*. Estos fueron: DM5, DM8 y DM12 (Fig. 1).

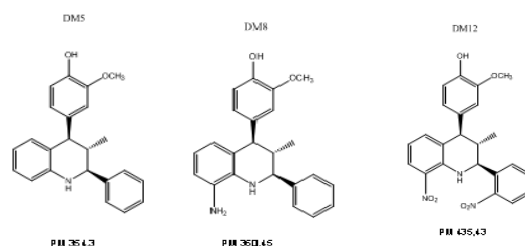


Figura 1: Estructura de los 3 derivados de Tetrahydroquinolinas seleccionadas (DM5, DM8 y DM12)

Como puede observarse en la Tabla 1, los compuestos DM5, DM8 y DM12 a una concentración de 15 μM , tuvieron un importante efecto inhibitorio sobre la proliferación del parásito 81,35%, 78,87% y 90,57% respectivamente, siendo el efecto de la misma concentración de la droga de referencia (Benznidazol) de 92,34%.

Tabla 1: Porcentaje de inhibición de la Proliferación de *T. cruzi* a una concentración de DM5, DM8, DM12 y Benznidazol de 15 μM .

Compuestos ensayados	% de inhibición de la proliferación de <i>T. cruzi</i>
DM5 15 μM	81,35 %
DM8 15 μM	78,87 %
DM12 15 μM	90,57 %
Benznidazol 15 μM	92,34%

Los compuestos DM5, DM8 y DM12 (Fig. 1) no mostraron ningún efecto importante sobre fibroblastos humanos ni sobre la actividad de la

PMCA purificada de eritrocitos humanos, lo cual lo hace interesante para ser explotados desde el punto de vista farmacológico con miras a ser considerados posibles agentes terapéuticos sobre el parásito.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Proyecto FONACIT S1-2001000789, CDCH-UCV PI 03-00-6375-2006 y a V. C. y Proyecto UCV No C. I. 2013-122 a V. C. y G. B.

Referencias

1. Ache, A. y Matos, A. (2001). Interrupting Chagas disease en Venezuela. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** **43:** 37-43.
2. Añez, N., Crisante, G. y Rojas, A. (2004). Update of Chagas disease in Venezuela-a review. **Mem. Inst. Osw. Cruz** **99:** 787-787.
3. Benaim, G., Casanova, P., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Parra-Giménez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J. L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A. y Suarez, A.I. (2014). Dronedarone, an Amiodarone Analog with an Improved Anti-Leishmania mexicana Efficacy. **Antimicrob. Agents Chemother.** **58:** 2295-2303.
4. Benaim, G. y García, C.R.S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of "Chagas" disease and leishmaniasis- a review. **Trop. Biomed.** **28:** 471-481.
5. Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1993) A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. **Biochem. J.** **296:** 759-763.
6. Benaim, G. y Paniz-Mondolfi, A.E. (2012). The emergin role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. **Nat. Rev. Cardiol.** **9:** 605-609.
7. Benaim, G., Sanders, J., García-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., León-Rossel, A., Concepción, J.L., Schijman, A., Levin, M., Oldfield, E. y Urbina J.A. (2006). Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **J. Med. Chem.** **49:** 892-899.
8. Docampo, R. (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by parasitic drugs. **Chem. Biol. Interact.** **73:** 1-27.
9. Docampo, R., Gadelha, F.R., Moreno, S.N.J., Benaim, G., Hoffmann, M.E. y Vercesi, A.E. (1993). Disruption of Ca²⁺ homeostasis in *Trypanosoma cruzi* by cristal violet. **J. Euk. Microbiol.** **40:** 311-316.
10. Fournet, A., Gantier, J.C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M.H., Mayrargue, J., Moskowitz, H., Cave, A. y Hoequemiller, R. 1994. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemother.** **33:** 537-544.
11. Kryshchysyn, A., Kaminsky, D., Grellier, P. y Lesyk, R. (2014). Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. **Eur. J. Med. Chem.** **85:** 51-64.
12. Loiseau, P.M., Gupta, S., Verma, A., Srivastaya, S., Puri, S.K., Sliman, F., Normand-Bayle, M. y Desmaele, D. (2011). In vitro activities of new 2-sustituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **55(4):** 1770-1780.
13. Maltezou, H.C. (2010). Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J. Biomed. Biotechnol.** 617-521.
14. OMS (2014). Enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/topics/chagas_disease/es/
15. Page, R., Hamad, B. y Kirkpatrick, P. (2009). Dronedarone. **Nat. Rev. Drug. Discov.** **8:** 769-770.
16. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet. Infect. Dis.** **1:** 92-100.
17. Rísquez, A. (2009). Mortalidad por enfermedad de Chagas. A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad reemergente de transmisión alimentaria. **Gac. Med. Caracas** **117:** 319-321.
18. Soeiro, M.N.C. y de Castro, L. (2009). *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert. Opin. Ther. Targets** **13:** 105-121.
19. Urbina, J.A., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazardí, K., Piras, R., Pérez, N., Winckler, P. y Ryley, J. (1996). Cure of short- and long- term experimental Chagas disease using D0870. **Science** **273:** 969-971.

Diferenciación en *Leishmania sp*: eventos celulares subyacentes

FRANCEHULI DAGGER BOYER

Laboratorio de Biología Celular de Parásitos Centro de Biología Celular
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: chichadagger@gmail.com

Protozoarios parásitos del género *Leishmania* miembros de la familia Trypanosomatidae, durante su ciclo de vida entre el intestino del vector flebotomino y el huésped vertebrado, confrontan ambientes diferentes, elevación de la temperatura, cambios de pH, variedad de nutrientes y disponibilidad de oxígeno, a los cuales responden diferenciándose en nuevas formas capaces de sobrevivir y proliferar dentro de los huéspedes. Este proceso complejo está acompañado por importantes cambios morfológicos y metabólicos, expresión de genes, modificación de organelos, expresión de proteínas de superficie y reducción del tamaño celular; algunos de estos procesos están asociados a mecanismos de autofagia. El proceso de diferenciación es considerado esencial para la sobrevivencia de los parásitos en diferentes huéspedes, y es un paso crítico en el establecimiento de la infección.

Introducción

Parásitos del género *Leishmania*, miembros de la familia Trypanosomatidae son los causantes de un espectro complejo de enfermedades conocidas como Leishmaniasis. Durante su ciclo de vida entre el intestino del vector flebotomino y el huésped vertebrado, los parásitos enfrentan ambientes diferentes y contrastantes, a los cuales responden diferenciándose en nuevas formas capaces de sobrevivir y proliferar dentro de los huéspedes. En el insecto vector y en cultivo, los parásitos crecen como promastigotes flagelados, diferenciándose en amastigotes aflagelados intracelulares en el fagolisoma del macrófago (27). Este estadio del parásito no solo soporta las nuevas condiciones sino que se multiplica dentro de la vacuola parasitófora, propagando la infección invadiendo otros macrófagos, luego de romper la célula huésped (21,22). Este proceso complejo está acompañado por importantes cambios morfológicos, metabólicos, la modificación de organelos, la reducción aproximadamente cuatro veces del tamaño celular y muy importante, asociado a éstos, el disparo de mecanismos de autofagia (4). En los diferentes estadios del ciclo de vida, se requiere una importante reprogramación metabólica especialmente en la velocidad y pH óptimo para muchos procesos, incluyendo síntesis de DNA, incorporación de nutrientes, expresión de genes específicos de amastigotes incluyendo la familia del gen A2, de la HSP100 y de una MAP kinasa ya identificados (2, 5,11,14). Adicionalmente ciertos miembros de la familia de los genes de la gp63 y PSA-2 están expresados diferencialmente en amastigotes y promastigotes y hay diferencias en el anclaje GPI (6,20). En contraste, algunos procesos disminuyen

notablemente como la biosíntesis de LPG, el cual es reemplazado por el fosfolípido glicoinositol (GIPL) como el mayor componente de la superficie (3).

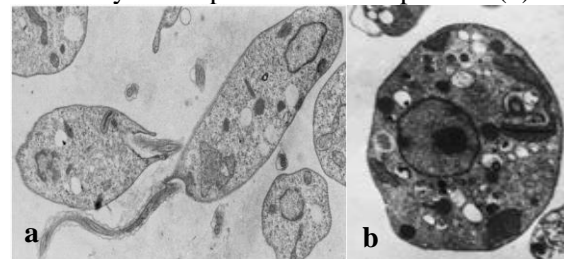


Fig. 1. *Leishmania mexicana*. a) forma promastigote en medio Lit, 26°C, pH 7.4. b) forma amastigote después de 72 h de incubación en medio Lit, 35°C, pH 5,5.

Un paso relevante en el estudio de la diferenciación de estos parásitos ha sido la imitación del proceso de diferenciación en cultivos axénicos, transfiriendo los promastigotes de 26°C, pH 7.0, condiciones similares a las del intestino del vector, a 36°C, pH 5.5; ambiente parecido a la vacuola parasitófora del macrófago (Fig. 1) (9,10,25). Durante muchos años, se han realizado diversos estudios bioquímicos, antigénicos, fisiológicos y ultraestructurales en numerosas especies de *Leishmania* expuestas “*in vitro*” a un aumento de la temperatura y acidificación del medio, induciéndose un drástico cambio de la forma y reducción del tamaño de la forma alargada del parásito de 20 a 25 μm , con flagelo libre, a una forma redondeada u ovoide de 4-5 μm de tamaño, sin flagelo libre, cambios morfológicos similares a los que ocurren durante el ciclo de vida natural de estos parásitos (27). Se han realizado estudios comparativos entre estas formas denominadas parecidas a amastigotes, y amastigotes intracelulares, estableciendo similitudes y

diferencias entre ellos (16,17); más aún, un número en ascenso de aislados de promastigotes de *Leishmania* han sido adaptados a condiciones axénicas e inducidas a proliferar por varios meses (10,23), lo que es una extraordinaria ventaja para el estudio del estadio amastigote.

El aumento de la temperatura y la disminución del pH son factores esenciales en el proceso de diferenciación multifactorial de promastigote a amastigote y viceversa (30). Algunos resultados controversiales han sido publicados en relación al papel que juegan estos factores en el proceso de diferenciación (1,31). Las alteraciones morfológicas, inducidas por la elevación de la temperatura en promastigotes de *Leishmania mexicana*, se correlacionan con los cambios en la rata de síntesis de la beta tubulina, la cual es reducida en amastigotes. También han sido observado cambios en el patrón transcripcional de beta tubulina durante la curva de crecimiento a 26°C y en respuesta a la elevación de la temperatura. El choque térmico conlleva a una reducción en la cantidad del transcrito menor en el promastigote de 2,4 kb y un aumento en el transcrito del amastigote de 2,8 Kb. Interesante, el transcrito más largo en promastigotes de 3,6 kb desaparece completamente bajo condiciones de choque térmico y en el estadio amastigote (5). En contraste con los resultados obtenidos con *Leishmania mexicana*, *Leishmania major* responde en forma diferente al ser transferidos los promastigotes a 36°C, no hay cambios morfológicos y el marcaje metabólico a 35°C de promastigotes de *L. major* mostraron que es inducida la síntesis de proteínas de choque térmico, pero la síntesis de proteínas celulares y la rata de síntesis de tubulina permanece igual. No se observan cambios en el patrón transcripcional de la beta tubulina. Así, *L. major* no muestra una respuesta típica al choque térmico y necesita factores adicionales para la transformación a la forma parecida a amastigotes bajo condiciones axénicas. Ha sido establecido que los promastigotes cultivados en medios ácidos son más resistentes a la lisis mediada por complemento y más infectivos “*in vivo*” que aquellos creciendo a pH neutro. También ha sido reportado, que la inducción de la metacicloogénesis por pH ácido es una respuesta conservada a través de una variedad de especies de *Leishmania* y que la diferenciación que ocurre durante la fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos, involucra una rápida exposición del parásito a un ambiente ácido (22,31). Hay evidencias que en especies de *Leishmania* del nuevo mundo el incremento de la temperatura parece ser la

señal mayor en la inducción de los cambios morfológicos a la forma amastigote (7). Sin embargo, otros estudios revelan la influencia específica de estos factores sobre la regulación diferencial de genes y hay evidencias recientes producidas por análisis de “clusters” que son consistentes con el papel predominante del incremento de la temperatura sobre la disminución del pH extracelular en el proceso de diferenciación a amastigote, lo cual ofrece nuevas visiones en la fisiología de *Leishmania* (1). Ha sido planteado que la virulencia de los parásitos de *Leishmania* se origina en su habilidad para soportar el amplio rango de condiciones desfavorables, lo cual está siendo extensamente estudiado (4).

Un carácter morfológico asociado al cambio de la forma promastigote a amastigote es el aumento observado del número, tamaño y densidad de las gotas lipídicas en el citoplasma de estos parásitos, lo cual sugiere una importante intervención del metabolismo lipídico en el proceso de transformación (13). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran un aumento en el contenido de lípidos, aumento de la longitud de las cadenas de los ácidos grasos y disminución de la insaturación de los ácidos grasos de la serie C18's, durante las primeras horas de incubación a 35°C. El contenido de esteroides sufre una disminución al compararse con el contenido de proteínas y respecto a la proporción de lípidos neutros. Una respuesta de la célula para copar con el incremento de la fluidez de la membrana al aumento de la temperatura (26). En los años 70 se obtuvieron indicaciones morfológicas del papel que juega la autofagia en la transición entre los pasos sucesivos de la diferenciación durante los ciclos de vida de los parásitos. Evidencias moleculares recientes le dan apoyo a su papel esencial en la diferenciación, la importancia del recambio de proteínas, y el papel de su inusual lisosoma (4,6,12,24). La remoción de organelos dañados o redundantes es una de las funciones de la autofagia, así como también es considerado un mecanismo de supervivencia bajo condiciones de falta de nutrientes, reciclando componentes citoplasmáticos bajo condiciones de “stress” y en el remodelado de la morfología celular (28,30). La autofagia juega también un papel muy importante en la reprogramación metabólica en los diferentes estadios del ciclo celular. Ha sido demostrado que el recambio proteico por macroautofagia es esencial para la metacicloogénesis y para la diferenciación de promastigotes a amastigotes (14,18). En las diferentes especies de *Leishmania*, el lisosoma presenta diversas formas

que reflejan las distintas funciones en los diferentes estadios de desarrollo. En el promastigote está presente una estructura tubular-vesicular denominada túbulo multivesicular, con un pH luminal relativamente alto y baja capacidad lítica, que acumula FM4-64 y otros marcadores endocíticos y contiene cisteína y serina peptidasas lisosomales (31), mientras que en amastigotes se ha evidenciado un compartimiento grande limitado por membrana denominado megasoma, que tiene un pH ácido y contiene diversas peptidasas (12). La alta variedad de enzimas en estas estructuras dependen del estadio de desarrollo del parásito. Hay dos cistein peptidasas lisosomales CPA y CPB implicadas en autofagia y desarrollo; se ha demostrado también que estas peptidasas están involucradas en el remodelaje celular y la reprogramación metabólica durante la transformación y adquisición de nutrientes en los diferentes estadios del ciclo de vida. La inhibición de estas enzimas o bloqueo de ambos genes impiden la diferenciación (28,29).

Otro reporte importante del papel esencial de la autofagia en la diferenciación es la observación de promastigotes mutantes ATG-2 nulos de *L. major* los cuales no se transforman a amastigotes (14). Más aún, ha sido demostrado que varias drogas tripanocidas disparan procesos parecidos a autofagia en estos parásitos, planteándose que la autofagia es usada por los parásitos en un esfuerzo por superar el “stress” causado por los compuestos tóxicos (19).

Así ha sido reportado que parásitos de *L. amazonensis* tratados con Amiodarona, una droga utilizada comúnmente como anti arrítmico, presentan entre otras alteraciones la formación de grandes autofagosomas que contienen parte del citoplasma y restos de membranas (8). También ha sido reportado que péptidos antimicrobianos son capaces de causar la muerte de promastigotes de *L. donovani* con la aparición de vacuolas que se tiñen con monodansylcadaverina, un marcador bioquímico de autofagia (3). La inhibición de la autofagia afecta la transformación, la sobrevivencia y /o la virulencia de los parásitos; considerándose a la autofagia como una promesa para el desarrollo de drogas contra enfermedades tropicales. Sin embargo, las investigaciones para explorar la posibilidad de usar la autofagia como blanco, aún están en su fase preliminar, pero parece factible debido al desarrollo de inhibidores que interfieren específicamente con proteínas del proceso autofágico en tripanosomatideos parásitos y no las del huésped, debido a que las secuencias de estas proteínas están pobremente conservadas (15).

En nuestro laboratorio hemos retomando esta línea de investigación, re-evaluando resultados obtenidos y experiencias acumuladas, a la luz de los nuevos hallazgos en el tema.

Referencias

1. Alcolea, P., Alonso, A., Gómez, M., Sánchez Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., González-Pastor, E., Toriño, A., Parro, V. y Larraga, V. (2010). Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics** 11: 19-24.
2. Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M., Jiménez, M. y Larraga, V. (2014). Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*; from the foregut of *Phlebotomous perniciosus* the human phagocyte. **BMC Genomics** 15; 849-852.
3. Bera, A., Singh, S., Nagaray, L. y Vaydia, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.** 127: 232-235.
4. Besteiro, S., Williams, R.A., Morrison, L.S., Coombs, G.H. y Mottram, J.C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.** 281: 11384-11396.
5. Besteiro, S., Williams, R.A. Coombs, G.H. y Mottram, J.C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.** 37: 1063-1075.
6. Brennand, A., Gualdron Lopez, M., Coppens, L., Ridgen, D.L., Ginger, M.L. y Michels, P.A. (2011). Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. **Mol. Biochem. Parasitol.** 177: 83-99.
7. Brennand, A., Rico, E. y Michels, P.A.M. (2012). Autophagy in trypanosomatids. **Cells** 1: 346-371.
8. de Macedo Silva, S.T., de Oliveira Silva, T.L., Urbina, J.A., de Souza, W. y Rodriguez, J.C. (2011). Antiproliferative, ultrastructural and physiological effects of amiodarone on promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. **Mol. Biol. Int.** 2011: 876-892.
9. Debrabant, A., Joshi, M.B., Pimenta, F. y Dwyer, D. (2004). Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes their growth and biological characteristics. **Int J. of Parasitol.** 34: 205-217.
10. Doyle, P.S., Engel, J.C., Pimenta, P.F., da Silva, P.P. y Dwyer, D. (1991). *Leishmania donovani* long term culture of axenic

- amastigotes at 37° C. **Exp. Parasitol.** **73**: 326-334.
11. **Fong, D. y Chang, K.P.** (1982). Surface antigen changes during differentiation of parasitic protozoan *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **79**: 7366-7376.
 12. **Galvao Quintao, L., Alfieri, S.C., Ryter, A. y Rabinovitch, M.** (1990). Intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* promastigotes to amastigotes; presence of megasomes, cysteine proteinase activities and susceptibility to leucine methyl ester. **Parasitology** **102**: 7-13.
 13. **Greenblatt, Ch. y Wetzel, B.K.** (1966). Alterations in fatty acid metabolism and morphology of *Leishmania enrietti* exposed to elevated temperature. **J. Protozoology** **13**: 521-531.
 14. **He, C. y Klionsky, D.J.** (2009). Regulation mechanism and signaling pathways of autophagy. **Ann. Rev. Genet.** **43**: 67-93.
 15. **Herman, M., Gillies, S., Michels, P.A. y Ridgen, D.J.** (2006). Autophagy and related processes in trypanosomatids: Insights from genomics and bioinformatic analyses. **Autophagy** **2**: 107-118.
 16. **Holzer, T.R., Mc Master, W.R. y Forney, J.D.** (2006). Expression profile by whole genome interspecies microarrays hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion derived amastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **146**: 198-218.
 17. **Hunter, K.W., Cook, C.L. y Hensen, S.A.** (2009). Temperature induced *in vitro* transformation of *Leishmania mexicana* I. Ultrastructure comparison of cultured transformed and intracellular amastigotes. **Acta Tropica** **143**: 150-156.
 18. **Malcolm, J., Mac Conville, J. y Nederer, T.** (2011). Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. **Ann. Rev. Microbiol.** **6**: 543-546.
 19. **Monte Neto, J.L., Souza, M.L., Diaz, C.S., Barboza Filho, J.M., Oliveira, M.R. y Figueredo, R.C.** (2011). Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin a lignin obtained from *Ocotea duckei*. **Exp. Parasitol.** **127**: 215-221.
 20. **Naderer, T., Vince, J.E y McConville, M.J.** (2004) Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Curr. Mol. Med.** **4**: 649-665.
 21. **Pan, A.A.** (1984). *Leishmania mexicana* serial cultivation of intracellular stages in a cell free medium. **Exp. Parasitol.** **58**: 72-80.
 22. **Pan, A.A. y Honigber, B.M.** (1985). *Leishmania mexicana pifanoi* *in vivo* and *in vitro* interactions between amastigotes and macrophages. **Parasitol. Res.** **71**: 3-13.
 23. **Raney, P.M., Spithill, Y.N., Mac Mahon- Pratt and Pan, A.A.** (1991). Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. **Mol Biochem Parasitol** **49**: 111-118
 24. **Saxena, H., Lahay, T., Holland, N., Aggarwald, G., Huang, Y., Volkpin, H., Myla, P.J. y Zilverstein, D.** (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptoma reveals an orderer progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Mol. Biochem Parasitol.** **152**: 53-65.
 25. **Stinson, S., Sommer, J.R. y Blum, J.J.** (1989). Morphology of *Leishmania braziliensis*: changes during reversible heat-induced transformation from promastigotes to ellipsoidal forms. **J. Parasitol.** **75**: 431-440
 26. **Urdaneta, J.** (1989). Caracterización celular y molecular del proceso de transformación *in vitro* de *Leishmania mexicana*. **Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela.**
 27. **Wheeler, J., Gluenz, E. y Gulk, K.** (2011). The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetics events and their implications for parasite biology. **Mol. Microbiol.** **79**: 647-662.
 28. **Williams, R.A., Telley, L., Mottram, C., y Coombs, G.H.** (2006). Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol Microbiol.** **61**: 655-674.
 29. **Williams, R.A., Woods, K.L., Juliano, L. y Coombs, G.H.** (2009). Characterization of unusual families of ATYG8 like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Autophagy** **5**: 159-172.
 30. **Zilverstein, D. y Shapira, M.** (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.** **48**: 449-470.
 31. **Zilverstein, D., Blumenfeld, N., Liveanu, V., Gepstein, A. y Jaffe, C.L.** (1991). Growth in acidic pH induces an amastigote like stage specific protein in *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **15**: 175-178.

Concentración de calcio en saliva en pacientes con Periodontitis Crónica y Agresiva antes y después del tratamiento periodontal

JOSÉ MEJÍA^{1,2}, MARIA-ANTONIETA MÉNDEZ³ Y VALENTINA SALAS¹

¹Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular Aplicada, ²Postgrado en Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, ³Postgrado en Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela.

Correo-e: valentina.salas@ciens.ucv.ve

Las enfermedades que afectan a los tejidos de soporte de los dientes son denominadas enfermedades periodontales (EP). Las más comunes son la periodontitis crónica (PC) y la periodontitis agresiva (PA). Las lesiones son provocadas por microorganismos patógenos presentes en la biopelícula dental. La saliva humana se ha convertido en un fluido de interés como herramienta de diagnóstico temprano, por la presencia de una variedad de posibles biomarcadores para la enfermedad periodontal. El Ca^{2+} salival es fácilmente incorporado por la biopelícula dental, favoreciendo la formación del cálculo dental. El objetivo fue determinar la concentración de Ca^{2+} salival en pacientes afectados con PC y PA antes y después del tratamiento periodontal. Participaron personas con edades entre 20 y 60 años, divididos en 3 grupos: Controles (C) (49), periodontitis crónica generalizada (PCG) (90) y PA (36). Los resultados mostraron que las diferencias de concentraciones de Ca^{2+} entre los grupos fue estadísticamente significativa, encontrándose estas diferencias entre los grupos controles, cuya concentración fue $0,84 \pm 0,23$ mM y $1,30 \pm 0,42$ mM en pacientes con PCG y $1,44 \pm 0,57$ mM en pacientes con PA. Luego del tratamiento, las concentraciones de Ca^{2+} en los pacientes disminuyeron, siendo similar a la de los controles.

Introducción

La Periodontología es la especialidad contemporánea que emerge de la odontología para sustentar el estudio científico sobre el estado del periodonto sano y enfermo. El periodonto, también llamado aparato de inserción o tejido de sostén del diente, es una unidad funcional, cuyo objetivo principal es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. Está conformado por un periodonto de protección, que lo integra la encía y uno de inserción que comprende al ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar (3).

Las enfermedades que afectan a los tejidos de soporte de los dientes son denominadas enfermedades periodontales, y se clasifican en gingivitis y periodontitis, éstas son condiciones inflamatorias, que en el caso de la gingivitis involucra a la encía y en la periodontitis al ligamento, cemento periodontal y hueso alveolar. El proceso destructivo da lugar a la migración apical del epitelio de unión y afección de los tejidos periodontales profundos: el cemento radicular queda expuesto y tanto el ligamento

periodontal como el hueso alveolar que rodean a la superficie radicular expuesta, se destruye (2).

La forma más común de periodontitis es la crónica, se caracteriza por ser de evolución lenta. Al ser un proceso indoloro, el paciente por lo general ignora los primeros síntomas de la enfermedad, por tanto la formación de los sacos periodontales y la resorción del hueso alveolar pueden demorar años y el tiempo que transcurre desde que se inicia la enfermedad hasta que se llega a perder un diente, puede contarse en décadas. Es la forma de periodontitis más frecuente en la población adulta mundial afectando a un 60%, tanto en Norteamérica como Europa y más del 60% en América Latina (8). La periodontitis agresiva, aunque es una forma poco habitual de periodontitis, se caracteriza por ser de muy rápida progresión en la destrucción de los tejidos y porque el tiempo que transcurre desde su inicio hasta la pérdida del diente, puede ser muy breve. La velocidad de su avance es lo que determina su gravedad. Si bien las lesiones periodontales son de una forma general provocadas por microorganismos patógenos presentes en la biopelícula dental, otros factores como la genética,

la dieta y estilo de vida contribuyen al avance de la enfermedad, haciendo de la periodontitis una patología bastante compleja, siendo insuficiente una aproximación clínica de la misma (8,9). Recientemente, se han realizado esfuerzos para conocer mejor la etiopatogenia de las diferentes enfermedades periodontales, y para desarrollar herramientas de diagnóstico temprano. En este contexto, la saliva humana, cuyas funciones biológicas son esenciales para el mantenimiento de la salud bucal, la han convertido en un fluido de gran interés en los últimos años. La saliva que circula en la boca en un momento dado, se denomina saliva total y se compone de una mezcla de secreciones de las glándulas salivales mayores y menores y trazas de fluido gingival crevicular. La rica variedad de moléculas presentes en las secreciones salivales, hace que la saliva sea una atractiva fuente de biomarcadores de la enfermedad periodontal. En este sentido, los investigadores han estado desarrollando herramientas de diagnóstico salival para diagnosticar tanto las enfermedades bucales como sistémicas. Este fluido tiene muchas ventajas como medio para el diagnóstico clínico (2).

El flujo y la composición de la saliva total influencia la formación de cálculo dental que es un factor que contribuye a la enfermedad periodontal. Mandel (6,7) reportó que los pacientes que producían abundante cálculo presentaron elevadas concentraciones de Ca^{2+} tanto en la biopelícula como en la saliva de las glándulas submaxilares, sugiriendo que personas con un aumento en concentraciones de Ca^{2+} pueden ser susceptibles a la formación de cálculo y periodontitis, debido a que se dificulta la remoción de la biopelícula dental. Sewón y colaboradores (10) reportaron que el potencial de mineralización intra-oral de individuos periodontalmente sanos, sin resorción ósea alveolar marginal, es diferente a la de la de los individuos que ya han sido tratados periodontalmente (10). Estos investigadores sugieren que a los tres días de establecida la biopelícula ésta calcificaba rápidamente en aquellos pacientes que presentaron resorción ósea periodontal. Los individuos con un periodonto sano presentaron una biopelícula que no mostró ningún signo de calcificación (10).

El objetivo del presente trabajo consistió determinar la concentración de calcio salival, en pacientes venezolanos afectados con periodontitis

crónica y agresiva antes y después del tratamiento periodontal.

Participaron personas con edades comprendidas entre 20 y 60 años y fueron clasificados en tres grupos: Controles (49), pacientes con periodontitis crónica generalizada (90) y pacientes con periodontitis agresiva (36), provenientes de la Clínica del Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. La Historia Clínica incluyó: anamnesis, examen clínico (exploración, palpación, sondaje), examen radiográfico (radiografía panorámica y periapical completo con técnica de cono paralelo).

El tratamiento periodontal consistió en la aplicación de medidas de higiene bucal, como son: enseñanza de la técnica de cepillado, uso del hilo dental y medios auxiliares, control de la biopelícula dental, así como la eliminación de los irritantes locales por medio de la tartrectomía manual y ultrasónica, raspado y alisado radicular en los cuatro cuadrantes y pulido de las superficies dentarias.

Antes de obtener las muestras de saliva, previo conocer y firmar el consentimiento informado, los pacientes estuvieron al menos una hora o más sin comer, beber, ni realizar método de higiene bucal alguno. Se colectaron 2 mL de saliva no estimulada. Las muestras de saliva fueron colectadas entre las 13:00 y 16:00 horas, conservadas y transportadas al laboratorio en frío. Se excluyeron pacientes con: Enfermedades sistémicas, gestantes, fumadores, ingesta de medicamentos o antibióticos seis meses antes.

Concentración de Ca^{2+} en saliva de pacientes con periodontitis crónica y agresiva

La determinación de la concentración de Ca^{2+} fue realizada mediante el método de Connerty & Briggs (4). Se tomaron 2 μ L del sobrenadante de la saliva total centrifugada a 16.000 g y seguidamente se añadieron 198 μ L de la mezcla del cromógeno: o-cresoltaleína complexona (0,8 mg/mL), 8-hidroquinoleína (5% p/v) y tampón etanolamina-borato (14,8 M), la mezcla fue agitada y se mantuvo en reposo por 5 minutos. Finalmente se midió en un lector de ELISA (TECAN®) a 570 nm. Paralelamente, se realizó una recta de calibración con $CaCO_3$, en concentraciones

crecientes usando una solución patrón de 1mM de CaCO_3 .

generalizada (PCG) y periodontitis agresiva (PA), antes y después del tratamiento periodontal.

En la Figura 1 se presentan los resultados de la concentración de calcio salival en individuos sanos, diagnosticados con periodontitis crónica

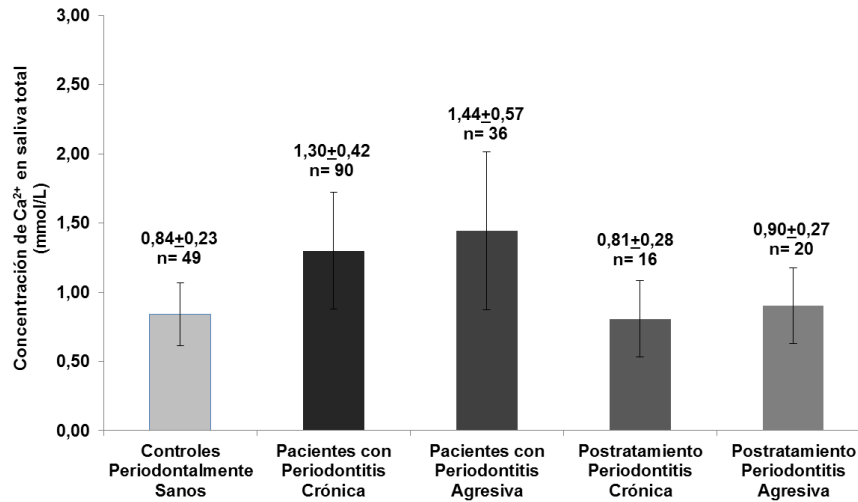


Figura 1. Concentraciones de calcio en saliva total determinadas por el método de Connerty y Briggs (4), en controles periodontalmente sanos, pacientes con periodontitis crónica generalizada (PCG) y pacientes con periodontitis agresiva (PA), antes de después del tratamiento periodontal. Se muestran los valores promedios \pm la desviación estándar y el número de pacientes (n).

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró que las diferencias de concentraciones de calcio entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), encontrándose estas diferencias entre los grupos control o individuos periodontalmente sanos, cuya concentración fue de $0,84 \pm 0,23$ mmol/L y pacientes con periodontitis crónica generalizada (PCG), con una concentración de $1,30 \pm 0,42$ mmol/L ($p < 0,05$). De igual forma, se encontraron diferencias al contrastar el grupo control y los pacientes con PA ($p < 0,05$), grupo que presentó una concentración de $1,44 \pm 0,57$ mmol/L, valor que si bien es mayor que en el grupo diagnosticado con PCG, no es una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Estos resultados coinciden con lo descrito por Sewón y colaboradores (10) en una población europea, reportando un incremento estadísticamente significativo en pacientes diagnosticados con periodontitis crónica (11). Los pacientes fueron llamados nuevamente, una vez que se les había realizado el tratamiento periodontal no quirúrgico, para evaluar si existían cambios significativos en la concentración de Ca^{2+} con respecto a la primera vez que asistieron a la

clínica. Luego del tratamiento, los pacientes mostraron una disminución significativa de las concentraciones de Ca^{2+} salival, siendo ésta, en el grupo de postratamiento con periodontitis crónica de $0,81 \pm 0,28$ mmol/L, en contraste con el grupo de pacientes diagnosticados inicialmente con periodontitis crónica ($1,30 \pm 0,42$ mmol/L), incluso las concentraciones de Ca^{2+} en estos pacientes postratamiento llegaron a ser similares a los controles ($0,84 \pm 0,23$ mmol/L). En el caso de las concentraciones de Ca^{2+} entre el grupo de pacientes con periodontitis agresiva postratamiento ($0,90 \pm 0,27$ mmol/L) y grupo de pacientes con periodontitis agresiva previo al tratamiento ($1,44 \pm 0,57$ mmol/L), la disminución en las concentraciones de Ca^{2+} salival también fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Estos resultados mostraron que la concentración de Ca^{2+} en saliva, tanto de los pacientes con PCG como con PA, aumentó respecto a la concentración en los controles sanos, y que luego, posterior al tratamiento, los niveles de Ca^{2+} en los pacientes vuelven a ser similares al de los controles, lo cual indica que la concentración de Ca^{2+} es un parámetro importante durante el desarrollo de las

enfermedades periodontales y que vuelve a ser normal al controlar la enfermedad.

Resultados similares han sido encontrados por otros investigadores en pacientes de otras latitudes. En un estudio piloto, un alto nivel de Ca^{2+} salival fue asociado con la enfermedad periodontal en individuos indios. La media de edad de los pacientes fue de $46,6 \pm 6,9$ años y de los controles $42,4 \pm 6,3$ años. La media de la concentración de Ca^{2+} en los pacientes fue $2,11 \pm 0,24$ mmol/L, significativamente más alta que en el grupo control $1,86 \pm 0,25$ mmol/L, calculado con el programa ANCOVA que realiza el ajuste por edad (1).

Igualmente en pacientes Indios, Gupta y colaboradores (5), en un estudio clínico-bioquímico de la saliva de pacientes con PA, encontraron un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} en pacientes con PA tanto fumadores como no fumadores con respecto a los controles. Dichos resultados revelaron que el calcio salival más alto se observó en el grupo de pacientes con PA y fumadores, con un valor medio de $2,62 \pm 0,01$ seguido por el grupo de pacientes con PA pero no fumadores ($2,11 \pm 0,01$) y el menor valor se observó en el grupo control ($2,01 \pm 0,08$). Los valores de referencia de concentración de Ca^{2+} salival se encuentran entre $0,5-2,7$ mmol/L. El aumento del Ca^{2+} en saliva en fumadores coincide con un incremento en la placa dental con respecto a los no fumadores (5).

Se puede destacar que nuestros resultados se encuentran dentro de estos valores y si bien en pacientes fumadores el aumento del Ca^{2+} en saliva tiene otras implicaciones adicionales, es notorio que en la enfermedad periodontal estos valores están significativamente elevados.

La enfermedad periodontal se asocia con niveles más altos de Ca^{2+} salival que la salud periodontal, lo que indica que el nivel de Ca^{2+} de la saliva podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades periodontales (1). Asimismo, puede ser un factor indicador de la enfermedad.

Estos hallazgos podrían ser de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad periodontal utilizando la saliva.

Referencias

1. Acharya, A., Kharadi, M.D., Dhavale, R., Deshmukh, V.L., Sontakke, A.N. (2011). High salivary calcium level associated with

periodontal disease in Indian subjects-a pilot study. **Oral Health Prev. Dent.**, **9**: 195-200.

2. Aguilar, L. y Romero, M. (2003). La saliva: revisión sobre composición, función y usos diagnósticos. **Universitas Odontológicas**, **23**: 18-24.
3. Beck, J. y Arbes S. (1998). Epidemiología de las Enfermedades Gingivales y Periodontales. En Carranza, F y Newman, M. editores. **Periodontología Clínica**. Editorial Mc Graw-Hill. México. **5**: 99-76.
4. Connerty, H. y Briggs, A. (1966). Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. **Am. J. Clin. Pathol.**, **45**: 290-296.
5. Gupta, V., Chitkara, N., Gupta, H., Singh, A., Gambhir, R. y Kaur, H. (2016). Comparison of Salivary Calcium Level and pH in patients with Aggressive Periodontitis and Healthy Individuals: A clinic-biochemical study. **OHDM**, **15**: 122-126.
6. Mandel, I. (1974a). Biochemical aspects of calculus formation (I). Comparative studies of plaque in heavy and light calculus formers. **J. Period. Res.**, **9**: 10-17.
7. Mandel, I. (1974b). Biochemical aspects of calculus formation (II). Comparative studies of saliva in heavy and light calculus formers. **J. Period. Res.**, **9**: 211-221.
8. Oppermann, R. (2007). An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. **Braz. Oral Res.**, **21**: 8-15.
9. Oppermann, R. (2013). Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. **Periodontology 2000**, **67**: 13-33.
10. Sewón, L.A., Söderling, E. y Karjalainen, S. (1990). Comparative study on mineralization-related intraoral parameters in periodontitis-affected and periodontitis-free adults. **Scand. J. Dent. Res.**, **98**: 305-312.
11. Sewón, L.A., Karjalainen, S.M., Sainio, M. y Seppä, O. (1995). Calcium and other salivary factors in periodontitis-affected subjects prior to treatment. **J. Clin. Periodontol.**, **22**: 267-270.

Método para la cuantificación de triglicéridos en el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae* L.

INGRID FONSECA¹, CARLOS AGUILAR² Y MERIS CASOTTO¹

¹Laboratorio de Biofísica, ²Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Dpto. Tecnología de Alimentos Universidad de Oriente Núcleo Nueva Esparta, ¹Laboratorio de Bioquímica Nutricional Centro de Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: meris.casotto@ciens.ucv.ve

Los modelos animales con insectos, permiten evaluar desordenes nutricionales asociados a los mecanismos de reservas energéticas tales como diabetes y obesidad, debido a que es un proceso conservado evolutivamente. En los insectos los triglicéridos y los ésteres de colesterol son metabolizados en ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y esteroides libres en el intestino. Los lípidos digeridos pueden ser absorbidos por las células intestinales donde los triglicéridos son empaquetados junto con el colesterol, los esteroides de colesterol y proteínas transportadoras, siendo almacenados en cuerpos grasos, intestino y oenocitos. Con el objeto de establecer un método de determinación de triglicéridos en el bioensayo del gorgojo del arroz se realizó la extracción de grasas con diferentes soluciones, NaCl 8,5g/L, tritón X-100 1%, DMSO 5% y la mezcla de los tres, realizando o no la extracción previa de grasas con el método del éter de petróleo. Empleando estuches comerciales enzimáticos, se demostró que la extracción con tritón X-100 1%, resulta ser altamente efectiva para la cuantificación de triglicéridos. Se demostró adicionalmente que la extracción permite cuantificar colesterol enzimáticamente. Los resultados preliminares indican que este parámetro podría ser ventajoso para el estudio nutricional de dietas ricas en grasa o suplementadas con omega 3.

Introducción

Los animales han evolucionado de tal forma que los excesos de grasas y azúcares que no son requeridos metabólicamente para la formación de energía y de otros compuestos son almacenados en reservorios, como una función biológica indispensable para la supervivencia en tiempos de ayuno y cambio en la disponibilidad de nutrientes (6,12,14). Estudios recientes han demostrado que el empleo de modelos nutricionales animales con insectos, como es el caso de *Drosophila melanogaster* (uno de los más estudiados) permiten evaluar desordenes en los mecanismos de las reservas energéticas asociadas a la diabetes y la obesidad.

En los insectos en condiciones de alimentación normal, los triglicéridos dietarios y los ésteres de colesterol son metabolizados en ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y esteroides libres en el intestino. Los lípidos digeridos pueden ser absorbidos por las células intestinales donde los triglicéridos son empaquetados junto con el colesterol, los esteroides de colesterol y proteínas transportadoras para formar lipoproteínas que son transportadas a través del cuerpo; la mayoría de estos lípidos residen en los cuerpos grasos, aunque pueden estar presentes en el intestino y en oenocitos de larvas y adultos (14). De este modo en los insectos, al igual que en los otros individuos de la escala animal, la composición lipídica y sus proporciones pueden variar de acuerdo al fenotipo y la dieta (6). Estos metabolitos tienen la ventaja de que pueden ser cuantificables bien sea por métodos colorimétricos, enzimáticos o

cromatográficos (14), permitiendo medir la variación y hacer un seguimiento de los mismos aplicando dietas controladas. En cuanto a los métodos de determinación del glicerol, el triglicérido es hidrolizado para remover los ácidos grasos y así determinar el glicerol libre, cuya concentración es equivalente a la del triglicérido. En los métodos enzimáticos se realizan midiendo el glicerol contenido en las moléculas de triglicéridos luego de una hidrólisis química o enzimática (lipasas combinadas con proteasas) para remover ácidos grasos, resultando ser una técnica directa rápida, específica y de alta sensibilidad. Uno de los métodos más empleados se basa en la reacción acoplada con cuatro enzimas: 1) lipasa, hidroliza los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos; 2) glicerol quinasa, la cual fosforila al glicerol, formando glicerol 1-fosfato; 3) glicerol fosfato oxidasa, quien oxida al glicerol 1-fosfato, formando dihidroxiacetona-fosfato y peróxido de hidrógeno y 4) la peroxidasa (que en presencia de la 4-aminofenazona forma una quinona de color rosado a partir del peróxido de hidrógeno). La ventaja de este método es que ha sido adaptado por diversas casas comerciales para la elaboración de kits diagnósticos que pueden ser utilizados de manera manual o automatizada (15).

El gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae* L. ha demostrado ser un modelo animal exitoso para estudios nutricionales. Éste se sustenta en el hecho de compartir con los animales superiores los mismos requerimientos nutricionales (carbohidratos, grasas, proteínas) y las rutas metabólicas para la utilización

de dicho nutrimento han sido conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Mediante dicho modelo se han logrado identificar diferentes biomarcadores; destacándose el monitoreo de la supervivencia y el peso corporal, la determinación de la composición corporal (agua, grasa, proteínas, carbohidratos y otros), excreción de ácido úrico, actividad de la alfa amilasa intestinal. Todos los biomarcadores antes mencionados se han utilizado en la evaluación del valor nutritivo de diversos alimentos (2,3,4,5,8,9,10, 11,16).

Actualmente se conoce la importancia que tiene el consumo de grasas poliinsaturadas como el omega 3 para la salud de la población. La industria alimenticia ofrece una variedad de productos suplementados con dicho compuesto. Si quisiéramos conocer el efecto que tienen esos alimentos sobre el organismo, midiendo en el gorgojo de arroz la grasa corporal, sin cuantificar el contenido de triglicéridos y otros componentes grasos como el colesterol, no podríamos observar el efecto real que ellos producen. Esta es la razón por la cual, en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo nos encontramos enfocados en la estandarización de métodos para la determinación de los triglicéridos y el colesterol.

Estandarización del método para la determinación de triglicéridos

Se utilizaron gorgojos adultos de arroz, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), cultivados en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional, estos individuos son mantenidos en frascos con arvejas verdes peladas y partidas almacenados en oscuridad a 25°C. Una vez transcurridos 15 días, los insectos padres son retirados de los cultivos para después de de 3 a 4 días cuando ocurre la emergencia de la progenie obtener la F1, poblaciones relativamente homogéneas de insectos con una edad y una masa corporal semejantes (7). Nosotros seleccionamos individuos adultos (triplicados) con un peso promedio de 1,8±0,5 mg. Los cuales una vez pesados se mantuvieron congelados a -20°C hasta su procesamiento. El primer paso para la estandarización de este ensayo fue la determinación de la cantidad de agua y grasa corporal, que se realizaron según el método establecido por la AOAC International (1). Para la estimación del contenido de grasa los insectos deshidratados, se colocaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 2 mL de éter de petróleo y se homogeneizaron, con 10 golpes a 1.000 rpm, trasvasándose la suspensión a un tubo de ensayo de dimensiones 75 x 10 mm realizando la eliminación de restos cuticular por precipitación. La extracción con éter fue realizada 3

veces y la grasa se determinó por diferencia de peso una vez evaporado el solvente. De este modo se estimó que el porcentaje de grasa corporal de 10,4% ± 1,4. Conociendo el porcentaje total de grasas corporales procedimos a la estandarización de un método de extracción de las mismas que permitiera la cuantificación de triglicéridos sin afectar la actividad enzimática del estuche comercial de los laboratorios CHEMROY. De esta forma se utilizaron diferentes solventes: NaCl 0,85%; dimetilsulfóxido 5% (DMSO) y tritón X-100 (T, detergente no iónico). Las concentraciones utilizadas para cada uno de los compuestos fueron las adecuadas para las enzimas que emplea el kit anteriormente mencionado. Se preparó de este modo una mezcla compuesta de NaCl 0,85%/ DMSO/ tritón X-100 incluyendo los respectivos controles de cada solución por separado, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Soluciones empleadas para la extracción de triglicéridos.

Mezcla	Componentes	Extracción previa con éter
T	T 1%	No
N	NaCl 0,85%	No
D	DMSO 5%	No
TND	T 1%/NaCl 0,85% / DMSO 5%	No
ET	T 1%	Si
EN	NaCl 8,5g/L	Si
ED	DMSO 5%	Si
ETND	T 1%/NaCl 0,85% / DMSO 5%	Si

Con cada una de estas soluciones se prepararon homogenatos de 30 individuos, se colocaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 2 mL de cada mezcla y se homogeneizaron, con 10 golpes a 1.000 rpm. El sobrenadante fue centrifugado durante 15s a 8.000 Xg para eliminar los residuos cuticulares. Adicionalmente con el objeto de determinar si la extracción previa con éter de petróleo afectaba la actividad enzimática; una vez extraída la grasa corporal por este método en vidrios de reloj, la misma fue resuspendida en las soluciones especificadas en la Tabla 1. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y las muestras se mantuvieron a -20°C por un máximo de 48 horas hasta su procesamiento. Para la cuantificación enzimática de triglicéridos se empleó el estuche comercial de los laboratorios CHEMROY ® No. CR313, CR315 de acuerdo a las instrucciones de la casa fabricante. Además, a modo comparativo, se realizaron dos curvas de calibración: una con glicerol grado molecular a 200 mg/dL y otra con el estándar comercial del estuche el cual contiene una solución equivalente a 200 mg/dL de trioleína (triglicérido derivado del glicerol). Mediante estas

curvas de calibración se calculó el porcentaje de triglicéridos obtenido para cada uno de los compuestos de extracción a fin de determinar el de mayor rendimiento. El tritón X100 1% y la mezcla NaCl 8,5g/L/ DMSO/ tritón X-100 resultaron ser los más óptimos, para cualquiera de los dos procedimientos de extracción de grasa. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 1, se obtuvo un mayor rendimiento cuando no se extrajo previamente con éter de petróleo (A y D). Además, se encontró que ni la solución salina (NaCl 0,85%, B) ni la solución compuesta por DMSO al 5% (C), permitieron la extracción de grasas y posterior cuantificación de los triglicéridos (Fig. 1), determinándose que el detergente tritón X-100 al 1% es el compuesto por el cual se puede extraer la grasa y que no afecta la actividad enzimática.

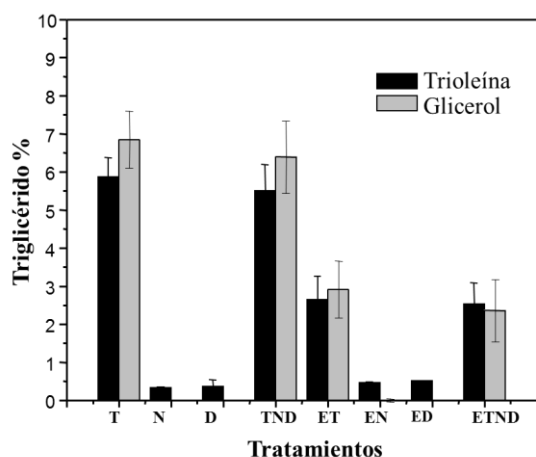


Figura 1. Comparación entre los porcentajes de triglicéridos obtenidos con los compuestos de extracción de grasa. Medidos con dos curvas de calibración elaboradas con una solución patrón de trioleína y una de glicerol. T: Tritón X-100 1%; N: NaCl 0,85%; D: DMSO 5%; TND: Tritón X-100 1% / NaCl 0,85%/DMSO 5%. El prefijo E representan los mismos compuestos, donde la grasa fue previamente extraída con éter de petróleo.

Con la finalidad de validar el ensayo se enviaron alícuotas de las mismas muestras procesadas con las que se logró la extracción de triglicéridos al laboratorio clínico Elizabeth Gutiérrez para la elaboración de un perfil lipídico el cual incluyó la cuantificación enzimática automatizada de triglicéridos, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y VLDL-colesterol empleando el equipo semiautomático Olympus modelo AU 640 (Albany, USA).

La Fig. 2 muestra la comparación entre el porcentaje de triglicéridos medidos en el gorgojo de arroz mediante el kit utilizado y el método de medición semiautomático. Como puede observarse en dicha figura, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la extracción de grasa con tritón

X-100 1% (T) y la mezcla (TND). Asimismo no existen diferencias significativas entre los tratamientos previos con éter de petróleo (ET y ETND).

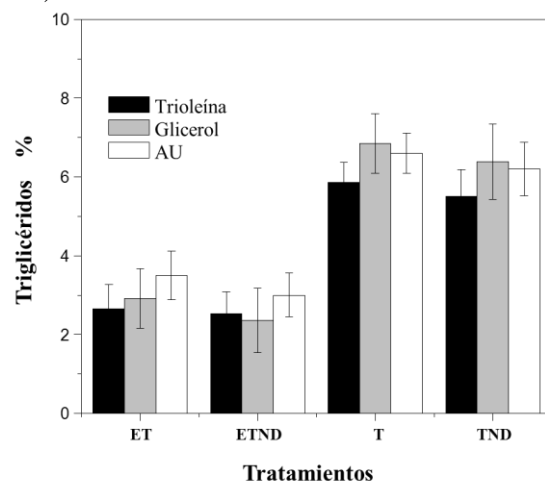


Figura 2. Comparación entre los porcentajes de triglicéridos obtenidos por el método manual (medido con dos curvas de calibración elaboradas con una solución patrón de trioleína y con una de glicerol) y semiautomatizado (SA). T: Tritón X-100 1%; TND: Tritón X-100 1%/NaCl 0,85%/DMSO 5%. El prefijo E representa los mismos compuestos, donde la grasa fue previamente extraída con éter de petróleo.

Finalmente, se encontró que estos métodos resultaron útiles para evaluar, mediante el perfil lipídico enzimático, el porcentaje de colesterol total, de baja y alta densidad, encontrándose que los porcentajes para el HDL-colesterol y LDL-colesterol resultaron ser negativos en todas las muestras, mientras que los valores de colesterol total tuvieron una variación ente $1,4 \pm 0,1$ para T y TND, y de $0,7 \pm 0,5$ para ET y ETND manteniéndose el mismo comportamiento en las mediciones obtenidas para la determinación de triglicéridos, mientras que el VLDL-colesterol no pareció variar independientemente el método de extracción aplicado. De este modo se obtuvo un 0,1% de colesterol total con todos los métodos de extracción empleados y un $1,3 \pm 0,1$ de VLDL-colesterol cuando la extracción fue realizada con tritón. Es importante destacar que la suma de los valores obtenidos entre triglicéridos, colesterol total y VLDL-colesterol no superaron el % total de grasas caporales obtenidas encontrándose en mayor proporción de triglicéridos que de los otros dos componentes lipídicos (hasta un 6,8%), lo cual valida los métodos de extracción y cuantificación empleados.

Los resultados obtenidos nos permitieron establecer un método de cuantificación de triglicéridos y otros componentes lipídicos a través de ensayos

enzimáticos que pudieran ser aplicados en el bioensayo del gorgojo del arroz. Actualmente se están haciendo pruebas para evaluar las variaciones de los mismos sometidos a diferentes dietas. La determinación de triglicéridos y otros componentes lípidos en insectos utilizando métodos enzimáticos que usualmente son empleados para la determinación de muestras clínicas; ha sido previamente validado en *D. melanogaster*, donde se ha encontrado variaciones significativas cuando son sometidas a dietas con diferentes contenidos de glucosa (12,14). En abejas (*Apis mellifera*) se ha determinado que el contenido de triglicérido se modifica cuando son sometidas a dietas altas en cafeína (13). Por tanto consideramos que es un método aplicable en el sistema experimental del gorgojo del arroz para evaluar efectos nutricionales de las diferentes dietas rica en azúcares o con suplementos de ácidos grasos insaturados.

Referencias

1. **AOAC International.** (1984). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Décimocuarta edición. Washington D.C., EE. UU.
2. **Carmona, A. y Liuzzi, J.P.** (1998). Biodisponibilidad de nutrientes: fácil de definir, difícil de evaluar. **Anales Venezolanos de Nutrición 11:** 66-78.
3. **Carmona, A. y Casotto, M.** (2001). Índice de eficiencia alimentaria (FER) en gorgojos de arroz (*Sitophilus oryzae*): herramienta para evaluar la utilización metabólica del alimento. **Memorias del Instituto de Biología Experimental 3:** 49-52.
4. **Carmona, A. y Gómez-Sotillo, A.** (1997). Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. **Anales Venezolanos de Nutrición 10(1):** 20-26.
5. **Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A. y Casotto, M.** (2001). Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. **Memorias del Instituto de Biología Experimental 3:** 53-56.
6. **Gingras, R., Warren, M., Nagengast, A., Diangelo, J.** (2014). The control of lipid metabolism by mRNA splicing in *Drosophila*. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 443(2):** 672-676.
7. **León, I.** (2015). Digestibilidad in vitro y aprovechamiento por el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) de harinas de banano. Trabajo especial de grado Universidad Central de Venezuela.
8. **López, Y.** (1999). Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
9. **Lovera, M., Pérez, E., Tapia, M.S. y Laurentin, A.** (2014). Digestibilidad de películas comestibles: película elaborada con almidón aislado de mapuey cultivado en el estado Amazonas. **Memorias del Instituto de Biología Experimental 7:** 97-100.
10. **Lugo, D. A., Aguilar V. H., Casotto, M., Laurentin, A. y Gómez, A.** (2013). Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). **ALAN 63(3):** 232-239.
11. **Perez-Navarrete, C., Betancur-Ancona, D., Casotto, M., Carmona, A. y Tovar, J.** (2007) Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima. **ALAN 57(3):** 278-286.
12. **Soulages, J., Wu, Z., Firdaus, S., Mahalingam, R., y Arrese, E.** (2015). Monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases and the synthesis of neutral glycerides in *Manduca sexta*. **Insect Biochem Mol Biol. 62:** 194-210.
13. **Strachecka, A., Krauze, M., Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Merska, M., Chobotow, J., Bajda, M. y Grzywnowicz, K.** (2014). Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). **Biochemistry 79(11):** 1192-1201.
14. **Tennessen J., Barry W., Cox, J. y Thummel, C.** (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. **Drosophila developmental biology methods. 68(1):** 105-115.
15. **Velásquez, Y., Rodríguez N., Mujica, X., Santiago, G., Vivas, S., Labrador, C., González, E y Lorete, A.** (2006). Evaluación de un método enzimático para la determinación de triglicéridos. **Revista de la Facultad de Farmacia 48(2):** 3-7.
16. **Zamora, N.** (2005). Sobrevivencia de *Sitophilus oryzae* (L.) en harina cruda y extruida de granos de *Canavalia ensiformis*. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel 36(1):** 21-27.

Biomatrices naturales en la bioingeniería de tejidos

ELIZABETH MERENTES¹, MARIA VALENTINA CAMEJO², ELIANA NAVARRO¹ Y
MARÍA LORENA MÁRQUEZ¹

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental (IBE). Universidad Central de Venezuela. ²Facultad de Odontología. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Correo-e: emerentes@gmail.com

Para la bioingeniería de tejidos un elemento clave es el tipo de sustrato que se utilice, un andamio donde las células puedan adherirse, promoviendo así la migración, la proliferación y diferenciación celular que van a permitir la formación del nuevo tejido *in vitro*. El uso de biomatrices en los cultivos celulares permite entonces ubicar las células espacialmente y así poder regular sus funciones, lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo en particular. En esta revisión vamos exponer algunos resultados sobre la utilización de biomatrices naturales, tales como el colágeno tipo I, donde se sembraron células mesenquimales provenientes de la pulpa dental humana para analizar su potencialidad de diferenciación odontogénica-osteogénica *in vitro*. Asimismo, se usó el estroma de la membrana amniótica humana (MAH) que particularmente funciona como un biosustrato tridimensional que simula un microambiente y un soporte estructural similar al que se encuentra en condiciones nativas, permitiendo así examinar las características morfológicas, propiedades de adhesión, interacción intercelular y expresión de algunos marcadores particulares, bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación.

Introducción

La ingeniería de tejidos es una ciencia que se encarga de desarrollar sustitutos biológicos con el fin de restaurar, mantener y mejorar la función de tejidos perdidos o lesionados por traumas o enfermedades. Para la reconstrucción de estos tejidos *in vitro*, generalmente se usan células obtenidas del mismo paciente y se cultivan en una matriz tridimensional para luego ser implantados *in vivo*; luego de cierto tiempo estas células van a contribuir a la regeneración el tejido dañado.

Estos sustratos tridimensionales brindan a las células una plataforma donde éstas puedan adherirse promoviendo así su proliferación y diferenciación en la formación del nuevo tejido. Por lo tanto, el diseño y selección de los biomateriales usados como soporte es un paso importante en la bioingeniería tisular (6). La biomatriz ideal debe ser biocompatible, permeable, con propiedades de elasticidad, flexibilidad y de plasticidad para el reemplazo del tejido, que dependen básicamente de la composición de la matriz extracelular (10). Entre los materiales que más se han utilizado para la elaboración de biomatrices naturales están los colágenos y sus derivados.

En relación a la ingeniería del tejido pulpar, la matriz de colágeno tipo I ha sido un soporte atractivo, considerando que el colágeno es uno de

los componentes de la pulpa dentaria. En este sentido, se van a exponer algunos resultados de células mesenquimales provenientes de la pulpa dentaria sembradas sobre este tipo de matriz y en presencia de medios inductores para analizar su potencialidad de diferenciación odontogénica-osteogénica *in vitro*. La selección de este soporte o matriz es de vital importancia para inducir y conferir la formación óptima de una nueva matriz de dentina.

Por otra parte, uno de los más antiguos biomateriales empleados como sustrato es la membrana amniótica humana (MAH). Recientemente se está utilizando como matriz tridimensional donde pueden crecer las células y diferenciarse para ser usada en la medicina regenerativa, específicamente se ha utilizado en el tratamiento de tejidos dañados en pacientes con osteoartritis, vitíligo (9); además también se está utilizando como una nueva fuente de obtención de células madre epiteliales y mesenquimales (7). La membrana amniótica puede ser utilizada con su estructura íntegra, ya sea con el epitelio amniótico (MA íntacta) o sin éste (MA desnuda) (8).

Para usarlo como sustrato nativo es importante mantener las características morfológicas y fisiológicas cuando se criopreserva el estroma a bajas temperaturas (2). En este contexto, nos planteamos cultivar células epiteliales de la membrana amniótica humana sobre el estroma de la

MAH desnuda con el objetivo de evaluar su potencial uso como biosustrato tridimensional bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación.

Materiales y métodos

Las membranas amnióticas son obtenidas de placentas humanas provenientes de partos por cesáreas, bajo consentimiento informado de las madres gestantes y con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Las placentas se transportan a 4°C al laboratorio y se separa manualmente la membrana amniótica del corión de la placenta y seguidamente se lava con Solución Búfer de Fosfato libre de calcio y magnesio (PBS). Las secciones de tejido son incubadas con una mezcla de la enzima Dispasa II 1,2 U/mL a 4°C durante 18 horas para posteriormente llevar a cabo la desnudación de la membrana amniótica. Seguidamente, los trozos de tejido se transfieren a una placa de Petri y con la ayuda de un rastrillo se obtienen las células epiteliales y se siembran con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-F12 suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB), 1% de Aminoácidos no esenciales, 1% de Antibióticos – Antimicótico, 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), 2mM de L-Glutamina y 1mM de Piruvato de Sodio, en placas cubiertas previamente con una película de gelatina.

Criopreservación del estroma de la membrana amniótica

Los trozos de tejidos desnudos y sin desnudar de la MAH fueron criopreservados con glicerol o por vitrificación. Las secciones de tejido fueron mantenidas en medio de congelación DMEM: Glicerol a 4°C, en una proporción y guardadas en el congelador a -70°C. Para la vitrificación de la membrana amniótica, las secciones de tejido fueron incubadas en una solución de equilibrio con 20% Etilenglicol por 10 minutos. Posteriormente, se incubó en la solución de vitrificación a 4°C, que contenía 40% Etilenglicol, 18% Linfoprep, 0,3M Sacarosa y 20% SFB, y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -180°C. Con el fin de evaluar el efecto de la criopreservación sobre la membrana amniótica desnuda y sin desnudar, las muestras fueron descongeladas a 37°C, se rehidrataron en solución PBS y se fijaron con Formalina al 10% para luego realizar la evaluación histológica correspondiente con Hematoxilina-Eosina.

Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica (CEMAH)

La población homogénea de células epiteliales con morfología poligonal obtenidas del cultivo primario y de subcultivos, fueron utilizadas para la siembra sobre el estroma de la membrana. La suspensión celular fue sembrada sobre el biosustrato tridimensional para cada una de las condiciones a ensayar, dejando transcurrir 2 días para que las células se adhirieran al sustrato biológico. Posteriormente, se incubó a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 10 y 14 días. Transcurrido el tiempo, los cultivos tridimensionales se fijaron con Formalina al 10% y finalmente se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes.

Establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de células madre mesenquimales de la pulpa dental (CMPD)

Se seleccionaron pacientes jóvenes entre 15 y 24 años que acudieron a la clínica de Especialidades Odontológicas CEOMED y al Servicio de Cirugía Bucal del Postgrado de Cirugía de la Facultad de Odontología, a quienes se les extrajeron quirúrgicamente los terceros molares bajo consentimiento informado. Posteriormente, los órganos dentarios fueron llevados al Laboratorio de Cultivo para obtener la pulpa dentaria según la metodología de Camejo y col. (3). Brevemente, los molares se limpian y desinfectan, para luego exponer y extraer el tejido pulpar. Para aislar las células, la pulpa se colocó en una mezcla de solución enzimática de 4mg/mL de colagenasa tipo I y 2mg/ml de Dispasa. La suspensión celular obtenida se sembró con DMEM-F12 suplementado con 15 % SFB, 100 µM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina, 1% de Antibióticos – Antimicótico. Los cultivos primarios fueron incubados a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, hasta alcanzar la semiconfluencia, luego se procedió a realizar los subcultivos con el fin de amplificar la población de células madre mesenquimales. Las células aisladas de la pulpa dentaria del tercer subcultivo fueron sembradas sobre o inmersas en una matriz tridimensional de colágeno tipo I y en presencia de medio nutritivo inductor hacia los linajes odontogénico-osteogénico que contiene 10mM de betaglicerofosfato, 10⁻⁸ mM de dexametasona y 50 µg/mL de ácido ascórbico. La diferenciación de las células mesenquimales de la pulpa dentaria se evaluó por medio de la morfología celular, la presencia de nódulos calcificados detectados con la coloración histoquímica de Rojo Alizarina y la expresión inmunohistoquímica de la Sialoproteína Dentaria (DSP).

Resultados y discusión

En este trabajo se ensayó el cultivo de células epiteliales amnióticas sobre el estroma amniótico avascular fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado usando como estrategia de cultivo, el cultivo tridimensional. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo permite examinar las características morfológicas, la proliferación e interacción intercelular de las células epiteliales amnióticas sobre el biosustrato.

Para usar el estroma de la MAH como andamio se usó la Dispa II, que permite remover el epitelio de la membrana amniótica humana y mantener una membrana basal intacta. Por otra parte, las células epiteliales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana se mantuvieron *in vitro* con la morfología poligonal y uniones intercelulares equivalentes al tejido nativo.

Al examinar histológicamente las características morfológicas de las muestras del estroma de la membrana amniótica desnuda y posteriormente criopreservadas tanto por glicerol como por vitrificación (resultados no mostrados), se aprecia que la membrana basal y la matriz extracelular del estroma mantienen sus características intrínsecas después del tratamiento sugiriendo que la criopreservación con glicerol y por vitrificación permite conservar el estroma de la membrana amniótica para ser usado como biosustrato tridimensional en los cultivos celulares.

Evaluación morfológica de las células CEMAH cultivadas sobre el estroma de MAH

Los cambios morfológicos y funcionales de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana fueron evidenciados mediante observaciones periódicas al microscopio de contraste de fase, evaluaciones histológicas y por la determinación antigénica de Pan-CK y E-cadherina.

Los resultados de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas sobre el estroma de la membrana amniótica humana variaron dependiendo del estroma si era fresco, criopreservado con glicerol o vitrificado, por lo que se describirán los resultados más resaltantes.

Con respecto a los cultivos primarios de células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco sin criopreservación, se observa una alta adhesión de las células epiteliales sobre dicha capa estromal y un crecimiento en monocapa de las células epiteliales amnióticas las cuales se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del estroma fresco y además mostraron una excelente integración con el tejido, manteniendo la morfología y estructura típica de

células epiteliales donde inclusive se aprecia una estrecha unión intercelular, semejante a un epitelio simple (Figura 1A). En cuanto a los

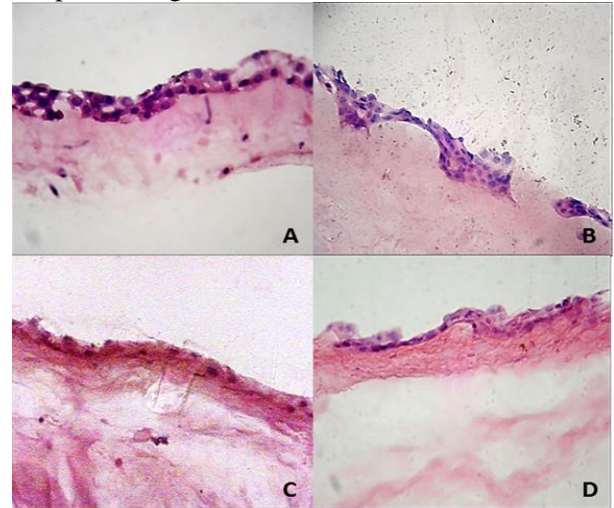


Fig. 1. Evaluación morfológica de las CEMAH cultivadas sobre Estroma-MAH. **A-** EMAH fresco. Sección histológica, 17 días de cultivo. 250X. **B.-** EMAH vitrificado. 14 días de cultivo. 250X. **C.-** EMAH criopreservado con glicerol. 17 días de cultivo. 200X. **D.-** 1^{er} Subcultivo de CEMAH sobre EMAH vitrificado. 7 días de cultivo. 250X. Secciones histológicas Coloración Hematoxilina-Eosina.

cultivos de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada se aprecia un comportamiento similar a lo observado en los cultivos sobre la membrana amniótica en fresco; es decir, un gran número de células epiteliales adheridas al biosustrato tridimensional vitrificado (Figura 1B), las cuales proliferaron rápidamente a medida que transcurrieron los días de cultivo hasta formar una monocapa (Figura 1B). Sin embargo, al observar características histológicas de estas células epiteliales sobre el estroma vitrificado, se pudo evidenciar un tapizado simple e interrumpido de células en algunas zonas donde no hubo una buena adhesión, mientras que cuando se usan células epiteliales subcultivadas forman una capa continua y simple de células, indicando una buena integración celular con el estroma vitrificado (Figura 1D).

En contraste a lo observado anteriormente las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservada con glicerol, se pudo observar poca adhesión de las células epiteliales al sustrato amniótico criopreservado y una baja proliferación celular a medida que transcurrieron los días de cultivo (Figura 1C).

Diferenciación de células CMPD

En relación a la diferenciación de las células mesenquimales de la pulpa dentaria en células semejantes a odontoblastos, en cultivos tridimensionales de la matriz de colágeno se pudo observar que las células sobre dicha matriz cambian su morfología fusiforme típica de las células

indiferenciadas a una forma poligonal (Figura 2A), en algunas células se aprecia polarización con prolongaciones citoplasmáticas semejante a odontoblastos; estos mostraron una expresión de moderada a intensa con DSP al ser comparada con el control, además la matriz se observa fibrosa y densa (Figura 2C y D).

En las células mesenquimales de la pulpa dentaria cultivadas inmersas en la matriz de colágeno, se observaron múltiples nódulos calcificados y zonas difusas de mineralización de fosfato de calcio cuando se colorearon con el rojo de Alizarina (Figura 2B) en comparación con el control, donde muy pocas células estuvieron rodeadas de matriz mineralizada. Se ha señalado que el potencial odontogénico de las células de la pulpa dentaria se describe a través de la formación de depósitos calcificados, en los sistemas de cultivo (4). La expresión de la DSP determinada por inmunohistoquímica incrementa a medida que transcurre el tiempo; esto nos puede indicar que dentro de la población heterogénea existen células progenitoras del linaje odontoblástico que bajo el microambiente proporcionado *in vitro* son capaces de sintetizar y secretar esta proteína como se corroboró con la expresión bioquímica de la DSP en los cultivos inducidos (resultados no mostrados).

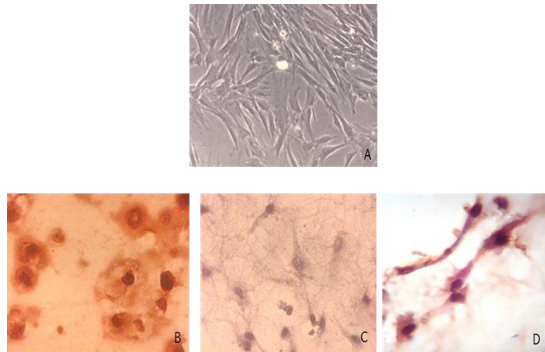


Figura 2. Cultivo de células mesenquimales de la pulpa dental humana.

A. Población de células con morfología fusiforme en sistema 2D. 3er pasaje 100X. Contraste de fases. 200X B. Células inmersas en la matriz de colágeno tipo I donde se pueden apreciar los depósitos de fosfato de calcio que se colorea con el Rojo Alizarina. 21 días de cultivo en presencia de medio osteogénico.400X. C. Células creciendo sobre la matriz de colágeno. Coloración Hematoxilina-Eosina. 400X D. Algunas células marcadas positivamente cuando se realizó el ensayo de inmunohistoquímica en contra de la proteína DSP.400X.

En base a los resultados obtenidos se puede indicar que las células mesenquimales de la pulpa dentaria se indujeron a la diferenciación odontogénica – osteogénica bajo las condiciones suministradas en este estudio, coincidiendo con lo planteado por otros autores (1,5).

Agradecimientos

Parte de este trabajo fue financiado por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) N° 2012000813.

Referencias

- Alliot-Licht, B., Bluteau, G., Magne, D., Lopez, S., Lieubeau, B., Daculsi, G. y Guicheux, J. (2005). Dexametasona stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res.* **321**: 391-400.
- Avila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. y col. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev Colombiana Obstetricia y Ginecología* **57**: 291-300.
- Camejo, M.V., Merentes, E., Márquez, M.L., González, O. (2013). Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana. *Acta Odontológica Venezolana* **51**(3)/2013.
- Gronthos, S., Mnakani, M., Brahim, J., Gehron, P. y Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Nat Acad. Sci.* **97**: 13625-13360.
- Lopez-Casaux, S., Bluteau, G., Magne, D., Lieubeau, B., Guicheux, J. y Alliot-Licht, B. (2006). Culture medium modulates behavior of human dental pulp-derived cells: technical note. *Eur Cell Mater* **11**: 35-42.
- Mano, J., Silva, G., Azevedo, S., Malafaya, P., Sousa, R., Silva, S., Boezel, L. y col. (2007). Natural origin biodegradable in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc. Interfase* **4**: 999-1030.
- Merentes, E., Márquez, M.L., Navarro, E., López, R. y González-Terán E. (2014). Fuentes de células para la bioingeniería de tejidos. *MIBE* **7**: 37-40.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J. y Seifalian, A. (2008). Properties of the Amniotic Membrane for potential use in Tissue Engineering. *Eur. Cells Mater.* **15**: 88-99.
- Redondo, P., Giménez, A., Marques, L., García-Guzmán, M., Andreu, E. y Prosper, F. (2011). Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatology Res. and Practice, Article ID 532139*, doi:10.1155/2011/532139.
- Yang, L., Shirakata, Y. Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa, S., Sayama, K., y col. (2006). New Skin equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res.* **326**: 69-77.

Nanopartículas: composición, carga y efecto antitumoral sobre células de cáncer de mama humano MCF-7 y SKBr3

SHELBY ORTIZ^{1,2}, MARCOS SABINO¹, FELIPE SOJO^{2,3} Y FRANCISCO ARVELO^{2,3}

¹Departamento de Química, Grupo B5IDA, Universidad Simón Bolívar, AP 8900 Caracas, Venezuela

²Centro de Biociencias, Área Salud Fundación Instituto de Estudios Avanzado-IDEA

³Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas – Venezuela, Apartado 47114.
Correo-e: franarvelo@yahoo.com

A algunos fármacos como los agentes anticancerosos, se le atribuyen efectos secundarios negativos por su acción fuera del blanco terapéutico. Un objetivo global, en la investigación biomédica y farmacéutica, es la liberación controlada del fármaco en el lugar de destino biológico y en cantidades óptimas ocasionando el menor efecto secundario. El objetivo de esta investigación fue estandarizar un protocolo que permitió obtener micro/nanopartículas para encapsular un agente anticancerígeno (5-Fluoracilo) utilizando alginato de sodio como material base para la encapsulación. Para ello, se combinaron los métodos de emulsificación y gelación iónica. Se hicieron ensayos bajo condiciones simuladas de medio gastro-intestinal para verificar el proceso de liberación de los fármacos y su potencial aplicación. Ensayos de citotoxicidad fueron realizados usando células MCF7 y SKBr3 (cáncer de mama humano) mediante el método del MTT en presencia de nanopartículas cargadas con el fármaco anticancerígeno y sin carga. Los ensayos de citotoxicidad sobre las células SKBr3 evidenciaron un mayor efecto cuando se administra el 5-fluoracilo en nanopartículas de alginato que cuando se aplica el fármaco libre. Estos interesantes y novedosos resultados demuestran la alta potencialidad de estas nanopartículas en aplicaciones farmacológicas, y abren una ventana para estudiar estos sistemas en otras líneas tumorales y con compuestos naturales y sintéticos previamente evaluados en el laboratorio.

Introducción

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación no controlada de las células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores o agentes de riesgo comunes al que estamos expuestos en la cotidianidad por las actividades realizadas por el hombre como el humo de tabaco y otros (1). Un porcentaje importante de esta enfermedad puede curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si es detectada en fase temprana (6). Asimismo, la población ha puesto en práctica su conocimiento popular tomando como fuente lo que le proporciona la naturaleza a través de las plantas, hojas, tallos, flores y frutos como un recurso alternativo a la medicina convencional. Debido a esto, los metabolitos extraídos de distintas partes de la planta y frutos han sido un recurso para tal fin, como los seco-ent kauranos obtenidos de hojas y flores del *Croton caracasana* que presentan actividad antiinflamatoria y antitumoral sobre diferentes líneas de cáncer humano (11,12), así otros obtenidos de la especie *Croton* presentaron actividad antitumoral para las células de cáncer de próstata humano (PC3) y de útero (HeLa) diferentemente significativo con respecto a las células control (13), además de los metabolitos obtenidos del *Croton*

micans (compuesto dimérico) que presentaron actividad citotóxica sobre la línea tumoral PC3 y que en combinación entre ellos mismo y con drogas comerciales resultaron ser más activo que actuando por sí solo (13). Otros estudios llevados a cabo en el laboratorio demostraron que los extractos obtenidos de la pulpa y semilla de la guanábana y del ají presentaron actividad citotóxica sobre la línea tumoral PC3 y HeLa, respectivamente y en células de cáncer de mama (MCF-7) mostrando una alta selectividad con respecto a las células control (10,16). Por otra parte; el diseño de compuestos sintéticos mediante la reacción de cicloadición Diels-Alder a partir del eugenol e isoeugenol y obtenidas del clavo y la canela por el laboratorio del Dr. Vladimir Kouznetsov, han permitido al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE la determinación de la actividad biológica de más de 98 compuestos agrupados en varias series; los cuales han presentado actividad biológica en las diferentes línea tumorales de cáncer humano y otros organismos (8) entre los que se destacan el grupo de los 2-aril-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-tetrahidroquino-linas y la dihidrospiro (indolina-3,2'-quinolina)-2-ona que presentaron una actividad citotóxica sobre la línea tumoral de MCF-7 y SKBr3 (cáncer de mama); siendo altamente selectivo para la MCF-7 con respecto a las células control (5), además del estudio sinérgico de dos de

la serie *trans*-2,4-diaril-r-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas que evaluadas en combinación con drogas antineoplásicas usadas actualmente en el tratamiento del cáncer de mama gemcitabina y paclitaxel presentaron un incremento en su efecto citotóxico sobre la línea tumoral de forma individual que actuando individualmente (9). Frente a todas estas alternativas se presenta la posibilidad de diseñar formas que permitan mejorar la disponibilidad y eficiencia de los fármacos; lo cual ha provocado un incremento en la atracción dentro de la comunidad científica en los últimos años. Sin embargo, diversas propiedades de las sustancias farmacológicas, las limitaciones en la elección de los excipientes y, principalmente, las barreras fisiológicas presentan gran desafío para el diseño y el desarrollo del sistema de administración de fármacos por vía oral (4). Es por ello que con todo este avance actual relacionado con la nanotecnología se presente esta como una herramienta útil en un proceso que está revolucionando muchas áreas de la ciencia, entre ellas las farmacológicas y biomédicas, tales como la quimioterapia, la transferencia de genes, el diagnóstico y fototerapia que han sido objeto de extensas investigaciones cada vez mayor en los últimos años. Particularmente; el uso de las nanopartículas en el transporte y entrega de drogas anticancerígenas ha atraído interés en la esperanza de mejorar la eficacia de la quimioterapia y reducir los efectos secundarios. Las posibles ventajas de los sistemas de administración de fármacos de tamaño nanométrico que incluye la conveniencia en la administración, la capacidad de focalización pasiva en los tejidos tumorales para mejorar la retención y permeabilidad (2,14).

Nanopartículas. Están constituidas por alginato de sodio, y presentan una relación estructural de 70/30 de ácido malurónico y ácido galurónico, sulfato de zinc (ZnSO₄), polivinilalcohol (PVA, 140000 g/mol), polivinilpirrolidona (PVP 10000 g/mol) y Tween 80 como surfactante no-iónico en un proceso de varios pasos y fueron cargadas con el fármaco 5-fluoroaracilo (5-FU) en concentraciones de 0,1 y 0,3% m/v, permanente en agitación a temperatura ambiente y luego dejado en reposo. El precipitado se colecta por centrifugación y se congeló a -4°C por 24 horas y finalmente liofilizado. La eficiencia de encapsulamiento fue determinada por la relación de la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante empleando la técnica de espectrofotometría ultravioleta (UV) y la cantidad total agregada a la muestra dividida entre la cantidad total del fármaco agregado.

Citotoxicidad. La citotoxicidad de las nanopartículas cargadas con el fármaco 5-FU, así como del fármaco libre fueron evaluadas “*in vitro*” sobre las líneas tumorales de cáncer de mama humano MCF-7 y SKBr3 en concentraciones crecientes de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 15; 25; 50 y 100 µg/mL mediante el uso del método del MTT en placas de 96 pozos y previamente sembrado con 5x10³ células e incubadas por 72 horas a 5% CO₂ y 95% de humedad a 37°C.

Resultados y discusión

Cuando se usa PVA como agente tensoactivo en lugar de PVP ocurre un aumento de casi 10 puntos porcentuales en la eficiencia de encapsulación (Tabla 1), lo que nos indica que el PVA estabiliza mejor las gotas en la emulsión y por tanto favorece la formación de un sistema más estable que influye de forma directa para que el fármaco permanezca dentro de la gota durante la formación de las partículas (3,6).

Tabla 1. Porcentaje de fármaco encapsulado para los diferentes parámetros ensayados.

	PVA		PVP
% de fármaco	0,1	0,3	0,1
% encapsulado	90,5 ± 0,1	75,3 ± 0,1	79,2 ± 0,1

Por otra parte, se controló la liberación del fármaco con respecto a la variación del agente tensoactivo exponiendo las partículas a un medio gástrico simulado sin enzimas (pH 1,5) por 120 min, para luego estas mismas partículas exponerlas a un medio intestinal simulado sin enzimas (pH 6,5) por 120 min adicionales. Los resultados presentados muestran que las partículas preparadas con PVA y PVP en el medio gástrico simulado presentan una curva de liberación muy similar, liberándose alrededor de un 45% del fármaco encapsulado para ambos casos (Fig. 1). En el medio intestinal ocurre un comportamiento diferente con las partículas preparadas con PVP, se alcanza la liberación del 75%, mientras que con las preparadas con PVA ocurre un aumento sostenido de la concentración del fármaco liberado en el tiempo, lográndose finalmente la liberación de alrededor del 98% después de 240 min de exposición. Las imágenes de microscopía de barrido en la Figura 2, muestran el cambio de su morfología por efecto del experimento (pH, tiempo y liberación del fármaco). Se puede apreciar que después de ser expuestas a pH simulado de medio intestinal; estas no presenta forma esférica.

Sin embargo, la liberación del fármaco a partir de las nanopartículas preparadas en función de las dos concentraciones 0,1% y 0,3% al medio gástrico

simulado (pH 1,5), se observa una liberación de 37,3% y 48,5%; respectivamente (**Fig. 2a**), mientras que al someter las mismas nanopartículas a las condiciones de medio simulado intestinal (pH 6,5), se alcanza una liberación de 44,5% y 50,0% del fármaco restante (**Fig. 2b**). En este último caso, ocurre la desprotonación del ácido algínico causando la desintegración del sistema y logrando de esta forma liberar en casi su totalidad el fármaco encapsulado (7).

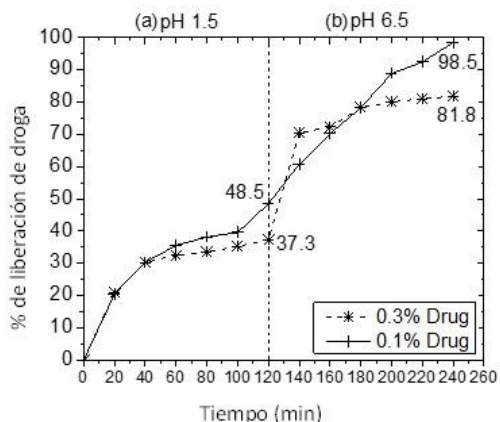


Figura 1. Liberación de 5-Fluorouracilo en las nanopartículas a diferentes pH (a) 1.5 y (b) 6.5 empleando PVA y 0.1% del fármaco.

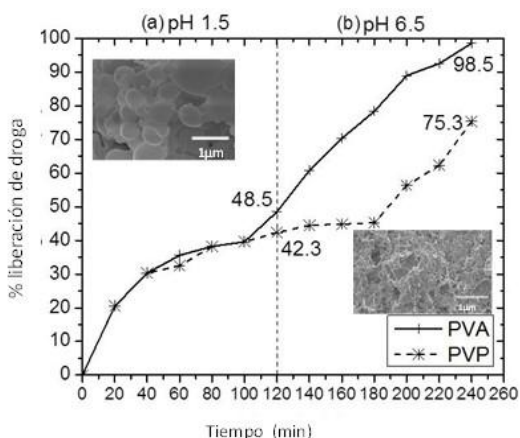


Figura 2. Liberación de 5-Fluorouracilo de las nanopartículas de alginato usando PVA y dos concentraciones del fármaco.

Por otra parte; la evaluación citotóxica del fármaco 5-FU y de las nanopartículas con y sin cargas sobre las líneas tumorales mostraron ser un mejor vehículo del fármaco para las células SKBr3 con una disminución de su IC_{50} con respecto al fármaco libre, mientras que para las MCF-7 no se observó una ventaja del efecto citotóxico de las nanos cargadas con 5-FU con respecto al 5-FU individual. Tanto el alginato como el Tween 80 fueron evaluados individualmente sobre las células no mostrando ninguna actividad citotóxica, lo que indica que la actividad observada es producto de la

descarga del fármaco directa y constantemente sobre las células. Esto nos indica que las nanopartículas cargadas son 77 veces más efectivas que la droga libre.

Tabla 2. Valores de IC_{50} de las nanopartículas y fármaco evaluados en las líneas tumorales de cáncer de mama.

Línea tumoral	N(-) ($\mu\text{g/mL}$)	5-FU ($\mu\text{g/mL}$)	N(+) ($\mu\text{g/mL}$)
SKBr3	SA	$2,97 \pm 1,07$	$0,038 \pm 0,03$
MCF-7	SA	$0,43 \pm 0,04$	$2,36 \pm 1,25$

N(-): nanopartículas sin carga SA: sin actividad

N(+): nanopartículas con carga

En el caso de la actividad para la línea celular MCF-7 se observa un mayor efecto citotóxico de la droga libre con respecto a la droga encapsulada, siendo la acción del fármaco libre en esta línea tumoral aproximadamente 5 veces más efectivo que el sistema de nanopartículas que contiene el fármaco. Wu, 2014 reportan la actividad de inhibición celular *in vitro* de nanopartículas de alginato cargadas con doxorubicina y otras cargadas con paclitaxel. Estos autores realizaron ensayos de MTT empleando como línea celular MCF-7. Sus resultados muestran que las nanopartículas cargadas con paclitaxel obtuvieron una menor actividad citotóxica que la droga libre, resultado muy parecido al que se obtuvo en este estudio con la línea celular MCF-7. Las nanopartículas cargadas con doxorubicina presentaron un mayor efecto inhibitorio, resultado que los autores atribuyen a los diferentes mecanismos de captación celular de doxorubicina libre y doxorubicina en las nanopartículas cargadas, tal vez a que la doxorubicina libre es transportada a las células a través de un mecanismo de difusión pasiva, mientras que las partículas de tamaño nanométrico cargadas con el fármaco entran posiblemente en las células mediante endocitosis. Después de la captación celular, el mecanismo de liberación de drogas en el entorno intracelular implica difusión del fármaco, la degradación del polímero debido a los ambientes ácidos (pH 4,5-6,0) en los lisosomas. Este mecanismo propuesto es el que podría estar funcionando en este trabajo con la línea celular SKBr3 donde las nanopartículas cargadas con 5-FU mostraron ser más efectivas que la droga libre (15).

Conclusiones

El uso del agente tensoactivo es un parámetro de gran importancia para el éxito de la metodología empleada. El PVA en este caso estabiliza el sistema de gelación lográndose la formación de partículas más pequeñas, al tiempo que se alcanza una mejor

eficiencia de encapsulación. Por otra parte, el aumento de la concentración del fármaco utilizada en la preparación de las nanopartículas de alginato cuando se usó PVA, demuestra un aumento en la eficiencia de la encapsulación obtenida, lo cual se asoció al peso molecular de este surfactante. Las partículas encapsuladas demostraron tener un mayor efecto citotóxico según los resultados del ensayo de MTT sobre células SKBr3, siendo estas 77 veces más efectiva que el fármaco libre lo que se traduce como una mejora considerable en la actividad del fármaco.

Este tipo de trabajo con nanopartículas nos permitiría a futuro en nuestro laboratorio y con colaboración interdisciplinaria evaluar y mejorar la eficiencia de productos naturales y sintéticos previamente ensayados para en algunos de los casos mejorar su eficiencia.

Referencias

1. Arvelo, F., Sojo, F. y Cotte, C. (2016). Contaminación, Disruptores Endocrinos y Cáncer. *Invest. Clin.* **57**(1): Marzo 2016 (*en prensa*).
2. Gao, Z., Zhang, L. y Sun, Y. (2012). Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *J. Control Release* **162**: 45-55.
3. Jeanneret, A., Schneider, M., Troxler, S., Bugnon, K. O., Awad, G., Geneidi, S. y Mortada, N. (2007). Preparation and Characterization of Acyclovir Nanoparticles by Double Emulsion Technique. *Egyptian Journal of Biomedical Sciences* **23**(1): 218-236.
4. Kaushik, T., Gangwal, R., Abhay, T. y Sanyog, J. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *J. Control Release* **170**: 15-40.
5. Kouznetsov, V.V., Merchan Arenas, D.R., Arvelo, F., Bello Forero, J.S., Sojo, F. y Muñoz, A. (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline Derivatives Obtained Through Imino Diels-Alder Reactions as Potential Antitumoral Agents. *Lett. Drug. Desig. Discov.* **7**: 632-639.
6. Lee, K. y Mooney, Y. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer science.* **37**(1): 106.
7. Oya, S. y Nuran, A. (2007). Release characteristics of diclofenac sodium from poly(vinyl alcohol)/sodium alginate and poly(vinyl alcohol)-grafted- poly(acrylamide)/sodium alginate blend beads. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**: 204-214.
8. Muñoz, A., Peticara, M., Sojo, F., Merchan-Arenas, D.R., Bello-Forero, J.S., Suárez, A.I., Benaim, G., Galindo-Castro, I., Compagnone, R., Kouznetsov, V.V., y Arvelo, F. (2012). Tetrahydroquinolinas: Compuestos de origen sintéticos con propiedades antitumorales sobre líneas de cáncer humano. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **6**: 77-80.
9. Muñoz, A., Sojo, F., Merchan-Arenas, D.R., Kouznetsov, V.V. y Arvelo, F. (2011). Cytotoxic effects of newtrans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chem-Biol. Interac.* **189**: 215-221.
10. Raybaudi-Massilia, R., Suárez, A.I., Arvelo, F., Sojo, F., Mosqueda-Melgar, J., Zambrano, A. y Calderón-Gabaldón, M.I. (2015). An Analysis In-vitro of the Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Annona muricata* L. Seed and Pulp. *British Journal of Applied Science & Technology* **5**(4): 333-341.
11. Suárez, A.I., Chávez, K., Delle Monache, F., Vásquez, L., Orsini, G. y Compagnone, R.S. (2008). New 3,4-seco-entkaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Nat. Product Com.* **3**: 319-322.
12. Suárez, A.I., Chávez, K., Mateu, E., Compagnone, R.S., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M. y De Sanctis, J.B. (2009). Cytotoxic Activity of seco-ent kaurenes from *Croton Caracasana* on Human Cancer Cells Line. *Nat. Product Com.* **4** (11): 1547-1550
13. Vivas, J., Sojo, F., Chávez, K., Suárez, A.I., y Arvelo, F. (2013). Cytotoxic effects of the monomer and dimer of 3,4-seco-ent kaurane from *Croton micans* and their interaction with antitumoral drugs on cellular line human prostate cancer. *Lett. Drug Design Discov.* **10**: 683- 688.
14. Wang, A., Langer, R., Farokhzad, O. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.* **63**: 185-198.
15. Wu, J., Wang, C., Zhuo, R. y Cheng, S. (2014). Multi-drug delivery system based on alginate/calcium carbonate hybrid nanoparticles for combination chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **123**: 498-505.
16. Zambrano, A., Calderón, M.I., Sojo, F., Suárez, A.I., Raybaudi-Massilia, R., Kouznetsov, V. y Arvelo, F. (2014). Fuentes naturales prometedoras de metabolitos con actividad antitumoral en distintas líneas celulares de cáncer humano. *Mem. Inst. Biol. Exp.* **7**: 49-52.

Estudio de las corrientes de K^+ en células de cáncer de mama MCF-7 en presencia de compuestos naturales y sintéticos con actividad citotóxica

CHRISTIAN CALDERÓN¹, FELIPE SOJO^{2,3}, FRANCISCO ARVELO^{2,3}, FERNANDO GONZÁLEZ¹ Y ANTONIO GUTIERREZ¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biofísica del Centro de Biología Celular

²Centro de Biociencias, Fundación Instituto de Estudios Avanzados-IDEA

³Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.

Correo-e: christian.calderon@ciens.ucv.ve

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte oncológica en mujeres venezolanas. Este tipo de patología consiste en un conjunto de fallas acumuladas en la regulación del ciclo celular producida por inestabilidad genética. Esto posiblemente explica la expresión anormal de canales de K^+ , además de los típicos en cantidades reguladas, los cuales son fundamentales en la determinación del potencial transmembrana (Vm). La actividad de este tipo de canales entre otros, es determinante para el avance en el ciclo celular; por lo que los inhibidores de los mismos pueden limitar la proliferación. Aunque algunos compuestos evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, de origen natural o sintético, exhiben propiedades antitumoral no se conoce el mecanismo de acción. En este trabajo se revisa la actividad, realizada y en proyección, para evaluar el efecto de sustancias citotóxicas sobre las corrientes iónicas en líneas celulares de cáncer de mama. Además se hace mención al desarrollo de herramientas teóricas y computacionales como apoyo en la realización de nuevas hipótesis y la validación de modelos de interacción entre las corrientes iónicas, el Vm, el volumen celular y el avance en el ciclo celular.

Introducción

El transporte de iones en la membrana permite a las células llevar a cabo varias funciones fisiológicas. Una de las consideradas más importante, y bien estudiada, es el mantenimiento de un potencial transmembrana (Vm) que a su vez energiza procesos de transporte, transmisión y transducción de señales, procesos normalmente estudiados en células excitables (7), además del control del volumen celular (15). No obstante, recientemente se ha reunido importante evidencia que involucra a los canales iónicos (CIs) como parte del mecanismo de control de la proliferación, nivel de diferenciación (2,24), migración (21) y como mediadores de señales apoptóticas (16); procesos normales en células no excitables. Más aun, hay reportes que versan sobre la importancia de conductancias despolarizantes para el desarrollo del cáncer (11), además de representar un factor importante en la supervivencia de tumores, por ejemplo, mediante la regulación de la vascularización tumoral (5). Las células cancerosas presentan, de manera aberrada, canales que normalmente se expresan en células excitables; lo que representa un elemento de discriminación con las células no cancerosas (2,15). Se entiende entonces, que los CIs pueden ser blancos terapéuticos antitumorales, con la ventaja adicional

de ser fácilmente accesibles desde la superficie extracelular. Así se ha intentado inhibir la actividad de CIs involucrados en procesos los vitales cancerosos, mencionados anteriormente (1). Históricamente se ha extendido de manera amplia el conocimiento sobre el uso de inhibidores específicos de distintos CIs en el estudio de las células excitables (7). Ahora éstos inhibidores también se aplican al estudio de las funciones del los CIs dentro de la biología del cáncer.

Los canales de K^+ y el ciclo celular

Los canales de K^+ tipo de canales participan en el control de la progresión del ciclo celular: por su influencia en el Vm y los mecanismos no-canónicos, o independientes de permeación; estos últimos son mecanismos que involucran interacciones proteína-proteína (22). La importancia de estos canales para el ciclo celular se ha podido entender mediante el estudio de células cancerosas. En particular llama la atención la extensión de los carcinomas, cáncer de origen epitelial, que pueden llegar a representar cerca del 90 % de esta patología (15).

Los canales de K^+ y el cáncer de mama

En Venezuela una de cada 7 muertes sucede a causa del cáncer; además, el cáncer de mama es la primera

causa de muerte en mujeres entre 45 y 65 años de edad, según la Sociedad Anticancerosa de Venezuela. Este último es la segunda causa de muerte oncológica en las mujeres venezolanas, y va en aumento, según la Asociación Civil Senosalud. El carcinoma ductal de mama se ha estudiado por su alto impacto como problema de salud pública, razón por la que se conocen varios detalles sobre su ciclo celular y los CIs de K^+ involucrados en el mismo. Este tipo de carcinoma se ha estudiado mediante el uso de distintas líneas celulares que se diferencian en su respuesta a mitógenos. La MCF-7 por ejemplo es una línea de carcinoma ductal cuya proliferación responde a la estimulación con estrógenos. La activación de canales de K^+ , en esta línea, es crucial para el avance del ciclo celular a través de G1. De hecho se ha reportado que la regulación de la actividad de estos puede contribuir a la inhibición de la proliferación de estas células (23).

Se han identificado cuatro tipos de canales identificados en la línea de cáncer de mama MCF-7. Estos presentan actividad que puede ser sensible a distintas variables: voltaje, concentración intracelular de calcio [Ca^{+2}], o ATP (13). Hay importante evidencia de que la actividad de estos canales está involucrada con la proliferación de estas células por lo que estos pueden ser considerados en mayor o menor medida potenciales blancos farmacológicos en terapias anticancerosas (19).

La búsqueda de compuestos antiproliferantes que puedan incidir sobre los canales de K^+

Distintas sustancias se han reportado como inhibidoras de la proliferación en distintas líneas cancerosas, incluyendo las de cáncer de mama. Recientemente se ha reportado que el Docetaxel es un agente terapéutico antiproliferante importante. Aunque esta droga afecta la tubulina, también se ha reportado un efecto inhibitorio cerca del 46,4% a una concentración de 10 μM sobre las corrientes de K^+ en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-435S, altamente invasiva, y la MCF-7, menos agresiva (19). Otros compuestos provenientes del grupo de los flavonoides y stilbenos y sus derivados, naturales o sintéticos, inducen efectos citotóxicos sobre distintas líneas cancerosas. En particular un derivado prenilico de la naringenina, el 8-prenylnaringenin, un fitoestrógeno, inhibe la proliferación e induce apoptosis en MCF-7. Además, arriba de 10 μM este compuesto resultó inhibir completamente el canal dependiente de voltaje Kv1.3 en células T Jurkat (20). No obstante, aunque la línea MCF-7 presenta este canal, no se sabe si el

efecto antiproliferante debe a la inhibición sobre el mismo.

En colaboración con el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores se ha comenzado a evaluar el efecto de compuestos con actividad antiproliferante sobre las corrientes ya reportadas para la línea celular MCF-7, entre otras. El mencionado laboratorio ha evaluado compuestos derivados de tetrahydroquinolinas (THQ) sintetizados incorporando una subunidad 4-metoxi-3-hidroxifenil, también con propiedad anticancerosa. Así se ha evidenciado la actividad citotóxica sobre las líneas MCF-7 y SKBr3 de cáncer de mama y PC3 de cáncer de próstata, lográndose valores de IC_{50} entre 7,99 y 15,14 μM (10). Además se ha evaluado el efecto citotóxico de los derivados de THQ en combinación con drogas anticancerosas como paclitaxel y gemcitabine, obteniéndose intensificación citotóxica sinérgica a concentraciones inferiores a 1 $\mu g/mL$ (12). Más recientemente se han reportado efectos citotóxicos de sustancias extraídas de plantas con usos medicinales tradicionales como *Croton malambo* y *Strychnos fendleri*. De la primera se obtuvieron diterpenos y se probaron en distintas líneas celulares, incluyendo las de cáncer de mama, obteniéndose un IC_{50} entre 0,017 y 0,2 μM (17); mientras de la última planta se obtuvo un glucosido fenólico con IC_{50} entre 0.090 y 0.227 μM (18).

Entonces hay varios compuestos que tiene efecto citotóxico sobre las líneas celulares mencionadas, de los cuales no se sabe el mecanismo de acción. Si los compuestos naturales limitan la proliferación es porque están actuando sobre el sistema de control del ciclo celular. Como ya se ha descrito para MCF-7, entre otros tipos celulares, la actividad de los canales de K^+ determina el avance en el ciclo. Es posible entonces que los compuestos están actuando sobre la actividad de los canales mencionados. Con estas hipótesis se plantea la evaluación de los compuestos sobre las corrientes de K^+ en las líneas celulares de cáncer de mama.

Material y metodología para la obtención de las corrientes

La evaluación de las corrientes en las líneas celulares se realiza mediante la técnica de Patch Clamp en modo de célula completa. En esta técnica se intenta que haya continuidad entre el citoplasma de la célula y la solución en una pipeta elaborada para tal fin con capilar de borosilicato. El capilar, con diámetros interno y externo de [1,1 y 1,5] mm respectivamente, se logra adelgazar mediante calentamiento y halado con un instrumento para tal

fín; el P-97 de SUTER INSTRUMENT, de manera que el diámetro interno de la punta esté entre [1 y 3] μm . Posteriormente la punta de la pipeta se pule por calentamiento de mediante una microforja. Las pipetas se llenan con una solución que contiene las siguiente composición (mM): 129 KCl, 12,5 NaCl, 2 MgCl_2 , 0,05 CaCl_2 , 10 HEPES, 0,1 EGTA, 2 Glucosa; con un pH 7,2 ajustado con KOH y se lleva la osmolaridad a 300 mOsm con manitol. La solución externa contiene (mM): 5,7 KCl, 129 NaCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, 2 Glucosa; con un pH 7,4 ajustado con NaOH y se lleva la osmolaridad a 310 mOsm con manitol.

El extremo no adelgazado de la pipeta se introduce dentro de un receptáculo que contiene un electrodo de Ag/AgCl conectado a un sistema de amplificación; el Axopatch 200 A, de Axon Instruments®. Los datos se obtienen mediante el programa pClamp® de la empresa anteriormente mencionada, para ser analizados posteriormente mediante SciDAVis (freeware para graficación y análisis).

Las células se siembran a una densidad de 10^3 células/mL en cubreobjetos circulares de 12,4 mm de diámetro. Se incuban por 24 horas a 37°C , con medio DMEN, 10% Suero Fetal Bovino, 1% de coctel de antibióticos (Penicilina, Estreptomina, Anfotericina B), en atmosfera con 95% de humedad, 5% CO_2 . Posteriormente el cubreobjetos se coloca en una cámara con sistema de perfusión por gravedad.

Las corrientes observadas que se exhiben son de dos tipos: lineales y con rectificación hacia afuera. En los ensayos que se han hecho en el laboratorio los potenciales de reversión, contando los dos tipos de corrientes, van desde -2 mV hasta -45 mV. Así, se corrobora una heterogeneidad en las corrientes de la línea MCF-7 con precedentes en la última década del siglo pasado (9). La explicación de esta heterogeneidad reside en el hecho de que la expresión de canales varía durante el ciclo celular apoyando la idea de que son factor fundamental en la regulación del mismo (13). Todavía resta obtener los controles de inhibición de las corrientes con las sustancias específicas para cada corriente reportada. Posteriormente se evaluarán los posibles efectos de las sustancias citotóxicas mencionadas sobre las corrientes.

El desarrollo de herramientas teóricas y computacionales para estudiar la homeostasis de las células cancerosas

El Vm depende de las corrientes de K^+ , Cl^- y Na^+ principalmente, las cuales se mantiene por el trabajo

de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Este potencial cambia conforme la célula avanza en el ciclo celular (24). La homeostasis de Ca^{2+} y el volumen celular, entre otras variables, están íntimamente ligados al Vm (14). Además se sabe que durante el ciclo celular se producen cambios de volumen (15). De manera que se espera una relación cuantitativamente compleja entre el sistema de control del Vm, la homeostasis de Ca^{2+} y el volumen celular, entre otras variables importantes para la fisiología celular.

Actualmente hay varias maneras de implementar modelos matemáticos que relacionen correctamente las concentraciones iónicas con el Vm y el volumen celular, no obstante los sistemas pueden llegar a tener un grado de complejidad considerable (6). Por esta razón se han realizado simulaciones implementado un modelo matemático simplificado del Vm, utilizando un lenguaje de programación de sistemas dinámicos (XCOS de SiLab; software libre), como herramienta para entender la dinámica de las variables mencionadas. Actualmente el modelo está configurado de tal manera que presenta los parámetros geométricos aproximados de una fibra muscular. El objetivo ha sido validar el mismo al comparar el comportamiento dinámico con el de experimentos clásicos de cambio de Vm y volumen celular en ese modelo (3). El modelo reproduce en buena medida el comportamiento en cambio de Vm y volumen al cambiar las concentraciones de K^+ y Cl^- externos; según lo reportado el siglo pasado (8). Además, se ha desarrollado una interfaz gráfica de usuario (GUI) para manipular de manera amigable las variables independientes o algunos parámetros (4). Resta perfeccionar el modelo incorporando: co-transportadores posiblemente importantes en la homeóstasis, un modelo más exacto de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y mejores modelos de conductancia para cada corriente en particular.

Referencias

1. Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S. y Becchetti, A. (2009). Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. **Curr. Med. Chem.** 16(1): 66-93.
2. Becchetti, A., Munaron, L. y Arcangeli, A. (2013). The role of ion channels and transporters in cell proliferation and cancer. **Front. Physiol.** 4: 312.
3. Calderón C. y Gutiérrez, A. (2014). Simulación del potencial transmembrana en reposo mediante Xcos, el módulo de sistemas dinámicos de Scilab. Abs. en **LXIV Convención anual de AsoVAC**.

4. **Calderón C. y Gutiérrez A.** (2015). Implementación de una interfaz gráfica de usuario para el uso de un simulador del potencial transmembrana. Abs. en **LXV Convención anual de AsoVAC**.
5. **Fiorio Pla, A. y Munaron, L.** (2014). Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** **369**(1638): 20130103.
6. **Fraser, J.A. y Huang, C.L.H.** (2007). Quantitative techniques for steady-state calculation and dynamic integrated modelling of membrane potential and intracellular ion concentrations. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** **94**(3): 336-372.
7. **González, C., Báez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D. y Latorre, R.** (2012). K(+) channels: function-structural overview. **Compr. Physiol.** **2**(3): 2087-2149.
8. **Hodgkin, A.L. y Horowitz, P.** (1959). The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. **J. Physiol.** **148**: 127-160.
9. **Klimatcheva, E. y Wonderlin, W.F.** (1999). An ATP-sensitive K(+) current that regulates progression through early G1 phase of the cell cycle in MCF-7 human breast cancer cells. **J. Membr. Biol.** **171**(1): 35-46.
10. **Kouznetsov, V., Merchan A.D.R., Arvelo, F., Bello, F.J.S., Sojo, F. y Muñoz, A.** (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives obtained through imino diels-alder reactions as potential antitumoral agents. **Lett. Drug Des. Discov.** **7**(9): 632-639.
11. **Lobikin, M., Chernet, B., Lobo, D. y Levin, M.** (2012). Resting potential, oncogene-induced tumorigenesis, and metastasis: the bioelectric basis of cancer in vivo. **Phys. Biol.** **9**(6): 065002.
12. **Muñoz, A., Sojo, F., Arenas, D.R.M., Kouznetsov, V.V. y Arvelo, F.** (2011). Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. **Chem. Biol. Interact.** **189**(3): 215-221.
13. **Ouadid-Ahidouch, H. y Ahidouch, A.** (2008). K+ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. **J. Membr. Biol.** **221**(1): 1-6.
14. **Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N. y Prevarskaya, N.** (2004). Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** **287**(1): C125-C134.
15. **Pedersen, S.F., Hoffmann, E.K. y Novak, I.** (2013). Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer. **Front. Physiol.** **4**: 233.
16. **Remillard, C.V. y Yuan, J.X.J.** (2004). Activation of K+ channels: an essential pathway in programmed cell death. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** **286**(1): L49-L67.
17. **Suárez, A., Taddei, A., Sojo, F. y Arvelo, F.** (2014). Diterpenos bioactivos de *Croton malambo* H. Karst. **Revista Facultad de Farmacia** **77**(1-2): 8-15.
18. **Suárez, A.I., Mancebo, M., Monache, F.D., Tirri, M.M., Sojo, F., Arvelo, F. y Tillett, S.** (2016). A new indole-alkaloid and a new phenolic-glycoside with cytotoxic activity from *Strychnos fendleri*. **Nat. Prod. Res.** **30**(4): 399-405.
19. **Sun, T., Song, Z.G., Jiang, D.Q., Nie, H.G. y Han, D.Y.** (2015). Docetaxel Modulates the Delayed Rectifier Potassium Current (I K) and ATP-Sensitive Potassium Current (I KATP) in Human Breast Cancer Cells. **J. Membr. Biol.** **248**(2): 197-204.
20. **Teisseyre, A., Gasiorowska, J. y Michalak, K.** (2015). Voltage-Gated Potassium Channels Kv1.3–Potentially New Molecular Target in Cancer Diagnostics and Therapy. **Adv. Clin. Exp. Med.** **24**(3): 517-524.
21. **Turner, K.L. y Sontheimer, H.** (2014). Cl- and K+ channels and their role in primary brain tumour biology. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** **369**(1638): 20130095.
22. **Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stühmer, W. y Pardo, L.A.** (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** **369**(1638): 20130094.
23. **Wonderlin, W.F. y Strobl, J.S.** (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. **J. Membr. Biol.** **154**(2): 91-107.
24. **Yang, M. y Brackenbury, W.J.** (2013). Membrane potential and cancer progression. **Front. Physiol.** **4**: 185.

Fundamentos teóricos y prácticos para el análisis de canales unitarios a través de un modelo cinético

ALEJANDRO D. MATA DABOIN Y JESÚS G. ROMERO

Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica. Centro de
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: romerojesus@cantv.net

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de iones a través de membranas biológicas. El "patch clamp" permite registrar la corriente que fluye a través de un solo canal y aporta información para establecer relación entre la estructura y la función de estas proteínas a través de análisis basados en postulados matemáticos y probabilísticos. Para este análisis es necesario conocer la secuencia y duración de cada apertura y cierre registrado, además de la resolución temporal del sistema experimental. Con esta información es posible calcular la probabilidad de que ocurra la secuencia de eventos obtenida bajo los supuestos de uno o más modelos cinéticos propuestos. Para establecer relaciones entre estructura y función debemos suponer que la actividad registrada es producto de una sola proteína; sin embargo, en algunos casos cumplir con este requisito no es una tarea sencilla. En nuestro laboratorio hemos propuesto estudiar modos de actividad tipo ráfaga, para evitar o disminuir los artefactos relacionados con incertidumbre acerca del número de canales registrados. El alcance de este análisis depende de las dificultades metodológicas de cada sistema experimental y debe ser interpretado con cautela al proponer relaciones entre los estados propuestos y la estructura del canal.

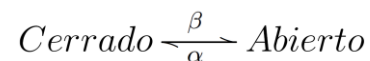
Introducción

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de iones a través de membranas biológicas. Desde la década de 1950 el uso de técnicas electrofisiológicas ha permitido estudiar con detalle este tipo de proteínas (6,7). Uno de los métodos más importantes de esta rama de la ciencia es el "patch clamp", que permite registrar la corriente que fluye a través de un solo canal, siendo pionera en el estudio de la actividad de una sola proteína y no de una población (6). Para el análisis de registros de canal unitario podemos calcular el porcentaje de tiempo que permanece el canal abierto con respecto al tiempo total de registro, obteniendo su probabilidad de estar abierto (P_o). Además se puede conocer la secuencia y duración de cada apertura y cierre del canal estudiado. Sabemos que la transición entre el estado abierto y el cerrado involucra un movimiento en los aminoácidos de la proteína que permite o no el flujo iónico a través de la vía de paso. Si consideramos dos configuraciones discretas en las que se reorganizan los aminoácidos, podemos relacionarlas con estados cinéticos de un modelo matemático que permita simular la secuencia y duración de los eventos registrados (2,3). A continuación se presentan los fundamentos teóricos y prácticos que permiten asociar los estados de un modelo cinético con la actividad de un canal iónico.

Fundamentos teóricos

El modelo más simple que se puede postular es un mecanismo de reacción que consiste en la transición

entre un único estado cerrado y un único estado abierto



El símbolo que denota una constante de proporcionalidad, descrito como la constante de velocidad para una transición, se coloca por encima o por debajo de la flecha que representa la transición.

Cuando observamos un canal unitario los cierres y aperturas ocurren al azar, de modo que la constante de velocidad debe ser interpretada de manera probabilística: α es una medida de la probabilidad de que un canal abierto se cierre en un tiempo determinado. Por lo tanto, estamos interesados en la duración del tiempo en el que el sistema permanece en un estado particular. Esta duración es una variable aleatoria y la forma de su variabilidad puede ser descrita por una distribución de probabilidad. A partir del uso de teorías de probabilidades y asumiendo un proceso markoviano, Colquhoun y Hawkes (4) definen la función de distribución acumulada $F(t)$ para canal abierto como,

$$F(t) = 1 - e^{-\alpha t}$$

y su primera derivada, define la función de densidad de probabilidad (fdp),

$$f(t) = \frac{dF(t)}{dt} = -\frac{dF(t)}{dt} = \alpha e^{-\alpha t}$$

donde α es el recíproco de la constante de tiempo, $\tau=1/\alpha$, para cada componente de la fdp . Esta es una

función exponencial con media $1/\alpha$, definida tal que el área bajo la curva hasta un tiempo t representa la probabilidad de que el canal permanezca abierto hasta ese tiempo.

La elección del modelo propuesto involucra fundamentalmente dos preguntas:

¿Cuántos estados describen el nivel de canal cerrado y el nivel de canal abierto?

¿Cómo se conectan dichos estados?

Métodos

La técnica “patch clamp” registra corrientes iónicas que fluyen a través de una o más proteínas presentes en pequeños trozos de membranas biológicas y permite controlar y manipular experimentalmente el potencial transmembrana (6). En un registro de patch clamp la detección de eventos se logra a través de un umbral que provee una referencia simple de los momentos en que ocurren las transiciones entre cerrado y abierto, tal que cada cruce del umbral se interpreta como una apertura o cierre del canal y el tiempo que pasa por encima o por debajo, se considera como un estimado del tiempo que permanece abierto o cerrado. Se asume que la corriente que fluye a través de un canal consiste de pulsos rectangulares, con tiempos de transición infinitamente pequeños, que alcanzan niveles relativamente discretos de corriente (Figura 1). Un estimado de la amplitud (A_o) de la corriente que fluye a través del canal se obtiene haciendo un histograma de todos los puntos de corriente que contiene el registro. Luego se ajustan funciones gaussianas para estimar los valores de corriente que ocurren con mayor frecuencia (Figura 2).

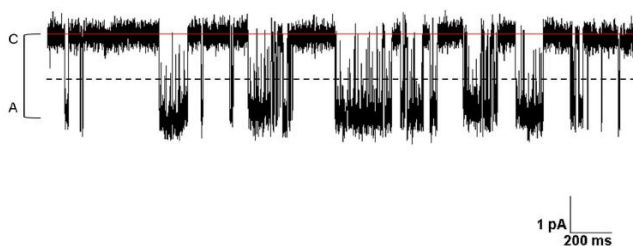


Figura 1. Curso temporal de la corriente que fluye a través de un parche de membrana aislado de eritrocito humano, a -60 mV y bajo presión negativa, en el modo inside-out de T.U.G.O-Patch clamp. Deflexiones de corriente hacia abajo indican la apertura del canal. A la izquierda del trazo se muestran los niveles de canal cerrado (C) y abierto (A). La línea discontinua representa la mitad de la amplitud de la corriente que fluye a través del canal y es considerado como umbral para la detección de transiciones entre abierto y cerrado.

En este ejemplo el canal muestra una amplitud de corriente de -2.1 pA, por lo que se fija un umbral para la detección de transiciones, entre conductivo y

no conductivo, de -1.05 pA ($A_o/2$). Finalmente se obtiene un registro idealizado que se aproxima a la verdadera actividad del canal y proporciona los datos que describen la secuencia de transiciones entre abierto y cerrado (Figura 3).

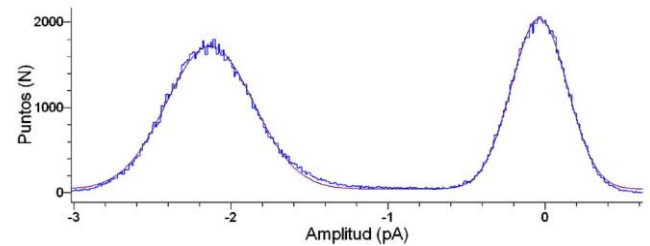


Figura 2. Histograma de todos los valores de corriente adquiridos durante el registro. La línea continua representa la función gaussiana de dos componentes ajustada. El máximo alrededor de -2.1 pA revela al menos un canal activo en el parche de membrana bajo control de voltaje, además del máximo alrededor de 0 pA (canal cerrado). Debido a que este patch se realizó en condiciones simétricas con un voltaje de -60 mV, se calcula una conductancia de 35 pS.

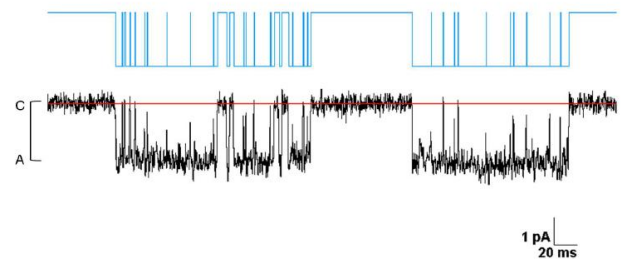


Figura 3. Ejemplo representativo de un mismo registro antes (trazo inferior) y después (trazo superior) del proceso de idealización. A la izquierda del trazo se indican los niveles de canal cerrado (C) y abierto (A).

Debido a que la corriente que fluye a través de un canal iónico es muy pequeña, en el orden de los pico amperios, es necesario filtrar la señal para eliminar el ruido eléctrico y poder observar la actividad de canal. Se usan filtros pasa bajos que no afectan las frecuencias desde cero hasta un límite mayor denominado frecuencia de corte f_c , ya que, el propósito del filtrado es reducir el ruido de alta frecuencia. El límite para el filtrado de los datos depende de las fluctuaciones eventuales de corriente, que produce el ruido de alta frecuencia, lo suficientemente amplias para superar el umbral de detección de eventos. Si el ruido eléctrico de la corriente cero o base es tan alto que supera el umbral, diremos que el canal se abrió cuando en realidad no lo hizo. Este artefacto podría acortar la duración de los eventos o aumentar la duración de ráfagas de eventos. Para medir esta variable hacemos un histograma de todos los puntos en regiones del registro donde no hay actividad de

canal y ajustamos una función gaussiana, para así obtener la desviación estándar o ruido RMS de la corriente base. De esta forma podemos estimar el número de veces que se cruza el umbral por unidad de tiempo, solo por efecto del ruido de alta frecuencia, a través de la siguiente relación (1)

$$\gamma_f \approx f_c e^{\frac{-(A_o/2)^2}{2 \text{ruido RMS}^2}}$$

Debido a que las corrientes de canal unitario durante cada apertura o cierre son esencialmente rectangulares, serán afectadas por estos filtros disminuyendo la pendiente de ascenso o descenso en el registro y por lo tanto, aumenta el tiempo necesario para alcanzar la amplitud máxima de corriente que fluye a través del canal. La forma en que un filtro pasa bajos afecta un pulso rectangular de corriente puede ser caracterizada a través del tiempo de ascenso del filtro, t_r , que se obtiene por medio de la siguiente relación (1):

$$t_r = \frac{0,3321}{f_c}$$

Podemos ver que a mayor f_c , más corto será el tiempo de ascenso del filtro.

Los eventos cuya duración es menor a un valor crítico no podrán ser detectados, ya que no tendrán la amplitud necesaria para alcanzar el 50 % de la amplitud máxima de corriente, es decir, el umbral de detección de eventos. Debido a que el análisis depende de la medición precisa del tiempo que pasa el canal abierto o cerrado, no deben ser incluidos eventos cuya duración esté por debajo de un límite impuesto por el filtro utilizado. Como se observa en la Figura 4, el filtro de 4 kHz permitiría tomar en cuenta transiciones que no serían detectadas con el filtro de 1 kHz y resulta en la sobrestimación de la duración de los eventos. De esta forma podemos notar que el filtrado, a pesar de que contribuye a eliminar el problema del ruido, disminuye la resolución temporal y hay mayor dificultad para detectar eventos cortos.

Una vez idealizado el registro se obtiene una secuencia de eventos de apertura y cierre cuya duración es conocida. Esto permite realizar histogramas de frecuencia cuyas columnas de ancho constante representan un intervalo de tiempo y el valor en las ordenadas, el número de eventos cuya duración se encuentra dentro de ese intervalo. Podemos ver como a medida que aumenta el tiempo, hay una caída exponencial en el número de eventos abiertos que componen cada columna (Figura 5), como lo predice la fdp definida teóricamente. Los ajustes realizados sobre los histogramas obtenidos brindan información importante, ya que, la cantidad de exponenciales necesarias para obtener un ajuste

satisfactorio indica la cantidad de estados que describen la condición estudiada.

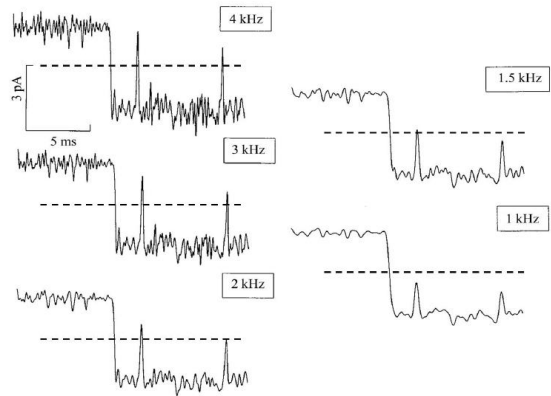


Figura 4. Efecto del filtrado sobre los valores de corriente obtenidos en el tiempo, adquiridos durante el registro de un canal unitario con el uso de la técnica patch clamp. La línea discontinua representa la mitad de la amplitud de la corriente que fluye a través del canal y es considerado como umbral para la detección de transiciones entre abierto y cerrado. Tomado y modificado de Colquhoun (1).

Análisis de datos

Este método implica proponer un modelo cinético y calcular la probabilidad de que ocurra la secuencia de eventos obtenida. Se inicia variando las constantes que integran cada posible modelo, para encontrar aquellas que resulten en la máxima probabilidad de que la secuencia obtenida ocurra bajo las hipótesis del modelo (máxima verosimilitud). Una vez determinadas dichas constantes y el valor de máxima verosimilitud de distintos modelos propuestos, se pueden establecer las comparaciones necesarias para escoger el más adecuado.

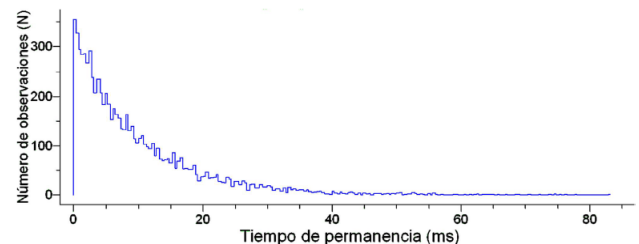


Figura 5. Histograma que incluye todos los eventos obtenidos de un registro continuo de 95 segundos. La base de cada columna es un intervalo de 0,5 ms y su altura representa el número de eventos cuya duración esté incluida dentro de este intervalo.

Ráfagas

Una de las principales potencialidades del análisis cinético es el establecimiento de una relación entre los estados del modelo propuesto y las configuraciones estructurales que adopta el canal durante su actividad. Para poder hacer este planteamiento debe asegurarse que la actividad

analizada es producto de una sola proteína. Solo es posible cumplir esta condición en experimentos donde se mantiene una P_o elevada por largos periodos, sin evidencias de más de un nivel de corriente aparte del cero. En algunos sistemas experimentales la frecuencia de obtención de parches que cumplen con esta condición es muy baja y se hace necesario sacar información de registros con baja actividad y con más de un canal. Para ello se debe ajustar el análisis para evitar o disminuir los artefactos relacionados con incertidumbre acerca del número de canales que participan en los registros. En distintos tipos de canales se ha descrito una actividad que se caracteriza por mostrar prolongados eventos en el estado cerrado que son frecuentemente seguidos por aperturas consecutivas separadas por cerrados cortos, en un comportamiento que se ha denominado actividad tipo ráfaga (Figura 6). Una ráfaga se define como un grupo de aperturas que están separadas por cerrados cuya duración es menor que un tiempo crítico (t_c) dado. La dificultad de conocer la cantidad de canales en el parche va más allá de obtener un solo nivel de corriente aparte del cero, ya que, podría haber más de un canal pero no ocurrir la apertura simultánea de dos o más; sin embargo, la ausencia de aperturas simultáneas durante una ráfaga con P_o cercana a la unidad, maximiza la probabilidad de que la sucesión de abiertos y cerrados sean producto de la actividad de un solo canal. Para este análisis es necesario conocer tanto los cerrados que componen la ráfaga como los cerrados que la limitan y fijar un tiempo límite en la duración de cerrados que pertenecen a la ráfaga. Este tiempo se puede calcular a través de la siguiente ecuación (5)

$$1 - e^{-\frac{t_c}{\tau_{largo}}} = e^{-\frac{t_c}{\tau_{corto}}}$$

El cálculo iguala el área bajo la curva de las exponenciales para cerrados corto y largo, que serán erróneamente clasificados como pertenecientes a cerrado corto o cerrado largo. De esta forma es posible definir la ráfaga que incluye solo cerrados cortos y no se ve afectado por el largo de los cerrados que las separan (Figura 6).

Conclusiones

Un registro de canal unitario contiene información acerca del funcionamiento de una sola proteína y por lo tanto debe ser analizado como un fenómeno estocástico que depende de la estructura y el ambiente inmediato del canal estudiado. Las transiciones entre el estado conductivo y no conductivo de la vía de paso iónica pueden ser simuladas a través de modelos cinéticos formales partiendo de postulados matemáticos y probabilísticos. El alcance de este tipo de análisis

depende de las dificultades metodológicas que presenta cada sistema experimental y debe ser interpretado con cautela al momento de proponer relaciones entre los estados propuestos y la estructura del canal.

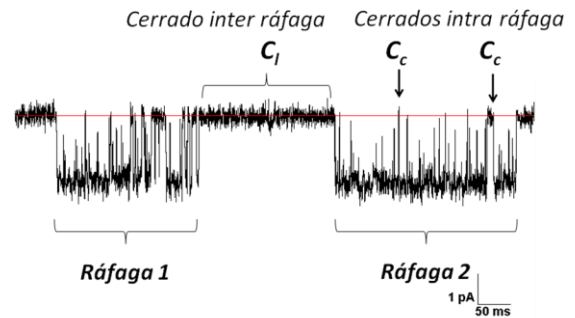


Figura 6. Ejemplo representativo de grupos de aperturas separadas por cerrados de corta duración, denominadas ráfagas, señalando los estados cerrados "intra" e "inter" ráfaga que se describen en el texto. A la izquierda del trazo se indican los niveles de canal cerrado (C) y abierto (A).

Referencias

1. Colquhoun, D. (1994). Practical analysis of single channel records. En: **Microelectrode techniques, The Plymouth workshop handbook**. Ogden, D. (ed.), Capítulo 6: Pp 101-139. Cambridge. The Company of Biologists.
2. Colquhoun, D. y Hawkes, A.G. (1977). Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 199(1135): 231-262.
3. Colquhoun, D. y Hawkes, A.G. (1981). On the stochastic properties of single ion channels. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 211(1183): 205-235.
4. Colquhoun, D. y Hawkes, A.G. (1995). The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. En: **Single-Channel Recording**. Sakmann B y Neher E (eds.): Pp 397-482. New York. Plenum Press.
5. Colquhoun, D. y Sakmann, B. (1985). Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. **J. Physiol.** 69: 501-557.
6. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers. Arch.** 391(2): 85-100.
7. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. y Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. **J. Physiol.** 116(4): 424-48.

Canales iónicos en *Leishmania* y en el Macrófago infectado: Posibles blancos terapéuticos

ANGELES R. ZAMBRANO-ARNONE^{1,3}, NAILETH GONZALEZ-SANABRIA³, YEIMAR PORTILLO³, PHENELOPE RIVAS¹, ALEJANDRO D. MATA DABOIN^{1,3}, DANIEL LANDI-CONDE², LUIS OCTAVIO ROMERO³, VINCENZA CERVINO^{2,3} Y JESÚS G. ROMERO^{1,3}

¹Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica. ²Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental. Caracas - Venezuela

³Escuela de Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela

Correo-e: jesus.romero@ciens.ucv.ve

La Leishmaniasis es un problema de salud pública en países en desarrollo. *Leishmania* presentan un ciclo de vida metaxénico enfrentándose a dos situaciones distintas: intracelular (mamífero)/extracelular (insecto), con condiciones diferentes (iónicas, pH, osmolaridad), es claro entonces que los canales iónicos en *Leishmania* y en el macrófago-infectado son fundamentales para mantener este ciclo, convirtiéndose así en promisorios blancos terapéuticos:

.-Se han propuesto canales de K⁺ en el macrófago-infectado modulados diferencialmente durante la infección.

.-La replicación intracelular del parásito pareciera estar relacionada con canales y/o transportadores de membrana que son modulados por las condiciones internas de la célula hospedera.

.-Cambios en la conductancia de K⁺ en el macrófago parecen estar relacionados con su capacidad para activarse.

.-La alteración de las I_{K+} del macrófago-infectado promueve la disminución de elementos citotóxicos en defensa a la infección parasitaria y están relacionadas con la inducción de la proliferación del parásito.

.-En nuestro laboratorio hemos propuesto la existencia canales de K⁺ de conductancia intermedia en *Leishmania* y la inhibición de los mismo logra detener la proliferación de esta *in vitro*.

Todo esto indica que caracterizar estos mecanismos de transporte iónico en *Leishmania* y en el Macrófago-infectado, es una promisoriosa estrategia para evidenciar nuevos blancos terapéuticos.

Introducción

Por lo menos quince especies de *Leishmania* (entre ellas: *L.(V) tropica*, *L.(V) major*, *L.(L) donovani*, *L.(V) braziliensis*, y *L.(L) mexicana*) causan un amplio espectro de enfermedades denominadas leishmaniasis, que dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada en la infección y de la respuesta inmunitaria del hospedador, puede cursar con características clínicas diferentes, siendo una enfermedad polar, con un polo benigno en la leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), pasando por la Leishmaniasis Cutánea Mucosa (LCM), hasta el polo maligno en la leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y además la Leishmaniasis Visceral (LV) (5).

En el *nuevo mundo* las especies del género *Leishmania* son transmitidas por la picadura del mosquito hembra infectado, perteneciente al género *Lutzomyia*, en particular *L. logipalpis* (8), es importante resaltar que esta es una Zoonosis, por lo que es indispensable la existencia de un reservorio en la naturaleza y que el hombre se introduzca en los nichos de estos convirtiéndose en un hospedero accidental. Tanto reservorios naturales como vectores tienen su hábitat natural en regiones rurales con alta humedad, generalmente en el pie montano, presentándose patrones de transmisión,

intradomiciliario, peridomiciliario y rural. Esto implica una infección altamente asociada a las condiciones socioculturales de la persona.

En Venezuela para el periodo 2008-2009 se reportaron un total de 4640 casos de las diversas formas clínicas de leishmaniasis cutánea (LC) con una tasa de 7,94/100.000 habitantes (6). Para el 2010-2014 se registraron en el país 8937 casos en los que la tasa más alta se presentó en 2012 con 7,14 y para los años 2013-2014 presentó tasas de 5,41 y 5,51 respectivamente (11).

En los vertebrados *Leishmania* se presenta en el estadio de *amastigote*: ovoide o esférico, inmóvil, de 2,5 a 5 μm de diámetro, con núcleo redondo, que prolifera en el interior del fagolisosoma de los macrófagos (5). En los invertebrados, *Leishmania* existe como *promastigote*: fusiforme de 14 a 20 μm de largo por 2 a 4 μm ancho, presenta un núcleo ovoide y se encuentra en el tubo digestivo del vector (8).

Macrófagos como células hospederas

Los macrófagos son células fagocíticas, que desempeñan importantes funciones en la respuesta de inmunidad adaptativa e innata. Los macrófagos son activados por productos microbianos como la endotoxina y por citocinas producidas por los

linfocitos T. Los macrófagos activados fagocitan y destruyen a los microorganismos, secretan citocinas pro-inflamatorias y presentan antígenos a los linfocitos T colaboradores. Así, la principal función efectora de los macrófagos es destruir a los microorganismos (1).

Las *Leishmanias*, en humanos, son residentes intracelulares obligatorios de los macrófagos. Una vez que *Leishmania* penetra en el hospedador vertebrado es fagocitada por los macrófagos y se limita a la vacuola parasitófora (VP) (18), que se caracteriza por un pH ácido y ser rica en hidrolasas (2). Por tanto la consecución de nutrientes para el parásito se da a través de la membrana de la vacuola parasitófora, gracias a estructuras como canales o transportadores que permitan el paso de moléculas desde el citosol del macrófago, como se ha demostrado en el caso de *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* (3). De igual modo, *Leishmania* se replica en la vacuola parasitófora y este proceso parece depender de la actividad de un canal de cloruro presente en la membrana de la VP (22).

Alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} en las células hospederas después de la interacción y/o la invasión por parásitos como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* o *Entamoeba* han sido reportadas (10). En eritrocitos humanos infectados con *Plasmodium falciparum*, por ejemplo, existe una conductancia catiónica no selectiva, inhibida por los bloqueadores de NPP (New permeation pathway) (furosemida) y bloqueadores de los canales de cationes (amilorida, Gd^{3+}) (7).

También se ha reportado que cambios en la permeabilidad de la membrana de los macrófagos pueden producir alteraciones en su capacidad para activarse (4). Se han demostrado la existencia de dos corrientes de K^+ , una saliente-retrasada y una rectificadora hacia-adentro y que la regulación diferencial estos canales afectan crucialmente la respuesta específica de los macrófagos (23).

Scott *et al.* (19) demostraron que en macrófagos-like, la infección con *Leishmania major* o el tratamiento con bloqueadores de canales de K^+ suprime la producción de óxido nítrico (NO), planteándose una relación funcional entre las corrientes de potasio y el proceso de desactivación de los mecanismos citotóxicos del macrófago infectado con *Leishmania* (19).

En este orden de ideas, Vicente *et al.* (23) mostraron que la inducción de la expresión en el macrófago de la NO-sintetasa-inducible era inhibida al bloquear la actividad de los canales de K^+ (23).

En estos estudios se muestran que estas corrientes de K^+ son la expresión funcional de canales de K^+ Kv1.3

y Kir2.1 (23). Camacho *et al.* (4), partiendo de esto y utilizando inhibidores de canales de K^+ (Tetra Etil Amonio TEA y 4-AminoPiridina 4AP), midieron el impacto de la infección por *Leishmania amazonensis* en macrófagos sobre las corrientes salientes (I_{OUT}), encontrando que con la utilización de 4-AP no había diferencias entre los macrófagos no activados y los infectados con *Leishmania*. Por otro lado el tiempo para alcanzar el máximo de las I_{OUT} aumento en un 40%, al igual que la sensibilidad a TEA, sugiriendo un aumento en la actividad de canales de K^+ . Estos hallazgos son de gran importancia porque la inhibición de los canales de K^+ se ha asociado con disminución en la capacidad de fagocitosis y con la disminución de la producción de NO (4,19,23), lo que sugiere que estas corrientes podrían ser críticas para el control de infecciones por los macrófagos y por tanto unos promisorios blancos terapéuticos.

También se ha demostrado que los macrófagos activados que no habían sido tratados con inhibidores de canales de K^+ mostraron cambios en las corrientes iónicas y despolarización de la membrana, esto es, que la activación del macrófago se asocia a la despolarización de su membrana y la producción de NO. Pero en el caso de la infección por *Leishmania* lo que se observa es lo contrario, es decir, una disminución en la producción del NO y un aumento de las corrientes salientes, lo que es interpretado como una “débil” activación del macrófago, sugiriéndose que la infección por *Leishmania* promueve cambios en las corrientes iónicas, la hiperpolarización del V_m de los macrófagos y disminución de la capacidad de los macrófagos activados para producir NO, permitiéndose así que la *Leishmania* sobreviva y se replique dentro de esa célula (19).

Otros estudios en macrófagos infectados con *Leishmania* spp., durante las primeras 12 horas post-infección, mostraron una despolarización de la membrana acompañada de la disminución de un 29% en la capacitancia de la membrana (C_m). No obstante, cambios en general similares a los descritos se obtuvieron luego de la fagocitosis de esferas de látex, de esta manera estos cambios iniciales son atribuidos al proceso mismo de fagocitosis (16). Otros inhibidores de Canales iónicos, como Nifedipina y Verapamil, presentan efectos de inhibición en el complejo *Leishmania*-Macrófago, lo que sugiere un rol del Ca^{2+} sobre la internalización del parásito (9).

Bloqueadores de canales iónicos y supervivencia de Leishmania spp.

Los Canales iónicos regulan procesos cruciales dentro de las células, por lo que su actividad anormal sería deletérea para la célula, razón por la cual los

planteamos como blancos terapéuticos promisorios. Se han analizado los genomas de parásitos protozoarios patógenos como *Trypanosoma* y *Leishmania* en la búsqueda de genes homólogos de canales iónicos de mamíferos (14,21,24). Los genomas de *Trypanosoma* y *Leishmania* poseen genes homólogos a Canales de Ca^{2+} intracelulares en mamíferos, como los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato y receptores de rianodina. También se han encontrado genes codificantes para canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (14).

Leishmania spp. posee genes que codifican homólogos de canales Piezo (canales mecanosensibles), que difieren sustancialmente de los genes de canales Piezo existentes en humanos (15). Además, nosotros identificamos un posible gen de canal de K^+ en cada especie con sustituciones en la zona del poro no existentes en humanos (24).

En la búsqueda de nuevos fármacos contra la Leishmaniasis, se ha demostrado la sensibilidad de *Leishmania* spp., a inhibidores de canales iónicos. Se ha reportado por ejemplo la susceptibilidad de promastigotes de *L. mexicana* a glibenclamida, un bloqueador de canales de K^+ dependientes de ATP, encontrándose un efecto dosis dependiente (20). También se ha demostrado que hay un efecto diferencial de la glibenclamida sobre el crecimiento de promastigotes y amastigotes axénicos de *L.(L.) mexicana* M9012, encontrándose que estos últimos parecen ser más susceptibles a la droga (12).

El Bepridil es un bloqueador de canales Ca^{2+} Tipo L, y de Canales de Na^+_{vm} , usado como agente antianginoso, antiarrítmico y antihipertensivo, que ha sido probado en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L.(L.) chagasi*, encontrándose una susceptibilidad a Bepridil con valores de IC_{50} de 3,81 y 21,55 μM , respectivamente. *L.(L.) amazonensis*, *L.(L.) major* y *L.(V.) braziliensis* y promastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* también fueron susceptibles (17).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto de inhibidores de canales iónicos sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Evaluamos el efecto de la Nifedipina (un bloqueador de canales de Ca^{2+} de tipo dihidropiridina en el crecimiento de cultivos de promastigotes de *L.(L.) amazonensis*. Encontrándose un efecto dosis dependiente sobre el crecimiento del parásito para 0,1, 1 y 10 μM , con un IC_{50} en el orden de las centenas de nM.

Los canales de K^+ sin lugar a dudas son fundamentales en la vida de todos los organismos sin excepción, es por eso que se han planteado como posibles blancos terapéuticos (13,24). En nuestro

laboratorio hemos evaluado el efecto de TRAM-34, un inhibidor específico de canales de K^+ de conductancia intermedia (I_K), sobre el crecimiento de *L.(L.) amazonensis*, encontrándose un dramático efecto inhibitorio con un IC_{50} entre 2 y 8 μM de TRAM-34. El efecto de este inhibidor específico de los I_K nos permite proponer la existencia de un canal de K^+ de la familia de conductancia intermedia en las membranas de *L.(L.) amazonensis*.

Conclusiones

Se han llevado a cabo diversos estudios de sistemas de transporte que están presentes en la membrana plasmática de estos parásitos, los cuales están relacionados con su adaptación a los cambios ambientales durante su ciclo de vida, manteniendo así su homeostasis y promoviendo su proliferación y diferenciación. De igual modo se han descrito diversos mecanismos de transporte en la membrana plasmática del macrófago, como célula hospedera, que están involucrados en la internalización del parásito, en la diferenciación de éste dentro de esta célula y en los mecanismos que promueven la disminución o eliminación de los elementos de citotóxicos que los macrófagos producen en defensa a la infección por *Leishmania*. También se ha reportado que cambios en la permeabilidad de la membrana de los macrófagos pueden producir alteraciones en su capacidad para activarse. Y hemos sido capaces de identificar posibles canales específicos en a membrana de Leishmania. Todo esto despierta interés en conocer cuáles son, como funcionan y son modulados y como están relacionados entre si estos sistemas de transporte en la membrana del macrófago-infectado y del parásito, con la finalidad de buscar nuevos blancos terapéuticos.

Referencias

1. **Abbas, A.** (2003). **Inmunología Celular y Molecular**. Editorial: Mcgraw-hill 5ª edición. Capítulo 4: 51-86.
2. **Antoine, J., Prina, E., Jouanne, C. y Bongrand, P.** (1990) Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.** **58:** 779-787.
3. **Camacho, M.** (2012). Electrical Membrane Properties in the Model *Leishmania* Macrophage, Patch Clamp Technique. Fatima Shad Kaneez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0406-3, InTech. Capítulo 10: 203-230.
4. **Camacho, M., Forero, M., Fajardo, C., Niño, A., Morales, P. y Campos, H.** (2008). *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by

- altering their outward potassium currents. **Experimental Parasitology**. **120**: 50–56.
5. **Cunningham, A.** (2002). Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology** **72**: 132-141.
 6. **De Lima, H., Borges R., Escobar, J. y Convit, J.** (2011). Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental** **51**: 215-224.
 7. **Duranton, C., Huber, S., Tanneur, V., Lang, K., Brand, V., Sandu, C. y Lang, F.** (2003). Electrophysiological Properties of the *Plasmodium falciparum*-Induced Cation Conductance of Human Erythrocytes. **Cell Physiol. Biochem.** **13**: 189-198.
 8. **Gontijo, B. y Ribeiro de Carvalho, M.** (2003). Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **36**(1): 71-80.
 9. **Misra, S., Naskar, K., Sarkar, D. y Ghosh, D.** (1991). Role of Ca^{2+} ion on *Leishmania macrophage* attachment. **Molecular and Cellular Biochemistry**. **1112**: 13-18.
 10. **Olivier, M.** (1996). Modulation of Host Cell Intracellular Ca^{2+} . **Parasitology Today** **12**: 4.
 11. **Ortega-Moreno, M., Belizario, D., Galindo, W. y Guevara, J.** (2015). Actualización epidemiológica de la leishmaniasis cutánea americana en Venezuela. Periodo 2010-2014. **Dermatol Venez.** **53**(1): 17-21.
 12. **Orué, A., Pérez J., Fuentes, J., Odremán, I., Serrano-Martín, X. y Mendoza-León, A.** (2007). *Leishmania sp.*: efecto de la glibenclamida, un bloqueador de canales de K^+ , sobre el ciclo de vida *in vitro*. **Salus. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Carabobo** **11** (1): 32-36.
 13. **Prole, D. y Taylor C.** (2011). Identification of Intracellular and Plasma Membrane Calcium Channel Homologues in Pathogenic Parasites. **PLoS ONE** **6**(10): e26218. doi:10.1371/journal.pone.0026218.
 14. **Prole, D. y Marrion, N.** (2012). Identification of Putative Potassium Channel Homologues in Pathogenic Protozoa. **PLoS ONE** **7**(2): e32264. doi:10.1371/journal.pone.0032264.
 15. **Prole D. y Taylor C.** (2013). Identification and Analysis of Putative Homologues of Mechanosensitive Channels in Pathogenic Protozoa. **PLoS ONE** **8**(6): e66068. doi:10.1371/journal.pone.0066068.
 16. **Quintana, E., Torres, Y., Alvarez, C., Rojas, M. y Camacho, M.** (2010). Changes in macrophage membrane properties during early *Leishmania amazonensis* infection differ from those observed during established infection and are partially explained by phagocytosis. **Experimental Parasitology** **124**: 258–264.
 17. **Reimão, J., Colombo, F., Pereira-Chioccola, V. y Tempone, A.** (2011). In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. **Experimental Parasitology** **128**: 111–115.
 18. **Russell, D., Xu, S. y Chakraborty, P.** (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **J. Cell Sci.** **103**(4): 1193–1210.
 19. **Scott, K., Stafford, J., Galvez, F., Belosevic, M. y Goss, G.** (2003). Plasma membrane depolarization reduces nitric oxide (NO) production in P388D.1 macrophage-like cells during *Leishmania major* infection. **Cellular Immunology** **222**: 58–68.
 20. **Serrano-Martín, X., Payares, G. y Mendoza-León, A.** (2006). Glibenclamida, a blocker of K^+_{ATP} channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** **4**: 72-76.
 21. **Serrano-Martín X., Zambrano-Arnone, A.R. y Romero, J.** (2012). Canales iónicos en *Leishmania* spp. como nuevos blancos terapéuticos. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **6**: 65-68.
 22. **Vieira, L. y Cabantchik, Z.** (1995). Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H^+ -pump generated membrane potential. **Molecular and Biochemical Parasitology** **75** (1): 15–23.
 23. **Vicente, R., Escalada, A., Coma, M., Fuster, G., Sánchez-Tilló, E., López-Iglesias, C., Soler, C., Celada, A. y Felipe, A.** (2003). Differential voltage-dependent K^+ channel responses during proliferation and activation in macrophages. **Journal of Biological Chemistry** **278**(47): 46307–46320.
 24. **Zambrano-Arnone A.R., Serrano-Martín, X. y Romero, J.** (2012). Mal de Chagas, una enfermedad con pocas posibilidades terapéuticas: Homeostasis iónica como blanco terapéutico para nuevos fármacos sobre *Trypanosoma cruzi*. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **6**: 69-72.

Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* usando subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela

IRENE ALVARADO, BLAS DORTA Y ROXANA GAJARDO

Laboratorio de Procesos Fermentativos, Centro de Biología Celular,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.
Correo-e: roxana.gajardo@ciens.ucv.ve

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram positiva capaz de formar un cristal paraesporal que contiene δ -endotoxinas, también llamadas proteínas Cry, las cuales son tóxicas para insectos. Por su efectividad y especificidad, *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) muestra efectos entomopatógenos sobre *Aedes aegypti*, vector principal del dengue, fiebre amarilla, fiebre chikungunya, entre otras enfermedades, tanto en Venezuela como en el mundo. Por esta razón, se hacen atractivas las investigaciones sobre las formulaciones y optimización de la producción de esta bacteria, como una estrategia de control biológico. Este trabajo tuvo como objetivo principal desarrollar un medio de cultivo a partir de subproductos agroindustriales (melaza y Concentrín 21[®]), que permitiera el crecimiento de *Bti*, y la obtención del complejo espora-cristal. Se obtuvieron títulos de esporas por el orden de 10⁸ esp/mL en los medios de cultivo donde se utilizó melaza y Concentrín 21[®]. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos en el control con el medio A80. Se concluye que la melaza como fuente de carbono y energía, y el Concentrín 21[®] como fuente de nitrógeno, pueden ser utilizados como constituyentes dentro de formulaciones para el crecimiento de *Bti*, ya que demostraron eficacia a través de la obtención de altos títulos bacterianos.

Introducción

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria esporogénica, Gram positiva y aerobia, que se ha usado como alternativa frente a los insecticidas químicos para el control de insectos plagas. Su patogenicidad radica en un cristal de proteínas, llamado también inclusión parasporal o δ -entodotoxina, que se forma durante la fase esporulativa de su ciclo de vida. Este microorganismo ejerce su efecto patógeno únicamente cuando su proteína tóxica es ingerida y disuelta por proteasas, a pH básicos, en el intestino de la larva del insecto blanco.

Dentro de las cepas de *Bt*, la variedad *israelensis* (*Bti*) se caracteriza por ser efectiva contra dípteros, entre ellos el culicido *Aedes aegypti* (6). Este vector se ha reportado como el transmisor de varias enfermedades que afectan a países de todo el mundo, entre ellas el dengue, la fiebre amarilla, la fiebre chikungunya y, en últimos reportes, el virus zika.

Las primeras aproximaciones en la evaluación de la efectividad que pueda tener una cepa de *Bti* sobre el díptero se llevan a cabo cultivando la bacteria en medios definidos, que garanticen la efectiva producción del cristal tóxico (1). Sin embargo, para la producción de bioinsecticidas a gran escala se debe implementar el uso de productos que sean de bajo costo y que tengan disponibilidad inmediata. Por esta

razón, los subproductos agroindustriales se convierten en la principal alternativa dentro de las formulaciones a nivel industrial.

En Venezuela son pocas las investigaciones llevadas a cabo en torno a *Bt*, incluyendo las de formulaciones con base en esta bacteria. En el Laboratorio de Procesos Fermentativos (IBE-UCV) se han desarrollado algunas aproximaciones, las cuales se han evaluado sobre *Bt* var. *kurstaki* (*Btk*) efectiva para combatir plagas de lepidópteros) (4, 9). No obstante, se necesitan estudios que estén dirigidos a las evaluaciones de formulaciones de medios de cultivos para el crecimiento de *Bti*. Los resultados podrían servir para el desarrollo de un bioinsecticida de producción nacional que permita el control de *Ae. aegypti* y así minimizar el impacto de las enfermedades que transmite. Por tanto, en este trabajo se propuso evaluar medios de cultivo formulados con subproductos agroindustriales, partiendo de los medios de referencia formulados por Brazón (4) y Peñalver (9), que permitan un alto rendimiento en la obtención del complejo espora-cristal de *Bti*.

Crecimiento de *Bt* en medio de referencia

La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* fue inoculada en el medio rico definido, A80, diseñado por Arcas y col. (1) para el crecimiento bacteriano y la producción del cristal de *Bti*

(Composición g/L: $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$: 1; K_2HPO_4 : 1; KH_2PO_4 : 1; extracto de levadura: 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0.03; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.04; glucosa: 5). La velocidad de agitación fue de 250 rpm, para evitar limitación por aireación, y la temperatura se ajustó a 30° C. Se realizaron diluciones seriadas y siembras del cultivo durante las primeras 8 h, cada hora, y luego a las 24, 48 y 72 h, con la finalidad de realizar la cinética del crecimiento de la bacteria. En cada evaluación también se hizo un tratamiento térmico de las diluciones (80°C durante 10 min seguidos de 5 min en hielo) (7) con la finalidad de llevar a cabo la cinética de las esporas.

Crecimiento de Bt en medios con subproductos

Se utilizaron medios formulados a partir de melaza (jarabe obtenido del jugo de caña) y Concentrín 21[®] (mezcla deshidratada de agua de maceración de maíz y germen desgrasado de maíz) para evaluar el crecimiento bacteriano y la producción del cristal paraesporal de *Bti*. Las sales corresponden a las usadas en el medio A80, en las mismas cantidades. Se usaron 10 g de Concentrín 21[®] y 5 g de melaza, en todos los casos (Tabla 1). Para llevar a cabo la cinética del crecimiento de *Bti* y la cinética de las esporas, se realizó el mismo procedimiento explicado en la sección anterior.

Tabla 1. Componentes de Medios de Cultivo con subproductos Agroindustriales

Constituyentes	Medios			
	MC1	MC2	MC3	MC4
Concentrín 21 [®]	+	+	+	+
Melaza	-	+	-	+
Sales	+	-	-	+

+: presencia. -: ausencia

Resultados

Cinética del crecimiento de Bti.

El conocimiento básico relacionado con los requerimientos nutricionales de *Bt* es el paso inicial en el proceso de optimización de un medio de cultivo con propósitos de escalamiento. En este trabajo, se considera que el conteo de esporas es un método indirecto de conteo de cristales, pero se recomienda la realización de bioensayos que corroboren la actividad tóxica de *Bti*, crecida en estos medios desarrollados con subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad.

En la producción de *Bti* utilizando el medio de control A80, se obtuvo la curva de crecimiento representadas en la Figura 1.

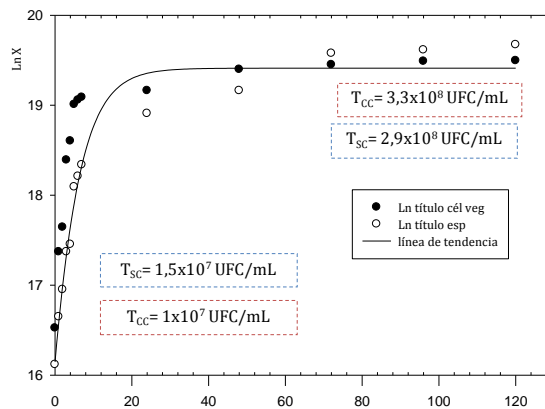


Figura 1. Curva de crecimiento de *Bti* en medio de cultivo control A80. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○). T_{sc}: Título sin choque térmico. T_{cc}: Título con choque térmico.

Una vez que se ha inoculado el A80, comenzó el desarrollo de la fase exponencial de crecimiento de *Bti*, evidenciada durante las primeras 7 horas de evaluación. No hubo fase de latencia, debido a que el cultivo se partió de un preinóculo hecho en el mismo A80. Durante las primeras horas de incubación, los nutrientes que componen el medio se encuentran en altas proporciones, contribuyendo de forma exponencial al crecimiento de *Bti*. Al transcurrir las 48 horas, se alcanzó la fase estacionaria, debida al agotamiento de los nutrientes del medio provocando una disminución de las células vegetativas y, de forma proporcional, un aumento de las esporas y presuntivamente, un aumento en el conteo del cristal paraesporal; es por ello que no se observó una fase de muerte. Es de destacar que a las 96 horas se alcanzó la lisis total como lo señalan (10). Los resultados obtenidos indicaron que se obtuvieron altos títulos de células vegetativas y al final altos títulos de esporas. Estos valores son similares a los obtenidos por (4) cuando realizó una curva de crecimiento en este mismo medio, usando como microorganismo modelo a *Btk*.

En cuanto a los parámetros cinéticos, calculados a partir de la ecuación de la recta en la fase exponencial, también se obtuvieron resultados parecidos a los reportados por Porcas y Juárez (4). La velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de *Bti* en A80 fue igual a 0,58 h⁻¹, comparado con la $\mu_{\text{máx}}$ de 0,67 h⁻¹ obtenido por Brazón (4). Esta pequeña diferencia podría estar asociada a que la $\mu_{\text{máx}}$ depende principalmente del microorganismo y del tipo de medio de cultivo donde se permita su crecimiento (3). Por su parte, el tiempo generacional (Tg) fue calculado a partir del valor de $\mu_{\text{máx}}$. El Tg es un parámetro útil para el conocimiento de las condiciones fisiológicas de la población celular así como también, es un indicador de efectos positivos o

negativos de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano (5). Se ha reportado que en general *Bt* posee un Tg entre 30-90 minutos, dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentre (11). En este trabajo, se obtuvieron duplicaciones de la población en 1,2 h, lo que se asemeja al Tg igual a 1,04 h, obtenido por Brazón (4). En otras investigaciones, donde *Bti* fue crecida en medio LB, se reportaron valores de Tg alrededor de 3,6 h (2, 8). Posiblemente, estas discrepancias se deben a que el medio LB no contiene una fuente de C y energía de fácil disponibilidad y además no posee las sales necesarias para el óptimo desarrollo de las variedades de *Bt*.

Por su parte, la curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC1 se presenta en la Figura 2.

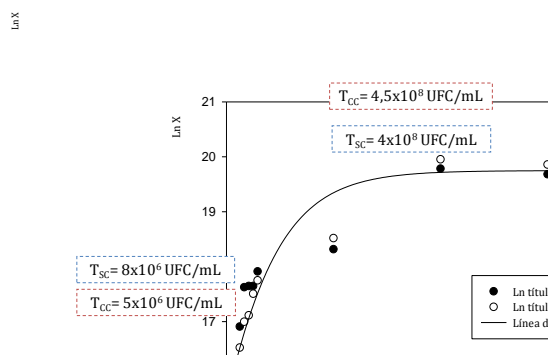


Figura 2. Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC1 compuesto por Concentrín 21® y sales. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○). T_{SC}: Título sin choque térmico. T_{CC}: Título con choque térmico.

Se puede observar que durante las primeras horas de evaluación, se distinguió un aumento exponencial en los títulos bacterianos. Este incremento se mantiene hasta las 48 horas, y la diferencia entre la población inicial y la final es de 380 veces. A partir de este punto, se observó la fase estacionaria en el crecimiento y la concentración de células se mantiene en el mismo orden hasta alcanzar las 96 horas (4×10^8 cél/mL). Este mismo comportamiento se observó al aplicar el tratamiento térmico. Peñalver (9) obtuvo un título bacteriano igual a 4×10^8 esp/mL en el medio 4, compuesto por Concentrín 21® y sales definidas, lo cual coincide con los valores obtenidos en este trabajo.

Lo anterior demuestra que MC1 puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de *Bti*. Es necesario destacar que el Concentrín 21®, añadido a este medio, no sólo actúa como fuente de nitrógeno sino también como fuente de carbono y energía, porque en su composición hay presencia de carbohidratos, y este exceso lo pudieran aprovechar las células para aumentar su crecimiento. La producción del cristal parasporal depende también de

las sales, que están presentes de manera definida en este medio. El valor de $\mu_{\text{máx}}$ en MC1 fue igual a $0,7044 \text{ h}^{-1}$, con un Tg igual a 1 h. Estos valores son mayores, aunque en el mismo orden de magnitud, a los obtenidos en el medio A80.

El crecimiento de *Bti* en el medio MC2 se muestra en la Figura 3.

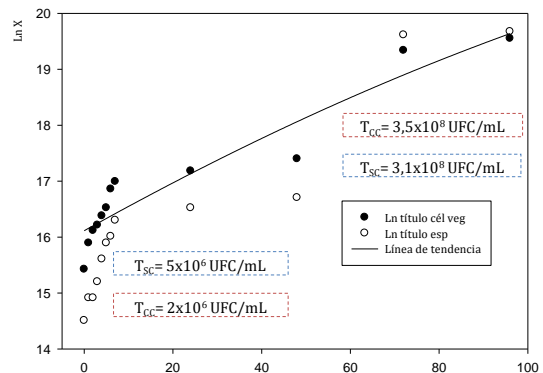


Figura 3. Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC2 compuesto por Concentrín 21® y melaza. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○). T_{SC}: Título sin choque térmico. T_{CC}: Título con choque térmico.

Al evaluar este medio, se observó un crecimiento más lento en la fase exponencial, respecto a los medios anteriores. Luego, a las 96 horas, los títulos fueron de $3,1 \times 10^8$ cél/mL sin choque térmico, y un título igual a $3,5 \times 10^8$ esp/mL, aplicando choque térmico. Estos títulos finales alcanzaron el mismo orden de magnitud que los títulos en el A80. En cuanto a los parámetros cinéticos, los mismos expresaron una $\mu_{\text{máx}}$ igual a $0,2013 \text{ h}^{-1}$ y un Tg igual a 3,4 h, es decir, tres veces mayores a los obtenidos en los medios MC1 y A80. Posiblemente, esta diferencia se debió a que en MC2 no se suministró una fuente de sales y por esta razón haya disminuido la tasa metabólica de la bacteria.

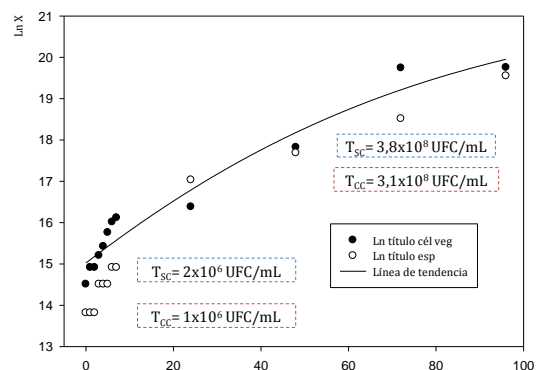


Figura 4. Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC3 compuesto únicamente por Concentrín 21® Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○). T_{SC}: Título sin choque térmico. T_{CC}: Título con choque térmico.

En cuanto al desarrollo de *Bti* en el medio MC3, éste arrojó como resultado un crecimiento más rápido

al observado en MC2, pero más lentos que MC1 y A80 (Figura 4). A las 72 horas, el título fue 190 veces mayor que el obtenido a las 24 horas, sin aplicar choque térmico. Lo mismo ocurre cuando es sometido a choque térmico, obteniendo un valor a las 96 horas, un poco menor al obtenido en MC1, MC2 y A80, pero en el mismo orden de magnitud. Peñalver (9) obtuvo un título igual a $3,1 \times 10^8$ esp/mL utilizando el medio 5, compuesto únicamente por Concentrín 21[®], siendo igual al título obtenido en el medio MC3, en este trabajo. Quizás este resultado sea debido a que al agotarse los carbohidratos que provee el Concentrín 21[®], este suplemento se convirtió en recurso limitante. En cuanto a los parámetros cinéticos, se obtuvieron valores de $\mu_{\text{máx}}$ y Tg similares a los obtenidos en el medio MC2.

En MC4 el crecimiento tuvo el comportamiento señalado en la Figura 5.

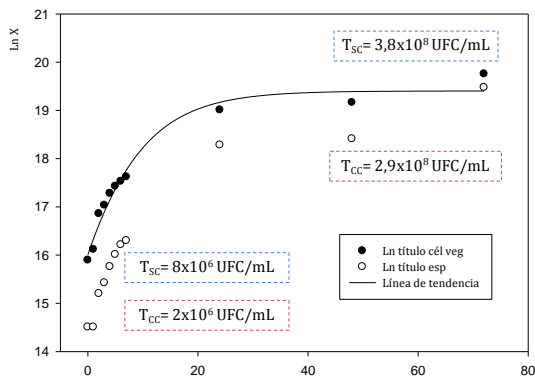


Figura 5. Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC4 compuesto por Concentrín 21[®], melaza y sales. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando choque térmico (○). Tsc: título sin aplicar choque térmico. Tcc: Título con choque térmico

Se obtuvo como resultado un mayor número de células en la fase exponencial respecto a los medios MC2 y MC3. A las 72 horas de inoculación, se obtuvo un título igual a $3,8 \times 10^8$ cél/mL, sin choque térmico, y con choque térmico fue de $2,9 \times 10^8$ esp/mL. Se puede observar que están cercanos al título obtenido en el medio A80, por lo que podría estimarse que es un buen medio de cultivo para *Bti*, ya que suministra los componentes y cantidades necesarias para su crecimiento y formación del cristal paraesporal. Se destaca un crecimiento óptimo por la presencia de fuente de carbono suministrada por la melaza; fuente de nitrógeno, suministrada por Concentrín 21[®] y fuente de sales, que garanticen la formación del cristal tóxico, proporcionadas por las sales definidas del medio A80.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Naileth Méndez del Laboratorio de Biología Molecular, Postgrado de

Fitopatología, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Edo. Lara, por la donación de la cepa de *Bti*.

Referencias

1. Arcas, J., Yantorno, O., Ertola, R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis*. *Cultures. Biotechnol. Lett.* **9:105-110**.
2. Berdugo, C., Zamora, A. (1995). Estudio preliminar de diseño de un medio de cultivo para la síntesis de Delta-endotoxina. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia.
3. Beltrán, L., Díaz, S., Verdugo, C., Zamora, A., Buitrago, G., Moreno, N. (2002). Culture media design for fermentation of *Bacillus thuringiensis*. <http://www.ibon.una1.edu.co/rr21.html>. [Consultado 14 de Abril 2016].
4. Brazón, J. (1998). Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* con base en subproductos agroindustriales de bajo costo. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
5. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). Brock: Biología de los microorganismos (10^a Ed). Pearson Education.
6. Ochoa, G., Arrivillaga, J. (2009). *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol. Mal. Salud. Amb.* **48: 121-126**.
7. Organización Mundial de la Salud (OMS). (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO/ Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. TRD/BCV/90.1., Geneva, pp. 1-58.
8. Pearson, D., Ward, O. (1983). Effect of culture condition on growth and sporulation of *B.t.* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotech. Lett.* **10: 451-456**.
9. Peñalver, C. (2005). Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
10. Porcar, M., Juárez, V. (2004). Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. Capítulo 6: 151-176. En: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A., Cerón, J. (Eds). Bogotá, Colombia.
11. Soberón, M., Bravo, A. (2000). *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. *Microbios*. Disponible: <http://biblioweb.mx/microbios/Cap12>.

Marcadores moleculares en *Kinetoplastida*: Variabilidad genotípica y fenotípica

ROBERTO GARCÍA-ALZATE^{1,2}, DAISY LOZANO-ARIAS^{1,2},
RAFAEL MATÍAS REYES-LUGO³, ORLANA LANDER^{1,3},

ANTONIO MOROCOIMA⁴, LEIDI HERRERA² Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN¹

¹Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos. IBE; ²Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), Facultad de Ciencias; ³Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela (UCV). ⁴Instituto de Medicina Tropical (IMT-UDO), Universidad de Oriente. Puerto la Cruz, Estado Anzoátegui. Venezuela. Correo-e: amendoza50@gmail.com

La identificación de marcadores moleculares específicos, fenotípicos o genotípicos, de un parásito, constituye una herramienta apropiada para utilizarla en identificación, diagnóstico y epidemiología. *Triatoma maculata*, vector del *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, ha sido considerado una especie silvestre propia de palmas, árboles secos, cercas y nidos de aves. La variabilidad genética y la variación intraespecífica de esta especie pueden ser fundamentales en el control y vigilancia vectorial. Adultos de *T. maculata*, un total de 492 individuos, fueron capturados en el período 2012–2013 en áreas domésticas, peri-domésticas, y silvestres de diferentes regiones endémicas de Venezuela. Estos ejemplares fueron sometidos a evaluación comparativa de la variabilidad fenotípica alar y de marcadores genotípicos como el gen *mtCytb* y la región de los genes de β -tubulina. Los resultados revelan que insectos capturados en el hábitat doméstico mostraron una significativa reducción en el tamaño de alas y un marcado polimorfismo para los marcadores estudiados, en comparación con aquellos insectos capturados en el peri-domicilio o en su hábitat silvestre. En términos epidemiológicos, los resultados confirman la sugerencia previa de domiciliación de *T. maculata*. Tal domiciliación asociada a la presencia de ninfas del vector en el domicilio, representa un alto riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Introducción

Los triatominos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) son insectos hematófagos estrictos, que actúan como vectores de tripanosomatídeos tales como *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Tripanosomosis Americana o Enfermedad de Chagas (ECh), una de las parasitosis de gran importancia médica en el Neotrópico. En Venezuela, la ECh constituye un problema de salud pública (1,8).

Tanto en Venezuela como en otros países de Sur América, la transmisión vectorial de *T. cruzi* ha sido asociada tradicionalmente a los ambientes domésticos (D) y peridomésticos (PD) de áreas rurales, con condiciones socioeconómicas precarias y con elevada presencia de vectores. Sin embargo, han aumentado las evidencias de colonización del domicilio urbano por triatominos, tales como *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus*, que hasta ahora habían sido asociados mayormente a hábitats silvestres (S) (7).

La domiciliación de los triatominos pudiese ser un evento adaptativo, que algunas veces puede llevar a la simplificación de características fenotípicas y genotípicas producto de variaciones en el microclima o reducción de mamíferos silvestres que sirven como fuente de alimentación, entre otros factores. El uso combinado de métodos fenotípicos

tales como el análisis de morfometría geométrica, y genotípico como el análisis del polimorfismo genético de marcadores moleculares, es de gran utilidad en la evaluación de poblaciones de vectores relacionados con la enfermedad de Chagas y en el establecimiento de intervenciones apropiadas para el control de la parasitosis.

En este trabajo se evalúa la dispersión del vector *T. maculata* a lo largo de ecótopos S, PD y D, en varias zonas endémicas de distintos estados de Venezuela, utilizando enfoques tanto fenotípicos como genotípicos. La variabilidad fenotípica de los ejemplares colectados se determinó mediante un estudio de morfometría geométrica del ala, utilizando los programas Tps-Dig2, MorphoJ y PAST, mientras que el polimorfismo de los marcadores molecular Cyt b y la región de los genes de β -tubulina se utilizó para establecer la variabilidad genotípica.

Variabilidad fenotípica en *T. maculata*. El estudio se basó en la determinación de los cambios en el tamaño y la forma de las alas a partir del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de puntos anatómicos de referencia (PAR), basados en el uso de coordenadas sobre un sistema de dos o tres ejes perpendiculares (2).

De 492 especímenes de *T. maculata* estudiados, 49,2% fueron machos (M) y 50,8% hembras (H); 20,73% del total fueron positivos a *T. cruzi* de acuerdo a ensayos de PCR utilizando mini-exón. Los insectos se colectaron en seis estados venezolanos (centrales, orientales y occidentales) con una distribución de ecótopos de 26% D, 67% PD y 7% S.

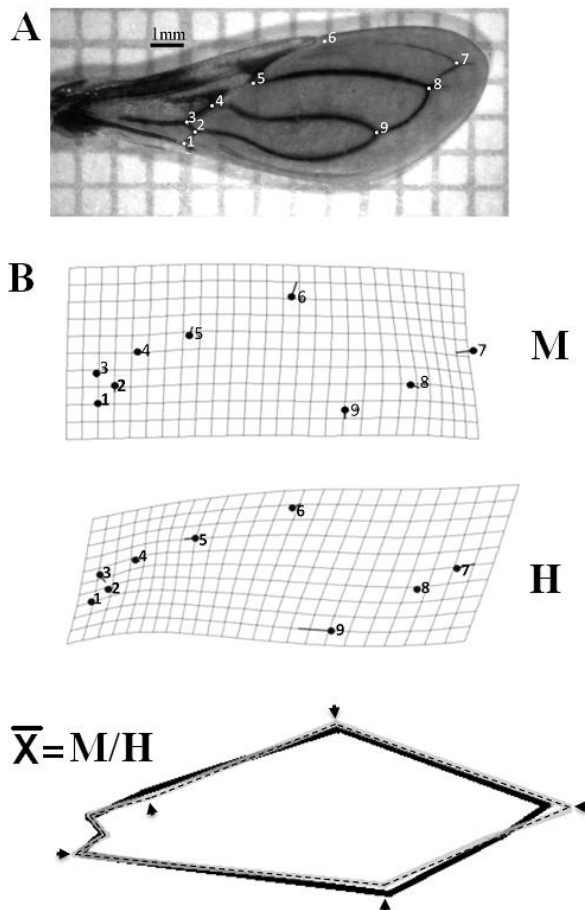


Figura 1. Diferencias en la forma del ala entre machos y hembras de *Triatoma maculata* de áreas endémicas de Venezuela. (A) PAR identificados en el ala de *T. maculata*. La numeración de los puntos (PAR1–9) está referido al arreglo de coordenadas usando el programa *tps Dig 2.0*. (B) Diferencias en la arquitectura alar de *T. maculata*. Diferencias entre machos (M) y hembras (H) de *T. maculata* están representadas por la deformación de las rejillas y la variación entre los PAR homólogos (círculos). La superposición del consenso entre las diferencias en la forma del ala de M (línea sólida) y H (línea discontinua), son representadas por

incongruencia entre hitos homólogos (flechas solidas) (4,5).

El tamaño promedio de la región de la membrana del ala fue de 1,984 mm para F y 1,786 mm para el M. Las diferencias en la conformación, sobre la base de la deformación de rejillas hechas por análisis discriminante, reveló que el M tiene un menor grado de variación en comparación con la H, lo cual es indicativo de un dimorfismo sexual (Fig. 1B).

La conformación de la arquitectura alar basado en la variación del tamaño del centroide (CS) en cada ecótopo (Fig. 2) pone en evidencia una asociación entre insectos del PD y S, sin diferencia significativa entre ellos ($p = 0,0392$ para PD y $p = 0,0382$ para S), mientras que diferencias significativas ($p = 0,0051$) se observaron cuando la comparación se realizó entre especímenes de los ecótopos PD y S con insectos capturados en el ecótopos D, independientemente de su sexo (Fig. 2).

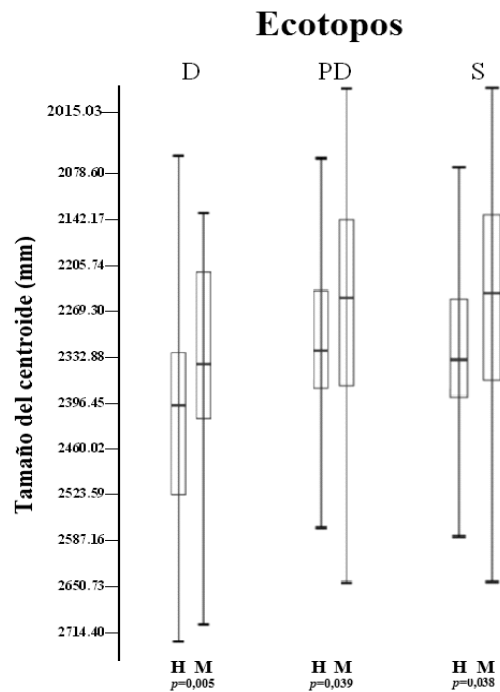


Figura 2. Variación del tamaño del centroide (CS) entre ecótopos y sexo de *Triatoma maculata* provenientes del centro-oriente-occidente de Venezuela. Las cuadros muestran las diferencias de tamaño isométrico de alas entre ecótopos (D; PD; y S) y sexo (H y M), de diferentes estados y localidades. Cada cuadro muestra la media (línea horizontal dentro de la caja), desviación estándar (línea vertical). Distribución en ecótopos de M: 242 (D: 29;

PD: 172; y S: 43) y H: 250 (D: 24; PD: 158; y S: 63). p: diferencias estadísticas significativas (4,5).

La variación en el tamaño y conformación de las alas, permitió la agrupación de los ejemplares de *T. maculata* por regiones (estados centrales, orientales y occidentales), además de establecer diferencias entre los distintos ecótopos (Fig. 3). Los resultados mostraron grupos de M y H de *T. maculata* capturados en ecótopos S y PD en Anzoátegui, Monagas y Portuguesa. Interesante, una mayor variación en la tendencia de consenso se encontró para ambos sexos en los especímenes capturados en ecótopos D de Anzoátegui y Monagas (Fig. 3, los cuadrados a y b) (4,5).

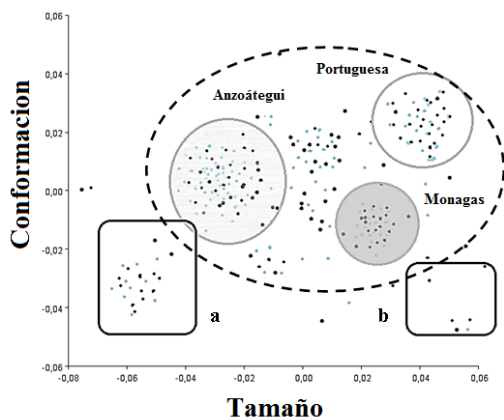


Figura 3. Variabilidad fenotípica de *Triatoma maculata*. Diagrama factorial de los componentes principales de la arquitectura alar de *T. maculata*. El tamaño y conformación hacen la mayor contribución (70%) a la variabilidad alar. El círculo en guiones (--) representa el grupo estándar, mientras que el continuo (-) representan las agrupaciones por regiones con elipses de confianza (>95%) para especímenes M (puntos negros) y F (puntos grises) de los estados Anzoátegui, Portuguesa y Monagas. Los cuadros a y b, representan la agrupación de los ejemplares M y F que mostraron las mayores diferencias en la arquitectura alar en comparación con la configuración de consenso, representando ejemplares del D (4,5).

El hecho de haber encontrado huevos y ninfas en los ambientes domiciliarios, y la alta incidencia de infección por *T. cruzi* de triatomíneos adultos, corroboró su capacidad de domiciliación, lo que podría considerarse un factor de riesgo epidemiológico, en especial para los estados Anzoátegui y Monagas. La disponibilidad de fuente de alimento, la poca delimitación natural de los ecótopos D, PD y S en algunos ambientes, la menor presencia de depredadores y las características propias de las viviendas, favorecerían el desplazamiento de los vectores desde los ecótopos PD y S al D, permitiendo así el establecimiento de la especie vector (2,5,6).

Variabilidad genética en *T. maculata*. A objeto de establecer la posible domiciliación de *T. maculata*, se evaluó comparativamente la variabilidad de marcadores genotípicos como el espaciador del gen del citocromo b (*Cyt-b*) y la región de los genes de β -tubulina, de subpoblaciones del vector que habitan en distintos ecótopos en la región oriental de Venezuela.

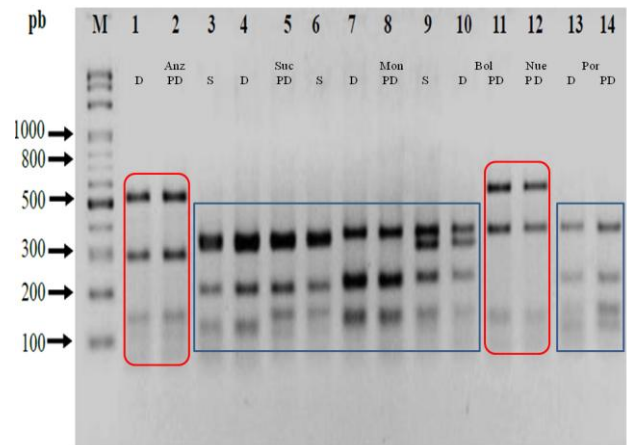


Figura 4. PCR/RFLP del gen *Cyt-b* de *T. maculata* en diferentes estados y ecótopos de Venezuela. Productos de PCR fueron digeridos simultáneamente con *KpnI/XhoI* y los fragmentos separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. (M) marcador DNA 100 pb (GIBCO BRL). (1-3) Anzoátegui; (4-6) Sucre; (7-9) Monagas; (10-11) Bolívar; (12) Nueva Esparta-PD; (13-14) Portuguesa, D: Domicilio; PD: Peridomicilio; S: Silvestre (3,4).

La amplificación de *Cyt-b* de *T. maculata*, generó un producto de ~600 pb. El análisis de PCR-RFLP, con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*, permitió una descripción parcial de algunos índices de variabilidad genética, identificando dos patrones de

bandas (rojo y azul), y claras diferencias en los perfiles asociados a los distintos estados en relación a ecótopos particulares (Fig. 4) (3,4).

Igualmente, el patrón de bandeo PCR-RFPLs, generado por la acción de las enzimas *BamHI/KpnI* en un segundo marcador, el gen de la β -tubulina, sugirió variabilidad de la especie *T. maculata* en relación al ecótopo y/o del estado (4,5). Los estados Monagas y Anzoátegui mostraron mayores diferencias en cuanto al patrón de bandeo por ecótopos. El análisis de estos con el programa Gel Compar II (Versión 5.1.), utilizando criterios de Máxima Parsimonia, Máxima y Mínima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, reveló una topología característica para ejemplares de cada estado. Sin embargo, las muestras de Anzoátegui y Monagas revelaron agrupamientos similares en los perfiles genéticos, donde ejemplares de los ecótopos S y PD tienen similitud de agrupamiento que difiere de la agrupación de los ejemplares D.

Conclusiones

Los estudios de variabilidad fenotípica y genotípica en *T. maculata* mostrados en este estudio sugieren:

- diferencias significativas en la arquitectura alar (variabilidad fenotípica), encontrándose una reducción del tamaño alar en ejemplares domiciliados.
- la variabilidad genotípica encontrada mostró asociación con la variabilidad fenotípica.
- una adaptación al domicilio por parte *T. maculata*.

Se demuestran, mediante técnicas fenotípicas y genotípicas, procesos de adaptación de *T. maculata* a cada ecótopo (D, PD y S), lo cual aunado a la presencia de estadios ninfales en el intradomicilio con positividad a *T. cruzi*, sugiere un aumento en el riesgo en la transmisión de la ECh en Venezuela.

Agradecimientos

Financiamiento: CDCH: CDCH PG 038171-2011/1 (L. Herrera) y PG-03-8121-2011/1 (A. Mendoza-León). Proyecto estratégico FONACIT N° 2011000470; Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911-6. A mis estudiantes, colegas y colaboradores por sus aportes en el desarrollo de esta línea de investigación.

Referencias

1. **Añez, N., Crisante, G. y Rojas, A.** (2004). Update on Chagas disease in Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **99**: 781–787. doi: 10.1590/S0074-02762004000800001

2. **Dujardin, J.P., Beard, C.B. y Ryckman, R.** (2007). The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. **Infect Genet Evol.** **7**: 161–167. doi:10.1016/j.meegid.2006.07.005

3. **García-Alzate, R., Lozano-Arias, D., Morocoima, A., Mendoza-León, A. y Herrera, L.** (2013). Variabilidad genética y fenotípica de *Triatoma maculata*, vector del *Trypanosoma cruzi*, como indicador de procesos de domiciliación en Venezuela. **XXXII Jornadas “José Witremundo Torrealba”.** Soc. Parasitológica Venezolana. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

4. **García-Alzate, R.J.** (2015). Variabilidad genética y fenotípica de *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae) vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela. **Tesis Doctoral.** Post Grado en Biología Celular, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

5. **García-Alzate, R., Lozano-Arias, D., Reyes-Lugo, R.M., Morocoima, A., Herrera, L. y Mendoza-León, A.** (2014). *Triatomamaculata*, the vector of *Trypanosoma cruzi*, in Venezuela. Phenotypic and genotypic variability as potential indicator of vector displacement into the domestic habitat. **Front. Public Health** **2**: 170. doi: 10.3389/fpubh.2014.00170

6. **Morocoima, A., Chique, J., Zavala-Jaspe, R., Díaz-Bello, Z., Ferrer, E., Urdaneta-Morales, S. et al.** (2010). Commercial coconut palms an ecotope of Chagas disease vectors in north-eastern Venezuela. **J. Vector Borne Dis.** **47**: 76–84. <http://www.mrcindia.org/journal/issues/472076>.

7. **Rojas, M., Várquez, P., Villarreal, M., Velandia, C., Vergara, L., Morán, Y. et al.** (2008). Estudios ecoepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro- occidente de Venezuela. **Cad. Saude Pub.** **24**: 2323–2333. doi:10.1590/S0102-311X2008001000013

8. **World Health Organization.** (2014). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet N°340 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

Potenciales blancos de drogas en Kinetoplastidas. Modelaje y dinámica molecular de la 6PGDH

MARÍA LUISA SERRANO¹, MARIANA GRATEROL¹ Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN²

¹Unidad de Química Medicinal, Facultad de Farmacia;

²Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos.

Universidad Central de Venezuela.

Correo-e: amendoza50@gmail.com

El tratamiento de la leishmaniasis consiste en la administración de antimoniales como Pentostan y Glucantime, aunque se ha demostrado su toxicidad y el desarrollo de resistencia por parte de *Leishmania* sp. La búsqueda y evaluación de drogas alternativas, así como la de nuevos blancos terapéuticos, es de vital importancia para el tratamiento y control de la enfermedad. Como blancos alternativos de drogas hemos evaluado enzimas relacionados con la ruta de las Pentosas Fosfato (PPP) de *Leishmania* sp., como la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), dada su importancia en la producción de poder reductor y la necesidad de éste cofactor en la eliminación de iones de oxígeno a través del sistema de la tripanotiónina. Estudios comparativos del modelo estructural 3D obtenido para esta proteína, al igual que estudios de Dinámica Molecular, revelan: diferencias importantes en la estructura dimérica de la 6PGDH relacionada con la ausencia de algunos puentes salinos presentes en la enzima de *T. brucei*.

Introducción

El Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos ha estado interesado en el estudio de los posibles mecanismos genéticos y bioquímicos involucrados en el fenómeno de resistencia a drogas en *Leishmania* sp., al igual que la identificación de nuevos blancos terapéuticos (1,2). En este trabajo mostramos el potencial del modelado y dinámica molecular en la predicción estructural de proteínas como la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), una enzima de la vía de las Pentosas Fosfato (PPP),

Potenciales blancos de droga en *Leishmania* sp.: La 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). La vía metabólica de las pentosas fosfato (PPP) es de vital importancia para un organismo como fuente de poder reductor, el cual juega un papel importante en kinetoplastidas en la protección contra el estrés oxidativo a través del sistema de la tripanotiónina. La 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) es la tercera enzima de la vía oxidativa de la PPP. Una vez identificado y secuenciado el gen para *L. (L.) mexicana*, la estructura 3D de la proteína se generó a través del programa SWISS-MODEL utilizando como plantilla la estructura cristalina de la enzima de *T. brucei* (PDB 1PGJ cadenas A y B), la cual muestra un alto grado de homología. La proteína es un homodímero y el modelo obtenido (Fig. 1) fue comparable con aquellas estructuras de la misma proteína reportadas para *T. cruzi*, *T. brucei* (PDB 1PGJ), *Lactococcus lactis* (PDB 2IYP) y *Ovis aries* (PDB 2PGD) (3,4). La forma activa de la enzima 6PGDH se ha descrito como un dímero y aunque la estructura entre distintos organismos es bien conservada, la

enzima de *Leishmania* muestra diferencias importantes relacionadas con la interacción de las subunidades monoméricas en la formación de los puentes salinos (3,4). El dímero de la 6PGDH de *Leishmania* presenta 3 puentes salinos respecto a 5 de la enzima de *T. brucei* (Fig. 2).

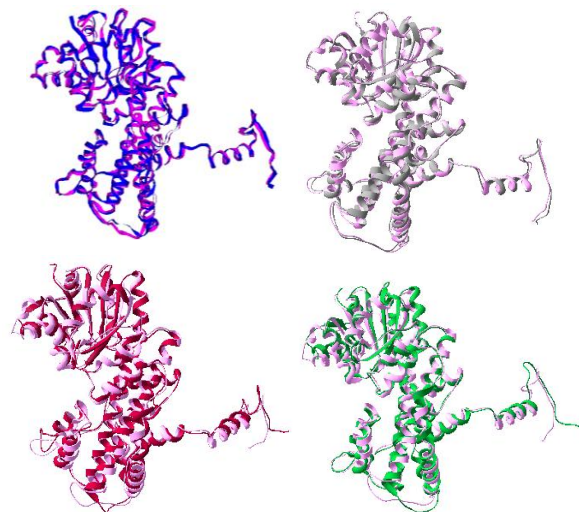


Figura 1. Superposición del modelo molecular del monómero de la 6PGDH de *L. (L.) mexicana* (morado) con los monómeros de la enzima de A. *T. brucei* (1PGJ) (azul) B. *T. cruzi* (gris); C. *L. lactis* (código PDB: 2IYP) (rojo) y D. *O. aries* (código PDB: 2PGD) (verde). La estructura de *T. cruzi* fue modelada en este trabajo usando SWISS-MODEL.

A objeto de corroborar el modelo previamente establecido para la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi* y de estudiar el comportamiento de los pares

iónicos inter sub-unidades de la forma activa de la enzima, se realizó un estudio comparativo de Dinámica Molecular de las enzimas nativas. Un estudio de mutagénesis *in silico* permitió verificar el efecto de restituir los pares iónicos faltantes en la enzima nativa de Lm6-PGDH en comparación con Tc6-PGDH; se realizaron las siguientes mutaciones *in silico*: en *Leishmania* $^{477}A \rightarrow ^{477}E$ para restituir el par iónico 2 y en *T. cruzi* $^{259}C \rightarrow ^{259}R$ y $^{246}V \rightarrow ^{246}D$ para restituir los pares iónicos 3 y 4, respectivamente. La DM se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos, los cuales incluyen las etapas de preparación, calentamiento, pre-equilibrio y producción. El análisis de la etapa de producción permitió validar todos los modelos estructurales en relación a la estabilidad de las mismas, plegamiento de la estructura de las proteínas y la validación geométrica y energética.

Un detalle del sitio activo de la enzima (Fig. 2), muestra la ubicación de los puentes salinos (puentes 1, 3, 4 y 5) en Lm6PGDH y puede observarse claramente la ausencia, en esta estructura, del puente 2 en la entrada de la cavidad del sitio activo.

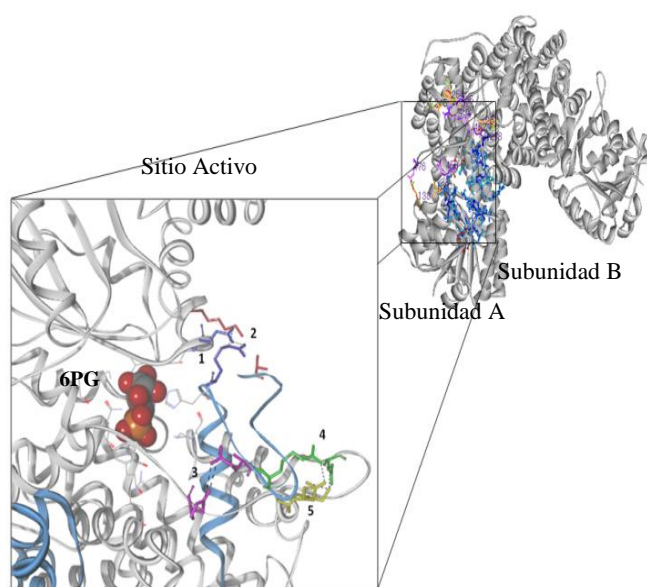


Figura 2. Modelo estructural de la enzima 6PGDH de *L. (L.) mexicana*. En la ampliación se muestra la ubicación espacial de los puentes salinos y la cavidad del sitio activo. Los pares de residuos formando puentes salinos están numerados de acuerdo a la secuencia de la enzima de *T. brucei* y se indican en colores azul (puente 1), fucsia (puente 3), verde (puente 4) y amarillo (puente 5), respectivamente. En color rojo se observa la ausencia en esta estructura del puente 2.

En la Figura 3 se muestra para cada una de las enzimas Tb6-PGDH (azul), Lm6-PGDH (rojo) y Tc6-PGDH (verde) los valores obtenidos de r (distancia entre los aminoácidos) para cada par iónico durante el tiempo de la simulación de Dinámica Molecular. Tal como se observa en la gráfica que corresponde a la simulación de las proteínas nativas, la ausencia del puente 2 en la estructura de Lm6-PGDH genera una fuerte perturbación a los puentes 3 y 4, aumentando la distancia entre los aminoácidos hasta superar los 8 Å, donde ya el puente salino realmente es inexistente (5). Esto se atribuye a la ubicación espacial del puente 2, justo a la entrada de la cavidad del sitio activo. Las perturbaciones observadas en los puentes se traducen en un aumento en el volumen de la cavidad del sitio activo. Por el contrario en la estructura de Tc6-PGDH (verde) la ausencia de los puentes 3 y 4, no provoca mayor perturbación en los puentes restantes.

El análisis de Dinámica Molecular, previamente restituyendo la condición patrón de *T. brucei* (cinco puentes salinos) a través de mutaciones *in silico*, permite observar claramente como se restablecen las distancias, no solamente del puente 2, sino también de los puentes 3 y 4 (Tabla 1 y Figura 3) a la distancia de los puentes que se observa en la estructura cristalina de Tb6-PGDH, que corresponde a la de puentes salinos formales de 3,5-4 Å.

Tabla 1. Parea iónicos inter sub-unidades presente en las enzimas nativas Tb6-PGDH, Lm6-PGDH, Tc6-PGDH y sus respectivas enzimas mutadas.

Par iónico	Tb6-PGDH	Lm6-PGDH	Tc6-PGDH	Lm*6-PGDH	Tc**6-PGDH
1	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134
2	E477-K139	-	E477-K139	E477-K139 [#]	E477-K139
3	E463-R259	E463-R259	-	E463-R259	E463-R259 [#]
4	R464-D246	R464-E246	-	R464-E246	R464-D246 [#]
5	D466-H255	D466-K255	D466-H255	D466-K255	D466-H255

- No hay par iónico.

[#] Par iónico restituido por mutagénesis *in silico*.

La 6-PGDH es un dímero, que se mantiene unido a través de interacciones electrostáticas (puentes salinos) entre los tallos de cada monómero. Los resultados de las simulaciones nos permiten explicar, como la perturbación observada en la estructura cuaternaria de la enzima de *L. (L.) mexicana* sería la responsable de la inestabilidad cinética de esta enzima, así como de su la afinidad diferencial a ciertos inhibidores.

La estructura molecular 3D de la 6PGDH de *L. (L.) mexicana* ha sido obtenida, mostrando características típicas de una estructura nativa, con diferencias respecto a la estructura de *T. brucei* en los grupos de amino ácidos relacionados con la formación de la forma dimérica activa de la enzima.

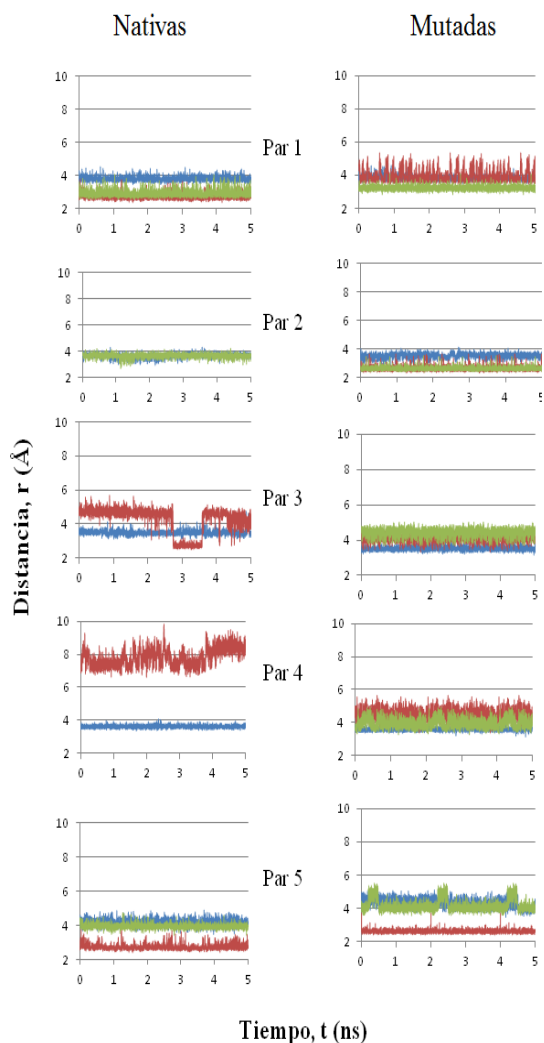


Figura 3. Distancia entre centroides de los amino ácidos que forman los puentes salinos (r , en Å) en función del tiempo (tns: en nano segundos) de Tb6-PGDH (azul), Lm6-PGDH (rojo) y Tc6-PGDH (verde) para las enzimas nativas y mutadas.

En las últimas dos décadas el tamizado virtual de librerías ha jugado un papel preponderante en el descubrimiento de moléculas inhibitoras de proteínas que son blancos terapéuticos. En el área farmacéutica, es considerada la herramienta más importante del CADD (Computer Aided Drug Design) que permite barrer grandes librerías de compuestos y reducirlos a un conjunto clave de compuestos, o hits, que se consideran candidatos a fármacos respecto a un

blanco específico. La 6-PGDH se considera blanco específico y selectivo porque su función enzimática resulta esencial para la viabilidad del parásito, y difiere lo suficiente de la del hospedador mamífero (< 35% de identidad de secuencia de AA), para prevenir cualquier reactividad cruzada o interacción que pudiera resultar adversa. Como resultado de las simulaciones de DM se cuenta con un modelo 3D optimizado para esta enzima y ha sido posible iniciar un estudio de tamizado virtual, empleando *Docking* molecular, con el propósito de seleccionar entre una amplia librería de compuestos con una alta afinidad por la enzima y que serían evaluados posteriormente *in vivo* (Figura 4).

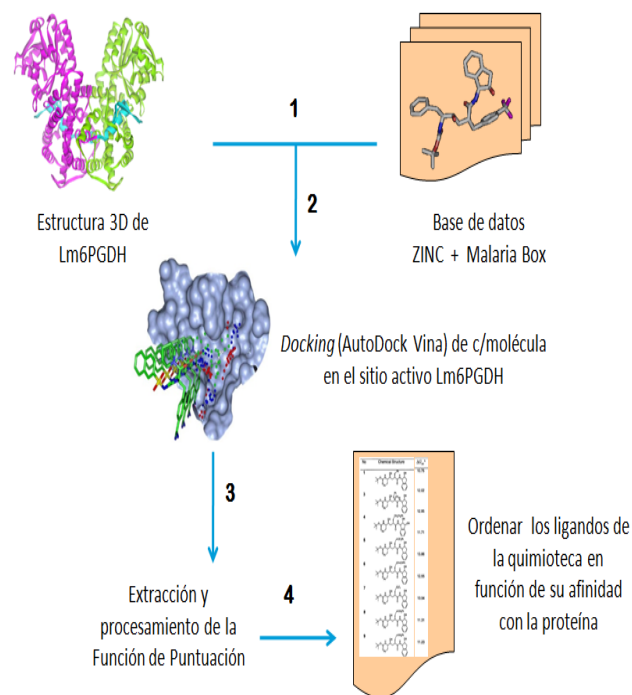


Figura 4. Esquema general tamizado virtual de librerías con Lm6-PGDH empleando *Docking* Molecular

Conclusiones

La estructura molecular 3D de la 6PGDH de *L. (L.) mexicana* ha sido obtenida, mostrando características típicas de una estructura nativa, con diferencias respecto a la estructura de *T. brucei* en los grupos de amino ácidos relacionados con la formación de la forma dimérica activa de la enzima.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido posible gracias al financiamiento de las siguientes instituciones: CDCH, FONACIT.

Igualmente, quiero agradecer a mis estudiantes, colegas y colaboradores por sus aportes en el desarrollo de esta línea de investigación.

Referencias

1. **Croft, L., Barrett, M. y Urbina, J.** (2005). Chemotherapy of tripanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol** **21**: 508-512.
2. **Bryceson, A.** (2001). A policy leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Trop. Med. and Int. Health** **6**: 928-934.
3. **González-Luna, D.** (2008). Estudio bioquímico molecular de la resistencia a glibenclamida en *Leishmania* sp. **Tesis Doctoral**. Postgrado Biología Celular. Facultad de Ciencias. UCV.
4. **González, D., Pérez, J.L., Serrano, M.L., Igoillo-Esteve, M., Cazzulo, J.J., Barrett, M.P., Bubis, J. y Mendoza-León, A.** (2010). The 6-Phosphogluconate Dehydrogenase of *Leishmania* sp. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** **19**: 213–223.
5. **Graterol, M.** (2016). Modelado molecular de la enzima 6PGDH y su aplicación en el diseño racional de fármacos contra la leishmaniasis. **Tesis Doctoral**. Postgrado en Química, Facultad de Ciencias, UCV. Nota: En proceso de escritura para su presentación.

La fluorescencia *in vivo* en Trypanosomatidae: un enfoque experimental para el estudio de la relación parásito hospedador y la eficacia de drogas

PALMIRA GUEVARA TREJO¹, ANUSCHKA DA SILVA¹, ALI AGUDELO¹, NEREIDA
PARRA² Y ALFREDO MIJARES²

¹Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. ²Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Ministerio del Poder Popular para la Educación Universitaria, Ciencia Tecnología e Innovación.

Correo-e: palmiragt@yahoo.com.mx

Una de las líneas de investigación el Laboratorio de Genética Molecular aborda en el desarrollo de herramientas para el análisis genético en Trypanosomas y *Leishmania*, particularmente la construcción de vectores de expresión utilizando el promotor ribosomal y la construcción de líneas fluorescentes útiles en el estudio de la biología de estos parásitos. En conjunto con el Laboratorio de Fisiología de Parásitos, IVIC, nos interesa estudiar el curso de la infección por *Trypanosoma cruzi* inoculado por vía oral en el modelo murino como base para entender el comportamiento del parásito en los casos agudos de la enfermedad de Chagas producto de la contaminación de alimentos con vectores infectados. Presentamos una actualización sobre el uso de marcadores *in vivo* en el estudio de las enfermedades parasitarias en humanos y animales de interés para el consumo humano causadas por especies de la familia Trypanosomatidae (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma vivax*), que incluye nuestros aportes en el contexto de la aplicación de la fluorescencia *in vivo* para el estudio de la compleja relación vector-hospedador-parásito en estos Trypanosomatidae, y su uso en la evaluación de bancos de drogas en la búsqueda de terapias más eficaces.

Introducción

Entre los organismos parásitos de la familia Trypanosomatidae hay especies que causan enfermedades en humanos y animales. *Trypanosoma cruzi* y especies de *Leishmania* producen la enfermedad de Chagas y el espectro de enfermedades conocidas como leishmaniasis en humanos, *Trypanosoma brucei* origina la enfermedad del sueño en humanos y Nagana en bovinos, mientras que *Trypanosoma evansi* produce la surra en bovinos, equinos y otros animales de cría. Todas éstas son consideradas enfermedades olvidadas debido a que reciben insuficiente financiamiento para la investigación, básica y aplicada, incluyendo aquella dirigida al desarrollo de nuevos tratamientos, a pesar de que amenazan a millones de personas y afectan a la producción de alimentos de origen animal en vastas regiones de los cinco continentes. Conocer la biología de estos organismos, su metabolismo y detalles de los procesos de interacción con sus hospedadores y vectores ofrece posibilidades en el desarrollo de estrategias terapéuticas y de control para estas enfermedades.

Las técnicas y metodologías experimentales para analizar la interacción de estos microorganismos y sus hospedadores han sido determinantes para entender los procesos que establecen la infección y su permanencia en el organismo causando la enfermedad. La microscopía de luz, inicialmente

utilizando métodos de fijación y tinción de tejidos y posteriormente, incorporando marcadores moleculares, inmunológicos e inmunocitoquímica, permitió describir los ciclos de vida de estos Trypanosomatidae en el hospedador vertebrado y los insectos vectores. Existe información a nivel celular y en menor grado, a nivel molecular, de los ciclos de vida de los parásitos patógenos *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, especies de *Leishmania* (Figura 1) y otros tripanosomas (*T. evansi*, *T. rangeli*, *T. equiperdum* y *T. vivax*).

Progresivamente la microscopía óptica y los enfoques para obtención de imágenes *in vivo* han incorporado nuevos marcadores reporteros. La proteína de fluorescencia verde, GFP por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*, proveniente de la medusa *Aequorea victoria*, ha surgido como el biomarcador que ha permitido visualizar el curso y funcionamiento de las proteínas dentro de la célula, y seguir el trazo de procesos de desarrollo y migración celular (16). El marcaje *in vivo* con GFP constituye una poderosa herramienta para abordar el estudio de las interacciones en los complejos ciclos de los parásitos tripanosomatideos permitiendo obtener información a nivel celular y molecular de los mecanismos de invasión, tropismos y distribución celular, intercambio genético, inclusive, conocer la carga parasitaria en el curso de las diferentes fases de la infección. Así mismo, disponer

de parásitos fluorescentes permite diseñar ensayos de alto rendimiento para la evaluación de bancos de drogas en la búsqueda de terapias más eficaces (11).

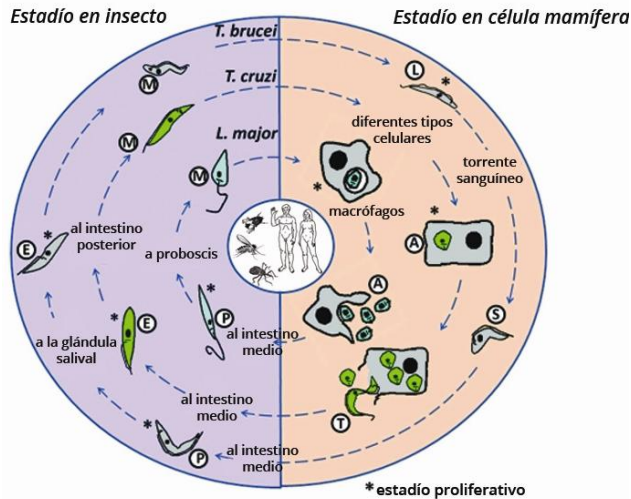


Figura 1. Ciclos de vida de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Representación de los ciclos de vida de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*, agentes etiológicos de la leishmaniasis, enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño, respectivamente, mostrando las formas parasitarias en los estadios del insecto vector y en el hospedador mamífero. *Leishmania major* prolifera extracelularmente como promastigotes (P) en el intestino medio del flebotomino. Las formas metacíclicas (M) del parásito son transmitidas durante la picadura al torrente sanguíneo donde invaden a los macrófagos del mamífero. Dentro de la célula los metacíclicos se transforman a amastigotes (A) y se dividen antes de ser liberados por la lisis celular. *Trypanosoma cruzi* se replica como epimastigotes (E) en el intestino medio del insecto reduviende y se diferencia a las formas metacíclicas infectivas (M) que son excretadas con las heces del vector que invaden diferentes tipos celulares cuando entran en contacto con el hospedador mamífero. Intracelularmente se transforman a amastigotes proliferativos (A) los cuales se transforman a formas tripomastigotas sangícolas (T) causando la lisis celular e invadiendo nuevas células. *Trypanosoma brucei* se diferencia de formas procíclicas (P) a epimastigotes proliferativos (E) en la mosca tsetse, transformándose luego en formas metacíclicas (M) infectivas en las glándulas salivares. Luego de ingresar al hospedador durante la ingesta de sangre, las formas M se diferencian a formas largas y delgadas (L) que proliferan en el torrente sanguíneo y pueden llegar al sistema nervioso central. Incrementado el número de parásitos estas formas (S) son reemplazadas por formas redondeadas “stumpy” (S) no proliferativas. Tomado con modificaciones de (14).

Vectores de expresión y métodos de transfección para la obtención de líneas transfectantes estables fluorescentes *in vivo* en los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*

La aplicación de la fluorescencia como un marcador celular eficiente *in vivo* en mamíferos, levaduras y en los tripanosomas ha requerido desarrollar versiones del gen GFP adaptadas a estas células eucariotas, que incluyen cambios en el uso de codones prefiriendo a C/G en la segunda y tercera posición del codón, así

como mutaciones termo estables al plegamiento de la proteína a 28°C y 37°C (16).

La introducción de GFP en sistemas heterólogos utiliza vectores diseñados para la expresión estable de la fluorescencia *in vivo* en la célula receptora. En el caso particular de los tripanosomas, se han usado vehículos de clonamiento conteniendo secuencias que destinan su integración en el genoma nuclear, promotores fuertes dirigiendo la expresión y señales para el correcto procesamiento y estabilidad del ARNm del gen reportero (15). Utilizando elementos promotores de la transcripción de los genes ribosomales y antígenos de superficie, conjuntamente con señales presentes en las regiones intergénicas para el proceso de edición en trans del ARNm, se han construido vectores de expresión estable para varias especies de los géneros *Trypanosomas* y *Leishmania* que incorporan los genes de las proteínas fluorescentes verde (GFP) y rojo (DsRed), esta última proveniente de la anemona marina *Discosoma striata* (16) y mutaciones que derivan en otros colores, así como, otros reporteros bioluminiscentes como el gen de la luciferasa (LUC) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de algunos vectores desarrollados para la expresión de genes reporteros en *Trypanosomas* y *Leishmania*.

vector	especie	Tamaño (pb)	promotor	Región UTR 5'	Gen reportero	Región intergénica	Marcador selectivo	Región UTR 3'
pXGFP5(S65T)-R-promoter (9)	género <i>Leishmania</i>	7,140	ribosomal	DHFR-TS	GFP5(S65T)	DHFR-TS	NEO	DHFR-TS
pF4XL4hyg (13)	<i>L. donovani</i>	No descrito	Promotor ribosomal Endógeno	+	RFP	+	HYG	+
pF4XL4neo (13)	<i>L. donovani</i>	No descrito	Promotor ribosomal Endógeno	+	eGFP	+	NEO	+
pTREX-nGFP5(S65T) (10)	<i>T. cruzi</i>	7,062	ribosomal	HX1-Tp2β	GFP5(S65T)	5'GADPH	NEO	3'GADPH
pTREX-nDsRed	<i>T. rangeli</i>							
pTREX-Neo-t8-Tomato (5)	<i>T. cruzi</i>	7,670	ribosomal	HX1-Tp2β	GFP5(S65T)	5'GADPH	NEO	3'GADPH
pBEX/GFP (12)	<i>T. cruzi</i>	7,363	Promotor ribosomal Endógeno	αβTubulina	EGFP	αβTubulina	NEO	αβTubulina
pHD67E (3)	<i>T. brucei</i>	7,000	Prociclina	Prociclina	EGFP	Actina	HYG	Actina
pTvLrDNAcRim (11)	<i>T. vivax</i>	7,197	ribosomal	TvPRAC	Crimson	αβTubulina	SAT	αβTubulina

(No de referencial); GFP: proteína de fluorescencia Verde; RFP, DsRed, CRIM: versiones de la proteína de fluorescencia roja; NEO: neomicina fosfortransferasa; HYG: hygromycin B fosfortransferasa; SAT: Noursestricina N-acetiltransferasa; + presente no descrita.

Tomado con modificaciones (11).

En el Laboratorio de Genética Molecular (LGM) se han desarrollado los vectores pXGFP5(S65T)-R-promoter para la expresión en especies del subgénero *Leishmania* (9) y pTREX-n-GFP5(S65T) y pTREX-n-DsRed1.1 para *T. cruzi* y *T. rangeli* (8,10).

La introducción de los genes reporteros en los Tripanosomatidae se realiza fundamentalmente mediante la electroporación del ADN del vector, siguiendo el esquema descrito en la Figura 2, el cual se inicia con la evaluación del nivel natural de resistencia de la cepa del parásito al antibiótico utilizado como presión selectiva mediante la determinación del IC₅₀ (7), seguido de procedimiento de electroporación (8) y la selección a través de sucesivos pasos de cultivo alternando la ausencia y presencia de la presión selectiva, y culmina con el clonamiento de los cultivos fluorescentes estables (4). El proceso se lleva a cabo durante un período de seis a ocho semanas durante las cuales se realiza el

seguimiento de la viabilidad celular y la emisión de fluorescencia.

Procedimiento para la obtención de líneas fluorescentes estables en Tripanosomatidae	
1	Determinar el IC ₅₀ al antibiótico (NEO, HYG o SAT) utilizado para la selección
2	Crear el cultivo hasta fase exponencial a una densidad de 10 ⁷ /10 ⁸ parásitos/mL
3	Concentrar los parásitos a una densidad de 10 ⁹ /10 ¹⁰ parásitos/mL
4	Electroporar 0,4 mL de parásitos en medio LIT con 5 µg de ADN del vector
5	Incubar 48 horas en medio LIT 10% suero fetal sin antibiótico
6	Cambiar el medio a medio LIT 10% suero fetal con antibiótico a [2xIC ₅₀]
7	Incubar en presión selectiva por diez días
8	Cambiar el medio a medio LIT sin presión selectiva
9	Incubar sin presión selectiva por diez días
10	Repetir pasos 6 al 9 tres veces
11	Observar viabilidad y emisión de fluorescencia a las 48 horas y en cada cambio de medio
12	Obtener clones de los cultivos fluorescentes estables

Figura 2. Esquema del procedimiento para la obtención de líneas fluorescentes estables en Tripanosomatidae.

La bioluminiscencia aplicada en Tripanosomatidae.

La comunidad científica dedicada al estudio de los Tripanosomatidae en su compleja relación con hospedadores y vectores, asimilando las ventajas metodológicas que ofrecen los genes reporteros bioluminiscentes para su aplicación en experiencias *in vivo*, las cuales incluyen buena sensibilidad, baja toxicidad, simplificación del procesamiento de la muestra que dispensa la fijación y la facilidad en la captura de la imagen, los ha incorporado desde finales de los 90 en estudios que abarcan los mecanismos de invasión y el tropismo tisular durante la infección en modelos animales (5,11,12), la formación de híbridos y el intercambio genético durante el ciclo en hospedadores (3,13) y la evaluación de drogas (5,10,11) (Tabla 2).

En el LGM construimos líneas fluorescentes verdes de *Leishmania donovani* (9) y observamos su desarrollo en el tracto intestinal de flebotominos de colonias de laboratorio y capturados en la naturaleza, abriendo la posibilidad de utilizar insectos no axénicos para evaluar capacidad vectorial. El vector pXGFP5(S65T)-R-promoter empleado en estos experimentos fue luego utilizado como herramienta para evaluar *in vivo* elementos reguladores de la transcripción por la ARN polimerasa I y señales de procesamiento del ARNr, en *Leishmania amazonensis* (1). La aplicación de la fluorescencia *in vivo* la extendimos a las dos tripanosomiasis americanas al evaluar el desarrollo en infecciones sencillas y mixtas de *T. cruzi*-DsRed y *T. rangeli*-GFP (10).

Con el objetivo de estudiar del curso de la infección por *T. cruzi* inoculado por vía oral en el modelo murino, como base para entender el comportamiento del parásito en los casos agudos de la enfermedad de

Chagas producto de la contaminación de alimentos con vectores infectados, como los ocurridos en el bosque urbanizado del valle de Caracas, estado Miranda y zonas de la costa del estado Vargas (2),

Tabla 2. Aplicaciones de bioluminiscencia en Tripanosomatidae.

vector	especie	Gen reportero	aplicación	Ref
pXGFP5(S65T)-R-promoter	<i>L. donovani</i>	GFPS(S65T)	Desarrollo en el vector utilizando especímenes salvajes	9
pXGFP5(S65T)-R-promoter	<i>L. mazonensis</i>	GFPS(S65T)	Análisis de secuencias terminadores de la transcripción y procesamiento del ARNr	1
pF4X1.4hyg pF4X1.4neo	<i>L. donovani</i>	eGFP RFP	Demstración de formación de híbridos e intercambio genético en vectores	13
pTREG-nGFPS(S65T)	<i>T. cruzi</i> <i>T. rangeli</i>	GFPS(S65T)	Desarrollo en el vector, evaluación de infecciones mixtas	10
pTREG-nGFPS(S65T)	<i>T. cruzi</i>	GFPS(S65T)	Uso de cepas de reciente aislamiento para evaluación de tropismo tisular y tamizaje de drogas	8
pTREG-Neo-td-Tomato	<i>T. cruzi</i>	GFPS(S65T)	evaluación de tropismo tisular y tamizaje de drogas	5
pHD67E	<i>T. brucei</i>	EGFP	Evaluación de intercambio genético en vectores	3
pTvlrDNACrim	<i>T. vivax</i>	Crimson	Herramienta para explorar procesos infecciosos a nivel celular y tisular y evaluar nuevos compuestos terapéuticos	11
pBEX/GFP	<i>T. cruzi</i>	EGFP	Regulación de la expresión genética, interacción parásito hospedador, tamizaje de drogas y desarrollo de vacunas	12

hemos construido líneas de parásitos fluorescentes verdes clonadas de cepas de reciente aislamiento a partir de *Pastronylus geniculatos* capturado en una vivienda en Municipio los Salias, Estado Miranda (Figura 3) (7).

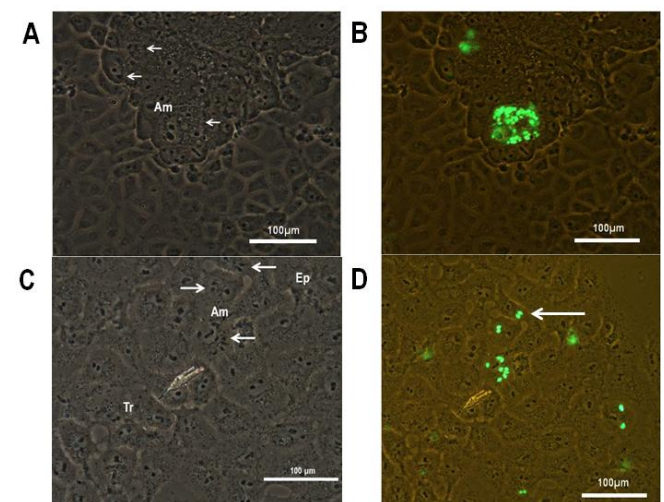


Figura 3. Células VERO infectadas con líneas clonales de *T. cruzi* GFP5 (S65T). A y B. Células VERO infectadas con *T. cruzi* GFP5 (S65T). A y C Microscopía de luz. B y D Microscopía de fluorescencia. Aumento 400X. Las flechas indican Am: amastigotes; Tr: tripomastigotes; Ep: epimastigotes.

Los parásitos desarrollaron el ciclo infeccioso *in vitro* en células Vero, expresando la fluorescencia en todas las formas, amastigotas, epimastigotas y tripomastigotas y se han mantenido estables en cultivo por ocho meses. En este momento estamos en capacidad de abordar las infecciones en el modelo murino para estudiar el tropismo tisular, la sensibilidad a tratamientos, inclusive realizar el tamizaje de bancos de drogas en la búsqueda de terapia más eficientes.

Perspectivas

El genoma de *T. evansi* muestra una gran similitud al de *T. brucei* (6), el tripanosomatidae más accesible al análisis con herramientas de la genética reversa, abriendo la posibilidad de utilizar sus vectores (3) para la expresión de reporteros fluorescentes y la aplicación de la bioluminiscencia en el estudio de la biología de este tripanosoma que infecta a bovinos, equinos y camélidos.

Agradecimientos

A Virginia Ramírez Guevara (intervención de la figura 1) y a Víctor Salazar de la unidad de Microscopía de Luz del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC.

Financiamiento: Proyectos IVIC 305 y 1365; Misión Ciencia G-2007001442.

Referencias

1. **Abreu-Blanco, M., Ramírez, J., Pinto-Santini, D., Papadopoulou, B. y Guevara, P.** (2010). Analysis of ribosomal RNA transcription termination and 3' end processing in *Leishmania amazonensis*. **Gene** **451**: 15-22.
2. **Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A. y Noya, O.** (2015). Actualización sobre brotes orales de la enfermedad de Chagas en Venezuela: enfoques epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **110**: 377-386.
3. **Bingle, L. Eastlake, J. Bailey, M. y Gibson, W.** (2001). A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the *in situ* detection of mating events. **Microbiology** **147**: 3231-3240.
4. **Campelo, R.** (2007). Adaptación de un sistema de expresión condicional de genes de otros kinetoplastida a *Trypanosoma rangeli*. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
5. **Canavaci, A., Bustamante, J., Padilla, A., Pérez Brandan, C., Simpson, L., Xu, D., et al.** (2010). *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. **PLoS Neglected Tropical Diseases** **4**: e740.
6. **Carnes, J., Anupama, A., Balmer, O., Jackson, A., Lewis, Brown, R., et al** (2015). Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **9**: e3404.
7. **Da Silva, A.** (2016). "Obtención de líneas fluorescentes estables in vivo de una cepa de *Trypanosoma cruzi* del valle de Caracas haciendo uso del vector pTREX-n GFP5 (S65T)". Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
8. **Dias, M.** (2001). Diseño de herramientas moleculares para el estudio de la interacción parásito-vector en infecciones mixtas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*". Tesis de licenciatura. **Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.**
9. **Guevara, P., Pinto-Santini, D., Rojas, A., Crisante, G., Añez, N., y Ramírez, J.L.** (2001) Green Fluorescent Protein-Tagged *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies. **Journal of Medical Entomology** **38**: 39-43.
10. **Guevara, P., Dias, M., Rojas, A., Crisante, G., Abreu-Blanco, M.T., Umezawa, E., et al.** (2005). Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **Journal of Medical Entomology** **42**: 48-56.
11. **Goyard, S., Dutra, P.L., Deolindo, P., Autheman, D., D'Archivio, S. y Minoprio, P.** (2014). *In vivo* imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy, **Parasitol. Int.** **63**: 260-863.
12. **Kessler, R., Gradia, D., Rampazzo, R., Lourenco, E., Fidencio, N., Manhaes, L., Probst, C., Avila, A., y Fragoso, S.** (2013). Stage-regulated GFP expression in *Trypanosoma cruzi*: Applications from host-parasite interactions to drug screening. **PLOS One** **8**: e67441.
13. **Sadloval, J., Yeo, M., Seblova, V., Lewis, M., Mauricio, I. Volf, P. y Miles, M.** (2011). Visualisation of *Leishmania donovani* Fluorescent Hybrids during Early Stage Development in the Sand Fly Vector. **PLoS One** **6**: e19851. doi: 10.1371/journal.pone.0019851.
14. **Teixeira, S., Cardoso de Paiva, M. Kangussu-Marcolino, R. y Da Rocha, W.** (2012). Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genet. Mol. Biol.** **35**(1): 1-17.
15. **Vazquez, M.P. y Levin, M.** (1999). Functional analysis of the intergenic region of TcP2β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene** **239**: 217-225.
16. **Zimmer, M.** (2013). **Illuminating disease: An Introduction to Green Fluorescent Proteins.** Oxford University Press. ISBN 978-0-19-936281-3.

Variaciones espaciales y temporales de la comunidad planctónica del embalse Camatagua (Estados Aragua y Guárico, Venezuela)

ERNESTO J. GONZÁLEZ, DANIEL LÓPEZ Y LORENA RODRÍGUEZ

Laboratorio de Limnología, Centro de Biología Celular

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela. Correo-e: ernesto.gonzalez@ciens.ucv.ve

El embalse Camatagua es el principal reservorio de agua potable para la ciudad de Caracas. Su tributario principal, el río Guárico, recibe aguas desde fuentes eutrofizadas. El impacto de esta entrada de nutrientes sobre la comunidad del plancton no había sido evaluado, por lo que se planteó el estudio de las variaciones de su abundancia y biomasa. Mensualmente (septiembre 2012-agosto 2013), se determinaron la abundancia (sedimentación en cámaras de Uthermöhl) y biomasa (expresada como concentración de clorofila-*a*, mediante la extracción con etanol) del fitoplancton y la abundancia (conteos en cámaras de Sedgwick-Rafter) y biomasa (determinación de peso seco) del zooplancton. Se registraron 37 especies del fitoplancton, siendo las cianobacterias dominantes (>90% de abundancia relativa). Los valores promedios de clorofila-*a* superaron los 39 µg/l. Los valores elevados de abundancia y biomasa del fitoplancton redujeron en más de 3 metros la transparencia del agua en pocos años. Por su parte, se registraron 25 *taxa* del zooplancton, siendo los copépodos >40% de la abundancia relativa promedio. La biomasa zooplanctónica superó, en promedio, los 400 µg p.s./l. Los valores registrados son propios de sistemas eutrofizados, por lo que la comunidad planctónica reflejó el impacto del aumento en la concentración de nutrientes de los últimos años.

Introducción

El embalse Camatagua es el principal reservorio de agua para Caracas. Los últimos estudios de carácter limnológico fueron efectuados en el año 1997 y, desde entonces, el embalse ha sufrido grandes variaciones en su nivel por eventos de sequía extrema, generados por el fenómeno de El Niño, además de la demanda creciente de agua potable para la población (2).

De manera adicional, el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales Taiguaiguay (Edo. Aragua), fue desviado hacia el embalse Taiguaiguay y, desde allí, se bombea agua hacia el río Tucutunemo para la construcción del sistema de riego hacia los valles de esta zona. Sin embargo, por no haberse completado totalmente esta obra, parte del efluente de este sistema está siendo vertido hacia el río Guárico, principal afluente del embalse Camatagua (4). Este trasvase de agua desde fuentes altamente eutrofizadas y contaminadas, como lo es el embalse Taiguaigay (Estado Aragua), y todos sus impactos sobre la calidad de las aguas del embalse, no habían sido evaluados aún, por lo que se hizo necesario cuantificar el grado actual de eutrofización.

En vista de lo anteriormente expuesto, se planteó el objetivo de evaluar el impacto de esta entrada de nutrientes sobre la comunidad planctónica, determinando sus variaciones de abundancia y biomasa.

Área de estudio

El embalse Camatagua está alimentado principalmente por el río Guárico, formando parte de su cuenca (6). Se encuentra ubicado a una cota de 302 m.s.n.m., con un área de 5.900 ha y un volumen de 1.250 millones de m³. Su profundidad media es de 21 m y la descarga de 19 m³/s permite calcular un tiempo de residencia teórico de 761 días. Se emplea principalmente para el suministro de agua potable de la ciudad de Caracas y zonas aledañas; también se emplea para fines recreativos. Sus coordenadas geográficas son 09°49'10,6" N – 66°56'59,7" W. Para este estudio se seleccionaron cuatro localidades de muestreo: E1, cercana al dique; E2, Quebrada El Jobal; E3, Quebrada Zuata; E4, Río Guárico (**Fig. 1**).

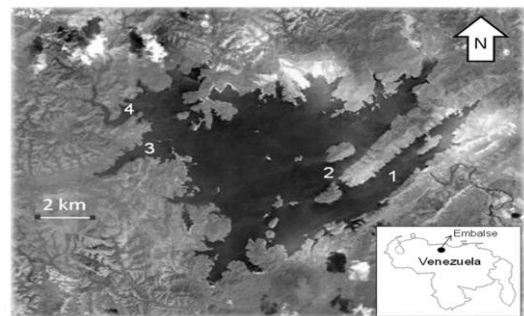


Figura 1. Mapa del embalse Camatagua, mostrando la ubicación relativa de las estaciones de muestreo.

Materiales y métodos

Fitoplancton

La abundancia se determinó mediante la sedimentación de un volumen conocido de muestra fijada con lugol en cámaras de sedimentación de Uthermöhl y luego por conteo de las algas con ayuda del microscopio invertido de plancton (10). La biomasa se estimó como contenido de clorofila-*a*, filtrando un volumen conocido (250 ml) de muestra a través de filtros de fibra de vidrio y extracción de la clorofila con etanol al 95% (8).

Zooplancton

La abundancia se estimó por conteos de submuestras de concentrados en cámaras de Sedgwick-Rafter para calcular la abundancia de las especies (10). La biomasa se estimó por peso seco en una ultramicrobalanza (1).

Resultados

Fitoplancton

Durante el período de estudio se registraron 37 especies del fitoplancton, siendo las algas verdes, correspondientes a la División Chlorophyta, las más diversas, alcanzando un total de 14 especies representadas en la muestra (*Actinastrum hantzschii*, *Actinastrum minutissimum*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Botryococcus braunii*, *Closterium acutum*, *Crucigenia quadrata*, *Chlorella vulgaris*, *Dictyosphaerium pulchellum*, *Euastrum* sp., *Monoraphidium* spp., *Nephrochlamys* sp., *Oocystis lacustris*, *Scenedesmus ecornis* y *Tetraedron* sp.), seguidas en abundancia por las cianobacterias (Cyanobacteria) con 11 representantes (*Anabaena* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Chroococcus minimus*, *Dactylococcopsis acicularis*, *Gomphosphaeria* sp., *Leptolyngbya limnetica*, *Merismopedia tenuissima*, *Microcystis holsatica*, *Oscillatoria limnetica*, *Synechococcus linearis* y *Synechocystis aquatilis*), de las diatomeas (Bacillariophyta) con 7 representantes (*Aulacoseira granulata*, *Cyclotella meneghiniana*, *Epithemia zebra*, *Gomphonema* sp., *Navicula* sp., *Nitzschia* sp. y *Synedra ulna*), las Cryptophyta (*Cryptomonas erosa* y *Chroomonas nordstedtii*) y Euglenophyta (*Euglena* sp. y *Trachelomonas volvocina*), con 2 especies cada división y, finalmente, las Pyrrhophyta con un representante (*Peridinium* spp.).

Se registraron altas densidades de fitoplancton durante el período de estudio (**Fig. 2**), con el mayor valor promedio registrado en E3 ($36814,6 \times 10^3$ Células/litro), seguida de E4 ($29593,7 \times 10^3$ Células/litro), E2 ($34882,8 \times 10^3$ Células/litro) y E1 ($19142,2 \times 10^3$ Células/litro). Tal densidad de

organismos fitoplanctónicos es la responsable de la limitación de la penetración de la luz a través de la columna de agua (menos de 2 m de profundidad), por un efecto de auto sombreado (5,9).

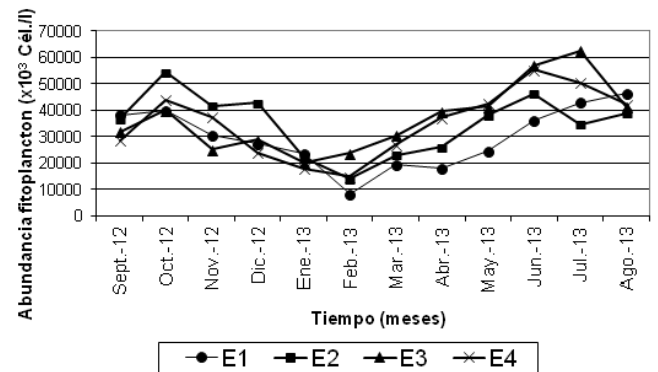


Figura 2. Variaciones de abundancia del fitoplancton en las diferentes localidades de estudio del embalse.

El embalse se encontró dominado por cianobacterias, las cuales alcanzaron más del 90% de abundancia relativa en todas las localidades de estudio. Las especies *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Oscillatoria* sp. y *Leptolyngbya limnetica* fueron las dominantes a lo largo del período de estudio.

En lo que respecta a la biomasa (como concentración de clorofila-*a*), también se registraron valores elevados (superiores a $35 \mu\text{g/l}$), según se observa en la **Fig. 3**. Tal como puede apreciarse, el comportamiento de la biomasa del fitoplancton fue similar en todas las localidades estudiadas. Los valores son propios de sistemas eutrofizados.

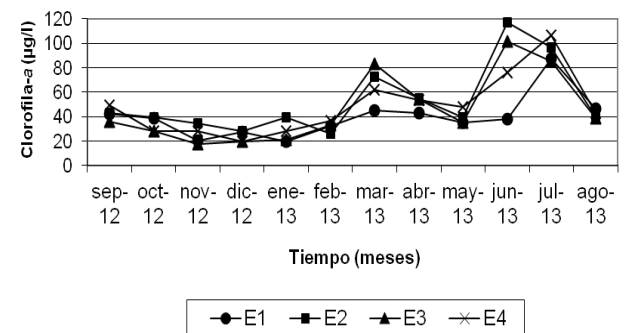


Figura 3. Concentraciones de clorofila-*a* en las diferentes localidades del embalse.

Las elevadas abundancias de microalgas, elevadas concentraciones de clorofila-*a* y las altas proporciones de cianobacterias, indican que el embalse se encuentra altamente impactado por las actividades humanas que se generan en su cuenca de drenaje, así como también por los altos niveles de nutrientes en sus aguas.

Zooplancton

Se registraron 25 *taxa*, siendo los más diversos los rotíferos con 15 especies (*Anuraeopsis* sp., *Asplanchna* sp., *Brachionus calyciflorus*, *B. falcatus falcatus*, *B. havanaensis*, *B. urceolaris*, *Epiphanes* sp., *Filinia* sp., *Keratella americana*, *K. cochlearis*, *K. tropica*, *Lecane* sp., *Platyionus patulus*, *Polyarthra* sp. y *Trichocerca* sp.), seguido de los cladóceros (*Ceriodaphnia cornuta*, *Diaphanosoma spinulosum* y *Moina micrura*) y los protozoarios (*Centropyxis* sp., *Trichodina* sp. y *Vorticella* sp.) con tres especies cada uno y luego por los copépodos (*Notodiaptomus deevyorus* y *Thermocyclops decipiens*), con dos especies.

La localidad 4 (E4) presentó los mayores valores de abundancia del zooplancton (promedio de 418 individuos/litro), seguida de E3 (264 ind./l), E2 (130 ind./l) y E1 (93 ind./l) (**Fig. 4**). Estos valores no parecieran ser tan elevados considerando la condición eutrófica del embalse, pero pudiera ser explicada por la elevada densidad de cianobacterias, que resultarían en un alimento poco adecuado para el zooplancton.

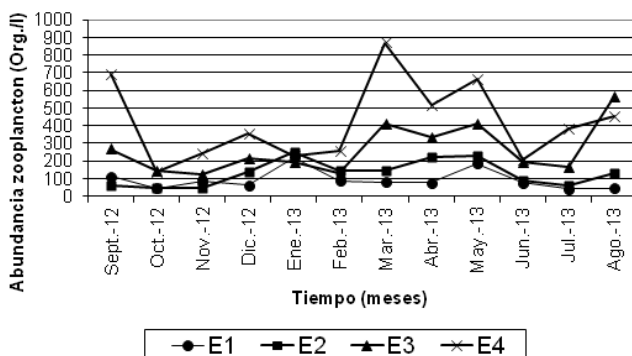


Figura 4. Abundancia del zooplancton en las diferentes localidades del embalse.

Los copépodos, a pesar de contribuir con pocas especies al zooplancton del embalse, fueron dominantes en las localidades 1 y 2, con más del 50% de abundancia relativa promedio, y en la localidad E3, con más del 40% de abundancia relativa; en estas tres localidades, los rotíferos fueron el segundo grupo en abundancia relativa, seguidos de los cladóceros. Sólo en la localidad E4, los rotíferos (46,67%) fueron dominantes por sobre los copépodos (35,09%), seguido por los cladóceros (13,95%). El resto de los grupos presentó bajas proporciones relativas.

La biomasa del zooplancton presentó grandes fluctuaciones (**Tabla 1**), probablemente debido a las condiciones de estratificación y circulación de las aguas que se han presentado en el período de estudio, y estos valores pueden catalogarse de moderados a

altos, lo cual parece concordar con el estado trófico del sistema.

Tabla 1. Valores mínimos, máximos, promedios y desviaciones estándar (D.E.) de la biomasa del zooplancton (como μg peso seco/litro) en cada una de las localidades del embalse.

E1	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Superficie	222,9	267,3	20,0	830,0
Intermedio	189,0	187,6	20,0	600,0
Fondo	177,5	172,3	15,0	595,0
E2	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Superficie	600,8	1436,0	100,0	5155,0
Intermedio	437,9	570,8	20,0	2105,0
Fondo	1027,1	2435,7	25,0	8720,0
E3	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Superficie	434,6	461,5	80,0	1710,0
Intermedio	397,5	238,2	205,0	1060,0
Fondo	354,6	319,1	30,0	1080,0
E4	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Superficie	621,2	458,9	120,0	1400,0
Fondo	700,8	754,4	100,0	2560,0

Tanto en E1 como en E3, los mayores valores de biomasa se registraron en los estratos superficiales, mientras que los menores se registraron en los estratos profundos, aunque las diferencias no fueron muy elevadas. Por su parte, en E2 y en E4, los mayores valores se registraron en los estratos profundos; sólo en E2 la diferencia entre los valores de fondo y el resto de los estratos fue notoria (alrededor de dos veces mayor).

Consideraciones finales

Se pudo notar que en E1, tanto los valores de abundancia y biomasa del fitoplancton como los valores de abundancia y biomasa del zooplancton, fueron menores a los del resto de las localidades. Este hecho pudiera ser explicado porque esta localidad fue la más profunda de las cuatro estudiadas, donde el mayor volumen de agua pudo haber diluido la concentración de nutrientes y, por ende, la de los organismos planctónicos. Así mismo, la cercanía de la torre-toma y del aliviadero del embalse pudo haber hecho posible la exportación de organismos fuera del embalse.

Desde los estudios realizados en 1992 (6,7) y en 1997 (3) hasta el presente, se han detectado cambios cualitativos y cuantitativos en el embalse Camatagua, como consecuencia de las actividades antrópicas y el manejo de este cuerpo de agua. Algunos de estos cambios, en lo que se refiere al plancton, se resumen a continuación:

- Biomasa del fitoplancton (como concentración de clorofila-a): Aumentó de 3,09 µg/l en 1992, a valores alrededor de 40 µg/l o superiores en la actualidad.
- Cianobacterias: Eran dominantes en 1992, pero en determinados momentos del año sus proporciones relativas llegaban a disminuir hasta valores entre 30 y 40%, mientras que en el presente, el menor valor de proporción relativa de las cianobacterias fue de 64% (en E2 durante el mes de diciembre 2012).

Tal como puede apreciarse, se produjo un deterioro significativo en la calidad de las aguas del embalse, como consecuencia del vertido de las aguas del río Tucutunemo hacia el río Guárico, afluente principal del cuerpo de agua, además del uso de las tierras adyacentes para actividades de ganadería, todo lo cual introduce nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) y materia orgánica directamente al embalse.

Dada la importancia estratégica del embalse, como principal reservorio de agua para la ciudad de Caracas y otros poblados adyacentes, se hace necesario el tratamiento de las aguas antes de ser vertidas nuevamente a sus afluentes. Otras medidas también son requeridas para mejorar la calidad de las aguas, y se refieren a la protección integral de la cuenca del embalse y de sus tributarios principales. Medidas como la reforestación de áreas carentes de vegetación y cambios en el uso de la tierra, pueden ser consideradas.

Agradecimientos

Al Ministerio del P.P. para Ciencia, Tecnología e Innovación, por el financiamiento del Proyecto PEII 20110001396. Y a las siguientes instituciones y personas por el apoyo para realizar los trabajos de campo: Ministerio del P.P. para el Ambiente, Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la UCV, HIDROCAPITAL, María Leny Matos, Leidi Herrera, José Caraballo, Robinson Aranguren, Gerónimo Guánchez y José Luis Moncada.

Referencias

1. **Edmondson, W.T. y Winberg, G.G.** (eds.). (1971). **A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters.** IBP Handbook N° 17. Blackwell. Oxford, Inglaterra, 358 pp.
2. **González, E.J. y Matos, M.L.** (2012). Manejo de los Recursos Hídricos en Venezuela. Aspectos

Generales. En: B. Jiménez-Cisneros y J.G. Tundisi (eds.). **Diagnóstico del Agua en las Américas.** Red Interamericana de Academias de Ciencias – Programa de Aguas, Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC. México: 437-447.

3. **González, E.J. y Ortaz, M.** (1997). **Estudio control de algas en los embalses La Pereza, Quebrada Seca, La Mariposa, Lagartijo y Camatagua mediante técnicas de biomanipulación.** Informe técnico presentado a las compañías Hidroimpacto C.A. e Hidrocapital. Caracas, 62 p.
4. **González, E.J., Matos, M.L., Buroz, E., Ochoa-Iturbe, J., Machado-Allison, A., Martínez, R. y Montero, R.** (2015). Urban Water. Venezuela. En: G. Roldán, M.L. Torregrosa, K. Vammen, E.J. González, C. Campuzano y A. de la Cruz (eds.). **Urban Water Challenges in the Americas. Perspectives from the Academies of Sciences.** Inter-American Network of Academies of Sciences (IANAS) – Programa de Aguas, con apoyo de IHP-UNESCO. ISBN 978-607-8379-12-5. México: 556-601.
5. **Horne, A.J. y Goldman, C.R.** (1994). **Limnology.** 2nd edition. McGraw-Hill Inc. New York, 576 pp.
6. **Infante, A., Infante, O., Vegas, T. y Riehl, W.** (1992). **Proyecto Multinacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales.** I. Embalses Camatagua, Guanapito y Lagartijo. Universidad Central de Venezuela y Organización de los Estados Americanos. Caracas, 63 p. (Informe Técnico).
7. **Matos, M.L.** (1992). **Estudio integral del fitoplancton del embalse Camatagua: Sistemática, distribución vertical, abundancia, biomasa y producción primaria.** Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Caracas, 207 p. (Tesis de Maestría).
8. **Nusch, E.A. y Palme, G.** (1975). Biologische Methoden für der Praxis der Gewässeruntersuchung, Bestimmung des Chlorophyll-a und Phaeopigment-gehaltes in Oberflächenwässer. **GWF-Wässer/Abwässer, 116:** 562-565.
9. **Wetzel, R.G.** (2001). **Limnology. Lake and river ecosystems.** 3rd edition. Academic Press. San Diego, 1006 pp.
10. **Wetzel, R.G. y Likens, G.E.** (2000). **Limnological analyses.** 3rd. edition. Springer-Verlag. New York, 429 pp. Publishers. São Carlos, Rio de Janeiro & Leiden, 585 p.

Elección de pareja en una situación del tipo “fiesta coctel” en la rana *Physalaemus pustulosus*: efecto de la complejidad del canto y el orden de emisión

ZAIDA TÁRANO MIRANDA

Laboratorio de Comportamiento Animal. Centro de Biología Celular.

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: zaida.tarano@ciens.ucv.ve

La emisión comunal de señales tiene ventajas y desventajas, entre las últimas, la dificultad para localizar emisores particulares (efecto *cocktail party*). Una solución evolutiva a este problema es la incorporación de elementos resaltantes en la señal. En este trabajo se evaluó el valor del chasquido, un componente oportunista del canto reproductivo de *Physalaemus pustulosus*, como elemento resaltante, en una situación simplificada del efecto cocktail party. Se manipuló la relación temporal (alternados, contiguos, superpuestos) y el orden de emisión (líder, seguidor) de cantos con cero, uno y dos chasquidos y se evaluó el efecto sobre la respuesta de las hembras. En condiciones ideales (emisión antifonal) las hembras prefieren los cantos con uno o más chasquidos a aquéllos sin chasquidos y los que tienen tres o más respecto a aquéllos con uno solo, pero no discriminan entre uno y dos, y que la superposición de cantos sin chasquidos genera respuestas aleatorias. Los resultados apoyaron sólo parcialmente la hipótesis planteada, pero permitieron descubrir que el orden de emisión es también un factor importante en la elección de pareja. Se proponen dos mecanismos próximos para explicar los resultados (enmascaramiento periférico y atención selectiva) y algunas estrategias vocales de los machos según su atractivo relativo.

Introducción

El laboratorio de Comportamiento Animal analiza la comunicación acústica en anuros como línea principal de investigación. En anuros, los cantos de anuncio (o reproductivos) están involucrados en la defensa de territorios y atracción de parejas, y por tanto afectan considerablemente el fitness de los machos. La eficacia de los cantos depende de sus características, de las del sistema sensorial del receptor y del medio de transmisión, entre otras (5, 10). Muchos anuros anuncian y/o se reproducen en agregaciones, mono o multiespecíficas, donde las condiciones para la comunicación son subóptimas debido al efecto de la interferencia producida por los cantos de coespecíficos y/o heteroespecíficos; si bien la agregación también confiere ventajas (7). Dependiendo de las características de la interferencia (i.e., heteroespecífica, coespecíficas o abiótica), la selección natural favorece rasgos acústicos y conductuales diferentes.

La interferencia coespecífica representa un “problema” evolutivo muy particular porque las señales de todos los machos tienen una estructura

muy similar, están dirigidas al mismo tipo de receptor (las hembras y/o los machos coespecíficos), y se producen en el mismo lugar y tiempo. La divergencia acústica intraespecífica no es una solución evolutiva ya que puede propiciar apareamientos híbridos, con sus consecuencias deletéreas sobre la viabilidad y fertilidad de la descendencia. De modo que entre las “soluciones” posibles están las estrategias conductuales que permitan evitar la interferencia o la evolución de rasgos que aumenten la “saliencia” de la señal (efecto de “*cocktail-party*” en inglés). El efecto “*fiesta coctel*” se refiere a la dificultad de detectar, reconocer y localizar un emisor particular cuando emisores múltiples y similares coinciden en tiempo y espacio (3). Resolver este problema requiere que el receptor sea capaz de segregar las señales producidas por los diferentes emisores. La segregación puede lograrse “aprovechando” las diferencias en los rasgos espectrales, temporales (ej., modulación de amplitud) y espaciales (ej., diferencias en el tiempo de llegada) de los emisores (claves primitivas) (3,19) o sintácticas, esto es, secuencias particulares de componentes de la señal (claves de orden superior) (3).

En muchas especies que forman agregaciones, los emisores producen señales complejas que contienen dos o más componentes que difieren en la facilidad con que son detectados y localizados en distintos ambientes acústicos (típicamente denominados componentes “resaltantes”). Se ha propuesto que la atención selectiva de los receptores a los diferentes componentes incrementa la probabilidad de que asignen correctamente una señal a su emisor (localizar). En este trabajo se analizó el efecto de la interferencia coespecífica en la elección de pareja por parte de las hembras en la rana túngara o sapito de pústulas, *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*, en una situación del tipo “fiesta coctel”.

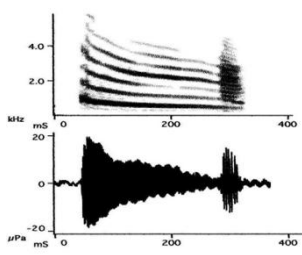


Figura 1. Lamento con un chasquido. Se muestra el sonograma (arriba) y el oscilograma (abajo).

La ranita túngara produce un canto complejo formado por un lamento y de cero hasta siete chasquidos (Figura 1). El lamento es necesario y suficiente para la fonotaxis de las hembras, mientras que el chasquido es un elemento oportunista que incrementa el atractivo del lamento para las hembras, y también su valor competitivo en las interacciones vocales entre machos (4,14). El chasquido tiene fuerte modulación de amplitud y es de banda ancha (contiene hasta 15 armónicos), lo cual lo califica como un rasgo “resaltante” (19). En condiciones ideales (sin interferencia coespecífica, heteroespecífica o abiótica) las hembras prefieren los lamentos seguidos de chasquidos respecto a lamentos solos, si bien la preferencia por más chasquidos no es lineal: hay preferencia por uno o dos respecto a cero y por tres respecto a uno, pero no hay discriminación entre uno y dos (4).

Cuando los lamentos (sin chasquidos) de dos machos se superponen total o parcialmente, las hembras no discriminan entre lamentos diferentes, es decir, responden aleatoriamente (15). Es interesante que no haya efecto precedencia por el lamento líder, es decir aquel que se inicia primero en una secuencia de dos lamentos contiguos o parcialmente superpuestos, ya que este efecto ha sido descrito en otras especies de anuros, incluso de la misma familia (Leptodactylidae) (ej., *Physalaemus fischeri*, 16). Debido a que los chasquidos son costosos energéticamente y en cuanto al riesgo de depredación (13), llama la atención que los machos produzcan múltiples chasquidos (al menos más de uno).

En el presente trabajo, se exploró el efecto combinado de la complejidad del canto y la relación temporal en las preferencias fonotácticas de las hembras, utilizando un paradigma de elección dual (dos opciones acústicas disponibles), simulando una forma simplificada del escenario del tipo “cocktail party”.

Específicamente, se puso a prueba la hipótesis de que el chasquido actúa como un elemento que incrementa la probabilidad de localización de un emisor en presencia de interferencia coespecífica; de modo que el efecto aleatorizante de la interferencia sobre la respuesta de las hembras, descubierto por Schwartz y Rand (15), se reduciría cuando el lamento de un macho es seguido por más chasquidos que el de su “vecino”. Se aprovechó el hecho que las hembras no discriminan entre lamentos seguidos por uno o dos chasquidos cuando los cantos son presentados en alternancia perfecta (antifonal), y se expuso a las hembras a varias combinaciones en cuanto a la composición del canto (cero, uno o dos chasquidos) y la relación temporal y orden de emisión.

Figura 2. Relación temporal y orden de emisión de cantos con cero, uno y dos chasquidos. a) Antifonales. b) y c) Superpuestos 50%. d) Contiguos.

Específicamente a, lamento sin chasquido vs lamento con un chasquido, y con uno vs con dos chasquidos, presentados en tres patrones de emisión (antifonales, contiguos superpuestos,) y dos órdenes de emisión (lamento con más chasquidos lidera, lamento con menos chasquidos lidera) (Figura 2).

Métodos

Se utilizó una arena experimental construida en una habitación insonorizada, en la cual se colocaron dos altavoces en lados opuestos de la arena. Una hembra receptiva (capturada en amplexo y que no haya desovado) se colocó bajo un recipiente, transparente acústica y visualmente, en el centro de la arena. El recipiente se retiraba accionando algún mecanismo remoto en un momento particular, de modo que la hembra podía entonces moverse libremente en la arena. Los criterios para determinar que la hembra había realizado una elección dependieron de la conducta típica de la especie observada en campo: acercarse y esperar que el macho las abrace (13). Una hembra misma se utilizó en varios bioensayos

consecutivos en los que se analizaron combinaciones de complejidad y orden de emisión diferentes, mediando entre uno y otro un lapso de tiempo de “descanso” de alrededor 2 minutos. Se consideró que la respuesta de la hembra en cada situación acústica es independiente y se analizaron los resultados de cada bioensayo (condición) por separado. Previo a los bioensayos se aclimató a las hembras a las condiciones experimentales durante un periodo de 30 minutos a 2 horas. Cada bioensayo duró 15 minutos como máximo. Se midieron las siguientes variables (análisis estadístico entre paréntesis): canto elegido (probabilidad Bayesiana), tiempo de respuesta (Friedman), dirección de salida y número de aproximaciones a cada estímulo (altavoz) antes de hacer una elección (análisis multinomial).

Resultados y discusión

Se encontró que la preferencia por lamentos con un chasquido sobre cantos sin chasquidos se mantuvo bajo todas las combinaciones experimentales (bioensayos), pero fue más fuerte cuando el canto con un chasquido lideraba. Cuando el lamento con dos chasquidos precedió al lamento con un chasquido hubo preferencia por el canto con dos chasquidos, lo cual no ocurre cuando los cantos se emiten antifonalmente (4). Por consiguiente, hubo una interacción entre el número de chasquidos y el orden de emisión. Estos resultados apoyaron parcialmente la hipótesis propuesta del efecto “resaltante” del chasquido, pero además, se descubrió que el orden de canto es un componente oportunista del sistema de comunicación entre machos y hembras en *P. pustulosus*.

En cuanto a las otras variables medidas, las hembras tendieron a iniciar su movimiento en la dirección del canto finalmente elegido, lo cual indica que ya habían hecho una pre-selección al comenzar a moverse. Para la combinación lamento vs lamento con un chasquido, las hembras nunca se acercaron al canto no elegido (independientemente de la relación temporal), indicando que la elección no requirió la inspección cercana del canto; en la combinación lamento con un chasquido vs lamento con dos chasquidos, todas se acercaron al menos una vez al canto no elegido, indicando que este escenario es más complejo perceptualmente que aquel que involucra cantos con menos chasquidos.

Por su parte, en ausencia de chasquidos, la superposición de los lamentos genera respuestas aleatorias en las hembras (15), la adición de un chasquido confiere ventaja al canto líder. También hay ventaja al producir dos chasquidos, pero sólo

cuando este canto precede al canto más sencillo. Los resultados contribuyen a comprender por qué los machos producen cantos con dos chasquidos, ya que las hembras solo los prefieren en situaciones particulares (1,2,4,8,12). A nivel próximo, en las preferencias observadas podrían estar implicados mecanismos perceptuales, el enmascaramiento periférico o la atención selectiva (a nivel central), o de una compleja interacción entre ellos. En el primer caso, la estimulación de la papilla basilar por los chasquidos de mayor amplitud del canto líder, interferiría con la estimulación de la papila anfibia por la porción coincidente y final del lamento seguidor, de menor amplitud (18); por tanto, la hembra elegiría el canto anticipatorio más complejo. Este mecanismo no obstante, no explica satisfactoriamente la reducción de la preferencia por cantos con un chasquido cuando anticipan a uno sin él, porque una fracción de las hembras agrupó el chasquido del canto líder con el del canto seguidor; la atención selectiva, en cambio, podría explicar esta reducción.

Se ha propuesto que los sistemas perceptuales tienen limitaciones para procesar secuencias de señales, y que esta capacidad varía con las categorías perceptuales (p.e., elementos de la señal con distintas funciones) (9). Cuando dos categorías perceptuales son percibidas simultáneamente, compiten por la atención. En consecuencia, una vez que la porción crítica de una señal es percibida, en este caso, la mitad inicial del lamento (17), la atención se enfoca en el tránsito de esa señal en detrimento de otros elementos, hasta que se percibe la porción crítica de otra, con lo cual se interrumpiría o al menos se perjudicaría el procesamiento completo de la primera señal. Por ejemplo, cuando un lamento con un chasquido anticipa a un lamento solo, la atención se enfoca en ese elemento hasta que se percibe la porción crítica del otro, con lo cual se interrumpiría el procesamiento completo del primero. De modo que, existe cierta probabilidad de que el chasquido del canto anticipatorio sea agrupado con el lamento seguidor (6), mientras que esto no pasaría cuando el lamento anticipatorio no tiene chasquidos y el segundo sí (preservándose la fuerza de la preferencia observada cuando no hay interferencia). Es interesante que cuando el lamento anticipatorio posee dos chasquidos y el seguidor posee uno, los chasquidos del primero no son agrupados con el segundo. Por tanto, ninguno de los dos mecanismos explica satisfactoriamente los resultados para lamentos anticipatorios con dos chasquidos. La atención selectiva predice preferencias por el lamento seguidor con más chasquidos (lo cual se observó para

el seguidor con un chasquido pero no para el de dos chasquidos) y caídas de preferencia para lamentos anticipatorios con chasquidos. El enmascaramiento periférico predice preferencias por el lamento anticipatorio con más chasquidos (lo cual si se observó para el lamento con dos chasquidos vs un chasquido, pero para uno chasquido vs cero).

Independientemente del mecanismo próximo, la superposición tiene un efecto perjudicial para los machos que producen cantos con un solo chasquido, bien en coros de machos que no los producen o que agregan dos chasquidos. Los estudios futuros deberían evaluar los patrones de emisión de los machos en coros. Sobre la base de los resultados presentes, propongo que los machos que emiten un solo chasquido evitarían la superposición, bien alternando por oposición de fase o produciendo cantos contiguos. Los machos que producen dos chasquidos (o cuando un macho produce dos chasquidos) más bien buscarían la superposición anticipatoria, que le confiere ventajas frente a machos que emiten un solo chasquido. Aunque los resultados apoyaron sólo parcialmente la hipótesis planteada, mostraron que los patrones de emisión (relación temporal entre cantos) serían otra forma de competencia vocal entre los machos de *P. pustulosus*, no explorada hasta ahora.

Referencias

1. Akre, K.L., y Ryan, M.J. (2010). Proximity-dependent response to variably complex mating signals in túngara frogs (*Physalaemus pustulosus*). **Ethology** **116**:1138-1145.
2. Akre, K.L. y Ryan, M.J. (2011). Female túngara frogs elicit more complex mating signals from males. **Behav. Ecol.** **22**:846-853.
3. Bee, M.A. y Micheyl, CH. (2008). The “cocktail party problem”: What is it? How can it be solved? And why should animal behaviorists study it? **J. Comp. Psychol.** **122**:235-251.
4. Bernal, X.E., Akre, K.L., Baugh, A.T., Rand, A.S. y Ryan, M.J. (2009). Female and male behavioral response to advertisement calls of variable complexity in túngara frogs, *Physalaemus pustulosus*. **Behav. Ecol. Sociobiol.** **63**:1269-1279.
5. Bradbury, J.W. y Vehrencamp, S.L. (1998). Principles of Animal Communication. Sinauer, Massachusetts.
6. Farris, H.E., Rand, A.S. y Ryan, M.J. (2002). The effects of spatially separated call components on phonotaxis in túngara frogs: Evidence for auditory grouping. **Brain Behav. Evol.** **60**:181-188.

7. Gerhardt, H.C y Huber, F. (2002). Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. Univ. Chicago Press, Chicago.
8. Goutte, S., Kime, N.M., Argo, T.F. IV. y Ryan, M.J. (2010). Calling strategies of male túngara frogs in response to dynamic playback. **Behaviour** **147**:65-83.
9. Kahneman, D., y Triesman, A. (1984). Changing views of attention and automaticity. pp. 29-61. En: Varieties of Attention (Parasuraman, R. y Davies D.R., eds). Academic Press, Nueva York.
10. Kime, N.M. (2001). Female mate choice for socially variable advertisement calls in the cricket frog, *Acris crepitans*. Tesis Doctoral, University of Texas at Austin, Texas.
11. Owings, D.H. y Morton, E.S. (1998). Animal Communication: A new approach. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
12. Rand, A.S., Ryan, M.J. y Wilczynski, W. (1992). Signal redundancy and receiver permissiveness in acoustic mate recognition by the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. **Amer. Zool.** **32**:81-90.
13. Ryan, M.J. (1985). The Túngara Frog. A Study in Sexual Selection and Communication. Univ. Chicago Press, Chicago.
14. Ryan, M.J. y Rand, A.S. (1993). Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. **Evolution** **47**:647-657.
15. Schwartz, J.J. y Rand, A.S. (1991). The consequences for communication of call overlap in the túngara frog, a neotropical anuran with a frequency-modulated call. **Ethology** **89**:73-83.
16. Tárrano, Z., y Herrera, E.A. (2003). Female preferences for call traits and male mating success in the Neotropical frog *Physalaemus enesefae*. **Ethology** **109**:121-134.
17. Wilczynski, W., Rand, A.S. y Ryan, M.J. (1995). The processing of spectral cues by the call analysis system of the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. **Anim. Behav.** **49**:911-929.
18. Wilczynski, W., Rand, A.S. y Ryan, M.J. (1999). Female preferences for temporal order of call components in the tungara frog: a Bayesian analysis. **Anim. Behav.** **58**:841-851.
19. Yost, W.A., y Sheft, S. (1993). Auditory perception. 193-236. En: Human Psychophysics (Yost, W.A., Popper A.N. y Fay, R.R., eds.). Springer Verlag, Nueva York.

Evaluación morfológica en el campo de ecotipos amazónicos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr), obtenidas por cultivo *in vitro*

EVA C. DE GARCÍA¹, HÉCTOR A. BLANCO¹, AMALIA BRITO¹, TERESA E. VARGAS¹
Y FRANS TORRES²

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.

²FUDECI, Estación Experimental Puerto Ayacucho, Estado Amazonas, Venezuela.

¹Correo-e: eva.cristina.garcia@gmail.com

Se estableció un protocolo para la multiplicación *in vitro* a partir de yemas de la corona del fruto de ecotipos Amazónicos de piña: Tabë Känä y Erwä Känä. Se observó neoformación y multiplicación de yemas, y producción masiva de vitroplantas, las cuales se climatizaron en umbráculos. Posteriormente, fueron trasladadas a FUDECI, Puerto Ayacucho, y sembradas en parcelas del Consejo Comunal Agua Linda. Las vitroplantas fueron evaluadas morfológicamente: coloración (hojas) y presencia de agujones (hojas), tamaño de la planta, producción de colinos. La parcela constaba de 200 plantas con tres ecotipos: Tabë Känä, Erwä Känä, y Curripaco (control). En Tabë känä, el 100% conservó espinas en las hojas, y 50% presentó una coloración rojiza. En Erwä Känä, el 7,1 % conservó el borde de la hoja liso, el 100% presentó hojas totalmente verdes, como las plantas madre. Las plantas obtenidas *in vitro* se observaron más fuertes y erectas que las del ecotipo Curripaco. El 71% de las plantas del ecotipo Tabë känä, y el 36% de plantas del ecotipo Erwä Känä presentaron colinos. Las vitroplantas conservaron en general los patrones morfológicos de las plantas madres, lo cual indicó que el protocolo es adecuado para la multiplicación de estos ecotipos.

Introducción

La piña (*Ananas comosus*) es un fruto de gran importancia económica y de alto consumo en Venezuela, ocupando la posición número once entre los principales rubros alimenticios del país y el quinto rubro vegetal en producción, precedido por el arroz, azúcar, maíz y banano, alcanzando para el año 2012 una producción de 564.262 toneladas métricas (5).

En el municipio Átures del estado Amazonas se han descrito 11 ecotipos de piña, los cuales son cultivados, principalmente, por aborígenes de la etnia Piaroa (Loswóthüa, en la lengua indígena), de Betania del Topocho, constituyendo la misma una actividad frutícola que forma parte de su cultura ancestral. Seis de esos ecotipos son comercializables y entre estos, cuatro han predominado en las áreas de siembra: 1) El ecotipo Gobernadora con dos sub ecotipos denominados por los nativos Ittimo Recuäsä, y Ruhä Känä, 2) El ecotipo Ojaä Känä.; 3) El ecotipo Brasileira denominada Yärä Känä y 4) el ecotipo Cabeza Danto, denominado Ujuo Känä (2). En el año 2007, el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias UCV, se inició un proyecto para la producción clonal masiva *in vitro* de plantas de ecotipos de piña amazónicos con el fin de proveer a la

población Piaroa de Betania de Topocho, Municipio Átures, de cantidades importantes de plantas para incrementar el consumo e industrialización de los ecotipos de piña seleccionados por dicha comunidad. En las reuniones de trabajo se nos informó la prioridad por obtener vitroplantas de los ecotipos: Gobernadora (Ruhä Känä); Brasileira (Yärä Känä); ya nombradas y dos nuevos ecotipos Tabë Känä, y Erwä Känä (de estas dos últimas no conocemos el nombre en español).

Se inició el trabajo con los ecotipos Tabë Känä, y Erwä Känä, el proceso de propagación *in vitro*, se estableció a partir del cultivo de yemas apicales y axilares de la corona de la piña. Las vitroplantas obtenidas fueron transferidas a tierra y colocadas en vivero para su climatización y posteriormente fueron trasladadas a la estación experimental de FUDECI en el estado Amazonas, donde se sometieron a un segundo proceso de climatización. Después de un mes se sembraron en parcelas del Consejo Comunal Agua Linda, Municipio Átures, en donde se les evaluó caracteres morfológicos y el crecimiento.

Estas evaluaciones *in situ* son muy importantes porque los procesos de multiplicación *in vitro* (cultivo de tejidos), pueden dar origen variaciones fenotípicas, que puedan ser indicadoras de variaciones genéticas

en las vitroplantas (6). Con base en ese criterio, se evaluaron parámetros morfológicos y de crecimiento en las vitroplantas creciendo en las parcelas, a fin de detectar variación en los marcadores morfológicos que puedan indicar alteraciones genéticas. Los resultados de estas evaluaciones también nos permitirán conocer la eficiencia del protocolo establecido en la micro-propagación clonal de los ecotipos de piña, ya que uno de los aspectos importantes del método es la producción de plantas genéticamente iguales a la planta madre.

Materiales y métodos

Se colectaron plantas, frutos y colinos de piña de los ecotipos Tabë Känä y Erwä Känä en plantaciones de la comunidad Piaroa en el Municipio Átures, estado Amazonas, que constituyeron el material inicial para la investigación (**Fig. 1A y 1B**). El material fue llevado al laboratorio de Biotecnología Vegetal, donde se clasificó, se limpió, algunas plantas se sembraron en tierra, los frutos y colinos se prepararon para su cultivo *in vitro*, mediante desinfección con fungicidas y bactericidas y luego se inició el proceso de selección del material para establecer el cultivo.

A las coronas e hijuelos o colinos basales se les eliminaron totalmente las hojas para exponer las yemas. Los materiales obtenidos se sometieron a la acción del desinfectante-esterilizador Gerdex, se lavaron con agua estéril y se sembraron en envases de vidrio con medios nutritivos que contienen: macro y micro elementos, y vitaminas MS, sustancias de crecimiento (auxinas y citocininas en proporción 1:1), y 30g.l⁻¹ sacarosa, con o sin agar. Estos métodos de propagación están ampliamente descritos en trabajos previos (1,3,4,7).

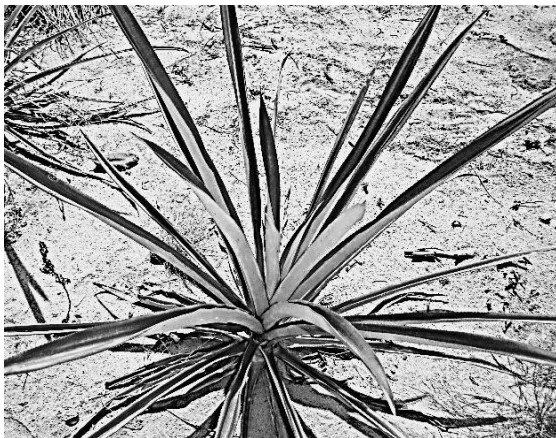


Figura 1A. Ecotipo Tabë Känä



Figura 1B. Ecotipo Erwä Känä
(Fotos tomadas en la parcela experimental en el asentamiento agrícola Agropa, Consejo Comunal Agualinda, Municipio Átures. Estado Amazonas).

Vitroplantas de 5 a 7 cm de alto (**Figs. 2 y 3**) fueron transferidas a tierra y colocadas en umbráculo para su climatización y posteriormente trasladadas a la Estación Experimental de FUDECI en el Estado Amazonas para una segunda etapa de climatización y finalmente fueron sembradas en parcelas experimentales en el asentamiento agrícola Agropa, Consejo Comunal Agua Linda, parroquia Parhueña, Municipio Átures.



Figura 2. Vitroplantas del ecotipo Erwä Känä (3 meses de cultivo).

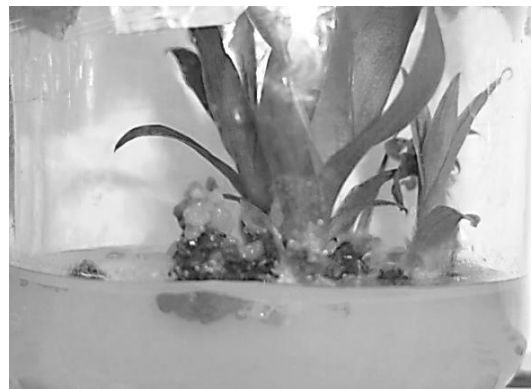


Figura 3. Vitroplantas del ecotipo Erwä Känä. Con brotes múltiples a los 9 meses.

Se estableció una parcela experimental donde se sembraron 210 plantas de los ecotipos: Tabë Känä, Erwä Känä, (población de vitroplantas), y Curripaco (control), que no fue cultivado *in vitro*. Las plantas fueron sembradas en hileras de 7 x 30 plantas. Para el muestreo se dividió la parcela en 7 sub-parcelas; en cada una de éstas se seleccionaron 10 plantas (no se tomaron en cuenta las plantas ubicadas en las esquinas ni en el centro de la sub-parcela). Se realizaron dos evaluaciones de las vitroplantas y plantas controles, una en febrero - después de dos años de cultivo - y otra el mes de agosto de ese mismo año. Los datos de crecimiento de las plantas fueron analizados estadísticamente mediante test de ANOVA de una vía con pruebas *a posteriori* de Tukey.

Los parámetros evaluados en el campo fueron los siguientes:

- Altura de la planta.
- Coloración de las hojas, en haz y el envés.
- Textura de la hoja.
- Presencia de agujijones en la base o borde de las hojas jóvenes y maduras.
- Producción de colinos.
- Producción de flores y frutos.

Resultados y discusión

La multiplicación de los ecotipos *in vitro* fue exitosa y se logró obtener plantas que se adaptaron fácilmente a las condiciones de umbráculo, vivero y campo, lo que nos permitió establecer la parcela experimental sembradas en campo, en una parcela del asentamiento agrícola Agropa, Agua Linda Sur, parroquia Parhueña, Municipio Átures. La piña es un cultivo perenne, que fructifica cada 3 años, crece en un clima tropical húmedo con temperaturas entre los 21 y 27°C, es una planta tolerante a la sequía debido a que posee mecanismos para almacenar agua, el intervalo de precipitación que requiere para su crecimiento es entre 500 y 2500 mm anuales.

El Municipio Átures, donde está situado el parcelamiento Agropa, posee una geografía que combina mesetas altas con extensas planicies, una superficie cubierta de selva, abarcando la cuenca alta y media del río Orinoco, parte de la cuenca del río Guainía y río Negro. El potencial de reserva natural está concentrado en sus abundantes recursos hidráulicos, mineros, escénicos y paisajistas y la intensa actividad biológica e importante acumulación de materia orgánica. Adicionalmente su temperatura ambiental oscila entre 15 a 30°C. Todas estas condiciones permitieron una buena adaptación de las vitroplantas a las tierras de la parcela en el asentamiento Agropa, sin mayores exigencias en cuanto a fertilización. En este trabajo se presentan los

resultados de dos evaluaciones una realizada en febrero de 2013 y la otra en agosto del mismo año. En la primera evaluación las plantas tenían 24 meses de trasplantadas y en la segunda 30 meses en el campo. En la primera evaluación, a los 24 meses de cultivo, en las parcelas se observó que las vitroplantas de Tabë Känä y Erwä Känä (**Fig. 4**), lucían más fuertes y erectas que las plantas del ecotipo Curripaco (**Fig. 5**), que no pasó por condiciones *in vitro*. Sin embargo estas plantas de Curripaco las cuales presentaban pocas hojas erectas y la mayoría de las hojas rastreras, alcanzaron mayor longitud, condición que se mantuvo en las evaluaciones a los 30 meses de cultivo.

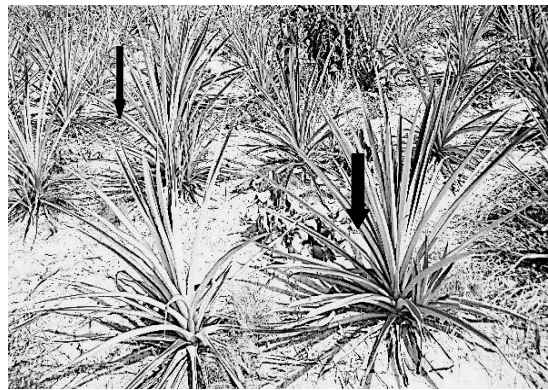


Figura 4. Vitroplantas de Erwä Känä, y de Tabë (flecha delgada). Vitroplanta Tabë Känä (flecha gruesa). Fotos tomadas en la parcela experimental en el asentamiento agrícola Agropa. Consejo Comunal Agua Linda Átures.



Figura 5. Plantas del ecotipo Curripaco con hojas de color violáceo oscuro, con crecimiento tipo rastrero.

Las vitroplantas de Tabë Känä presentaron, a los 30 meses de crecimiento, valores promedio más altos que las vitroplantas del ecotipo Erwä Känä, en cuanto altura de la planta (91,8 cm \pm 14,1) y diámetro

de la hoja ($3,4 \text{ cm} \pm 0,6$). Las hojas de textura lisacorácea, coloración verde oscuro en la cara adaxial y verde más claro y opaco en la cara abaxial, exhibiendo hojas con una tonalidad rojiza a violácea desde la zona media hacia el ápice foliar. Todas las hojas presentaron agujones antrosos, de consistencia fuerte, en relación a este aspecto. En una investigación del análisis anatómico comparativo entre las hojas del ecotipo Tabè Känä (obtenidas por organogénesis y mantenidas *in vitro*), y las de la planta madre, se observó que las hojas de las vitroplantas, al igual a las madres, presentaron márgenes con agujones desde un estado de desarrollo muy temprano (8). Al momento de la evaluación dos plantas presentaron inflorescencias, ninguna tenía frutos y algunos los individuos produjeron hijuelos en la base de la planta (entre 1-3 hijuelos por planta).

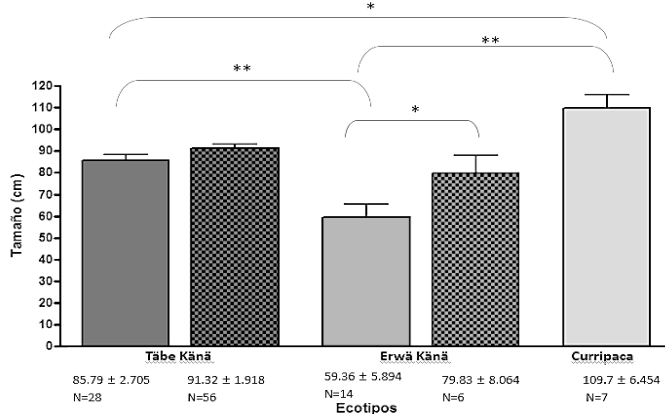


Figura 6. Evaluación del crecimiento de las vitroplantas de los ecotipos Tabè Känä y Eruwä Känä y las plantas del ecotipo Curripaco (control)

* Diferencia significativa para valores de $p < 0,01$
 ** Diferencia significativa para valores de $p < 0,001$

El ecotipo Eruwä Känä presentó un valor promedio en altura de la planta de $88,3 \text{ cm} \pm 27,2$ y un diámetro de la hoja de $2,8 \text{ cm} \pm 0,8$. Las hojas de textura lisacorácea, coloración verde en la cara adaxial y verde opaco en la cara abaxial, sin tonalidad rojiza. La mayoría de las hojas presentaron agujones antrosos, lo cual difiere de la planta madre que tenía bordes lisos.

Conclusiones

Las vitroplantas a pesar de que eran más pequeñas, en tamaño, se mostraron más vigorosas y erectas que las plantas del ecotipo Curripaco, y adicionalmente, las vitroplantas del ecotipo Tabè Känä, produjeron colinos antes que las plantas del ecotipo Curripaco. Las vitroplantas conservaron en general los patrones morfológicos de las plantas madres, solamente en el ecotipo Eruwä Känä se observaron cambios con respecto a la aparición de agujones en el borde las hojas, el cual es un carácter bastante plástico. Estos

resultados indican la posible ausencia de variabilidad genética, especialmente en el ecotipo Tabè Känä, lo cual debe ser comprobado por métodos moleculares. A partir estas observaciones se concluye que la propagación *in vitro*, es adecuada para la producción masiva de los ecotipos de piña Tabè Känä y Eruwä Känä, lo cual redundará en la producción e industrialización de los mismos. Estos resultados deben ser ratificados con marcadores moleculares.

Agradecimientos

A la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Físicas, Químicas, Matemáticas y Naturales (FUDECI), al CDCH-UCV y al FONACIT.

Referencias

1. Blanco H., Vargas, T.E. y De García, E. (2011). Micropropagación clonal de tres variedades de piñas nativas de la región amazónica mediante el cultivo de yemas axilares y apicales. **Interciencia** 36(6): 337-443.
2. Betancourt, D. (2006). Diversidad y Producción de la piña en el municipio Átures del estado Amazonas. **Agromonía de la producción. INIA Divulga** 8: 33-36.
3. Casale, I. y De García, E. (1987). Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. **ACEVIV** 2: 3-18.
4. De García, E., Blanco, H., Pineda, A. y Vargas, T.E. (2012). Micropropagación masiva de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) del ecotipo amazónico Tabè Känä vía cultivo de yemas y embriogénesis somática. **MIBE** 6: 189-192.
5. FAOSTAT. (2013). <http://www.factfish.com/statistic-country/Venezuela/pineapples,+production+quantity>.
6. Giménez, C., De García, E. y Haddad, O. (2008). Genetic and resistance stability to Black Sigatoka disease during micropopagation of *Musa* CIEN BTA-03 somaclonal variant. **Phyton** 77: 65-69.
7. Pineda, A., Vargas, T.E., Escala, M. y De García, E. (2012). Organogénesis *in vitro* en piña 'Española roja' y morfoanatomía de las plantas obtenidas en el proceso. **Bioagro** 24(3): 175-186.
8. Pineda, A., Vargas, T.E. y De García, E. (2014). Regeneración de *Ananas comosus* (L.) Merr, ecotipo Tabè Känä, mediante organogénesis indirecta. **Bioagro** 26(3): 135-142.

Organogénesis en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) ecotipo Erüwä Känä

HÉCTOR A. BLANCO FLORES¹, TERESA E. VARGAS CEDEÑO² Y EVA C. GARCÍA DE GARCÍA²

¹Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas, ²Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: hec.blanc@gmail.com

La piña (*Ananas comosus*) una especie tropical de gran importancia comercial en Venezuela, tiene cultivares y ecotipos, entre ellos los ecotipos amazónicos cultivados por la etnia Piaroa, cuyos mercados están restringidos localmente debido a la práctica tradicional del cultivo. Lograr la producción del fruto, a mayor escala, requiere superar esa restricción. Se realizó el presente trabajo con el fin de abordar esta limitante, mediante la regeneración de plantas, vía organogénesis, del ecotipo amazónico Erüwä Känä. Se cultivaron secciones basales foliares (SBF) en 14 medios: MS con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) sólo o combinado con Benciladenina (BA) o 2-Isopentenil-adenina. Hubo respuesta organogénica en 2: - MS + 2,4-D 0,5 mg.L⁻¹ + BA 3 mg.L⁻¹ (OD.5B3); y - MS + 2,4-D 1 mg.L⁻¹ + BA 1 mg.L⁻¹ (OD1B1). Se obtuvo 32,5% de SBF con callo organogénico (CO) en el medio OD.5B3. En OD1B1 ocurrió organogénesis en 7,5% de SBF. El origen del CO está asociado a los haces vasculares del explante. El CO obtenido en OD.5B3, produjo mayor número de vástagos/SBF en MS basal (3,45±1,11) que el CO de OD1B1 (0,32±1,44). Se logró la regeneración de plantas de 'Erüwä Känä', mediante ORG indirecta, empleando los medios OD.5B3 y, luego, el MS basal.

Introducción

Ananas comosus (L.) Merr. (Bromeliaceae) es una de las especies tropicales de mayor importancia comercial debido a la gran aceptación del fruto (piña) por parte de los consumidores en todo el mundo (4,5,12,14). Venezuela ocupaba el puesto 14 en la producción mundial de piña con 425.000 TM para el año 2012 (6). En ese mismo año, la piña era el quinto rubro vegetal en importancia después del arroz, caña de azúcar, maíz y banano en nuestro país (7). Para el año 2013, la producción nacional superó las 550.000 TM (8). El cultivar que domina el mercado nacional del fruto es la 'Española Roja' (10,17). Sin embargo, en nuestro país existen otros cultivares y ecotipos de piña que son de importancia local, entre ellos los ecotipos amazónicos cuyo mercado está restringido sólo a varias localidades del estado Amazonas y que son cultivados por aborígenes de la etnia Piaroa (2,18). Estos aborígenes emplean el método convencional del cultivo de la piña, el cual consiste en la siembra de propágulos (2,10). Sin embargo, este método tiene limitaciones tales como: bajas tasas de multiplicación y tasa de crecimiento lento (5,10,15, 16). Los Piaroa practican un cultivo tradicional de la piña (conuco) debido a carencias tecnológicas que impiden el aumento de la producción de este rubro a gran escala. Es necesario superar estas limitaciones para lograr, a largo plazo, la producción a gran

escala del fruto para su industrialización, consumo fresco y conservación de germoplasma. Dada la importancia comercial de la piña y las limitaciones del cultivo de los ecotipos amazónicos, se recurrió al cultivo de tejidos vegetales como vía alternativa para la propagación masiva de plantas *in vitro*. El presente trabajo tiene como objetivo la regeneración *in vitro* de un ecotipo amazónico de *A. comosus* mediante organogénesis adventicia (ORG). La ORG es una vía para abordar las limitaciones en la producción de plantas de piñas autóctonas.

Materiales y Métodos

La obtención *de novo* de plantas de *A. comosus* se realizó mediante el proceso de ORG a partir de secciones (explante) de base foliar (SBF), escindidas de plantas micropropagadas, vía cultivo *in vitro* de yemas, del ecotipo Erüwä Känä (3). Dichas plantas forman parte del banco de germoplasma *in vitro* del laboratorio de Biotecnología Vegetal-IBE-UCV. Los medios de cultivo utilizados en los ensayos tuvieron la formulación de sales de Murashige y Skoog (MS) (11). Las vitaminas, fuente de carbono y aminoácidos utilizados y las condiciones físicas de los medios fueron según lo descrito por Blanco y col. (3). Los medios fueron esterilizados en autoclave bajo condiciones estándar de presión y temperatura (1,1 Kg.cm⁻² y 121°C). Las SBF fueron

inoculadas en los medios bajo condiciones asépticas en cámaras de flujo laminar.

- *Inducción organogénica (IO)*

Las SBF, tomadas de las plantas de piña micropropagadas, fueron cultivadas en medios de IO. Se utilizaron 40 explantes foliares para cada tratamiento.

Los tratamientos para la IO consistieron de medios MS complementados con auxina (AUX) sola o en combinación con dosis relativamente altas de citocininas (CC). Se utilizó la AUX ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y las CC N⁶-Benciladenina (BA) y 2-Isopentenil-adenina (2ip). Las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas fueron: 2,4-D sola (0,5 y 1 mg.L⁻¹); 2,4-D (0,5 y 1 mg.L⁻¹) + BA (1, 2 y 3 mg.L⁻¹) y 2,4-D (0,5 y 1 mg.L⁻¹) + 2ip (1, 2 y 3 mg.L⁻¹). Los cultivos fueron mantenidos en cámaras de crecimiento con fotoperiodo 16h luz (56 μmol.m⁻².s⁻¹) y 8h oscuridad a temperatura ambiente durante 10 semanas. Se realizaron observaciones continuas de los cambios morfológicos de las SBF utilizando un microscopio estereoscópico (ME) marca ZEISS KL1500. Se determinó la frecuencia de respuesta organogénica de la SBF.

- *Desarrollo de vástagos*

Los explantes con IO fueron transferidos a medios MS basal (MS sin reguladores de crecimiento) para el desarrollo caulogénico. Los cultivos fueron incubados, por 6 semanas, en las cámaras de crecimiento con fotoperiodo (16h: 8h) a temperatura ambiente. Se realizaron observaciones de los cultivos durante ese periodo utilizando el ME. Se determinó el número promedio de vástagos por tejido organogénicamente inducido y el número promedio de vástagos por explante.

- *Estudio histológico de la ORG*

Se realizaron cortes transversales, a mano alzada, de las SBF que manifestaron respuesta organogénica en diferentes etapas de desarrollo. Los cortes se hidrataron con agua destilada en un solo paso y fijados con glicerina al 30 %. Se realizó la observación en el microscopio de luz marca NIKON 14 MLAB-2. Se utilizó la tinción con azul de Toluidina sólo en algunos casos.

Resultados y Discusión

La figura 1A-B muestra la morfología y anatomía de la base foliar en el tiempo inicial del proceso de ORG. Las SBF eran de color amarillento y algunas de color verde claro (Fig. 1A). Los diferentes tejidos

que conforman esta zona de la hoja son señalados en la Figura 1B.

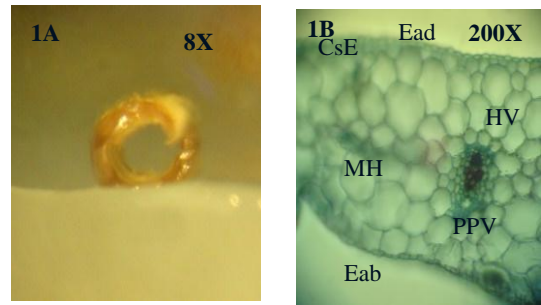


Figura 1. SBF antes de inducción organogénica. **1A)** Morfología general del explante recién cultivado en medio de inducción (tiempo 0). **1B)** Patrón anatómico del explante previa exposición al medio de cultivo. **Ead:** Epidermis adaxial, **Eab:** Epidermis abaxial, **CsE:** capa de células subepidérmicas, **HV:** Haz vascular, **MH:** mesófilo homogéneo, **PPV:** Parénquima perivascular.

Hubo respuesta organogénica, a las 4 semanas de cultivo, de las SBF en medios MS con 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 3 mg.L⁻¹ de BA (OD.5B3) y MS con 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg.L⁻¹ de BA (OD1B1). En OD.5B3 ocurrió ORG indirecta (fase intermedia de callo) y en OD1B1 hubo tanto ORG directa como indirecta (Tabla 1; Fig. 2).

Tabla 1. Efecto de diferentes medios de cultivo en la inducción del proceso organogénico en *A. comosus* 'Eriwä Känä'

Medios de IO	% Respuesta organogénica	
	ORG indirecta	ORG directa
**OD.5B3	32,5	0
**OD1B1	2,5	5

*: [N° SBF con respuesta organogénica/ N° total SBF cultivados] X 100. n= 40. La respuesta organogénica se determinó a las 10 semanas de cultivo. **: **O:** indica que son medios para Organogénesis. **D:** 2,4-D, **B:** BA. El número que acompaña a cada letra es la concentración en mg.L⁻¹ de cada regulador de crecimiento.

Los resultados obtenidos sugieren que el medio OD.5B3 fue el más adecuado para la inducción de callo organogénico (CO) en las SBF (Tabla 1). En la Figura 2A, se observan dos masas de CO que se ubican en la cara abaxial de la SBF. Los márgenes opuestos de la base de hoja encierran su cara adaxial y colocan a ambos CO muy cercanos entre sí. Adicionalmente, se observó la formación de yemas adventicias, sin formación previa de CO, en el extremo basal del explante (Fig. 2B). El CO es blanco crema o blanco verdoso, brillante (2A) y, en algunos casos se distinguen yemas adventicias en su periferia (Fig. 2D).

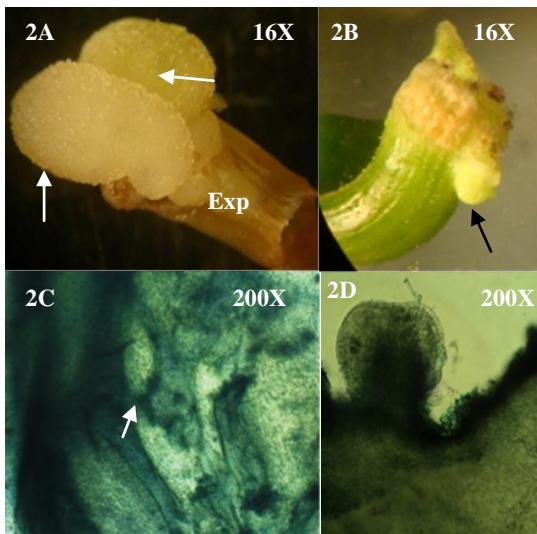


Figura 2. Aspecto general del explante con respuesta organogénica en el ecotipo de piña Erüwä Känä. **A)** Callo organogénico generado en el medio OD.5B3. Se observa la formación de dos masas de callo en un extremo de la SBF (flechas blancas). **B)** Organogénesis directa inducida en el explante cultivado en medio OD1B1. Se observa la formación de yema adventicia en el extremo basal del explante (flecha negra) **C)** Presencia de meristemoide (flecha blanca) en el callo organogénico. **D)** Yema adventicia formada en la periferia del callo.

Trabajos previos sobre embriogénesis somática y ORG en *A. comosus*, han señalado que la base foliar es la zona de la hoja que mejor responde a las condiciones de inducción morfogénica (1,9,13,14, 16,19). En el caso de los reguladores de crecimiento, se utilizó la combinación 2,4-D + BA debido a que ha sido utilizada para la regeneración *in vitro* de plantas de diferentes cultivares y ecotipos de piña (1,9,13,14,19).

El análisis histológico del CO de Erüwä Känä reveló un tejido no estructurado formado por células claras (no densas) con alta vascularización en toda su extensión (Fig. 2C-2D). Hubo formación de meristemoides los cuales estaban rodeados por el tejido vascular. Los meristemoides están constituidos por células más pequeñas y de citoplasma más denso en comparación con las células restantes del CO (Fig. 2C).

El origen del CO estuvo asociado a los haces vasculares del explante foliar. Las SBF estuvieron prácticamente intactas, excepto los haces vasculares que han perdido su integridad. Y se observa la formación de nuevo tejido vascular en la “interfase” explante-CO (Fig. 3).

A las 4 semanas de cultivo en MS basal, el CO se tornó de color verde oscuro y duro. Se formaron en su superficie yemas adventicias y múltiples brotes

(vástagos) (Fig. 4). A las 6 semanas de cultivo se determinaron dos parámetros relacionados al desarrollo caulogénico (Tabla 3). Los CO provenientes de OD.5B3 produjeron un mayor número de vástagos por explante en comparación con el CO proveniente de OD1B1. Este resultado sugiere que, para el ecotipo de piña Erüwä Känä, se requieren bajas dosis relativas de 2,4-D y altas dosis relativas de BA para inducir, efectivamente, la formación de CO en el explante foliar. Dicho resultado concuerda con lo reportado en trabajos previos sobre ORG indirecta en piñas (1,13,14,19).

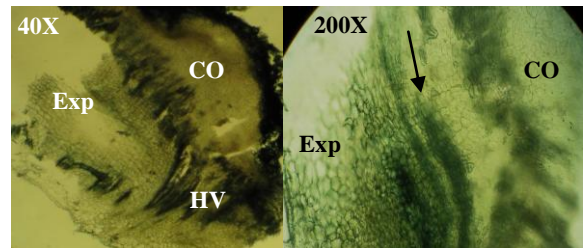


Figura 3. Ontogenia del CO en la piña Erüwä Känä. **A)** El desarrollo del CO está asociado con el tejido vascular de la SBF. Se observa la desviación de los haces hacia el CO. **B)** Formación de nuevo tejido vascular entre el explante y el CO (flecha).

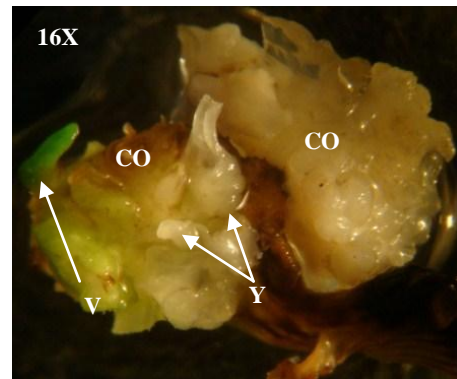


Figura 4. Desarrollo caulogénico sobre el CO. Se observa la formación de yemas adventicias y vástagos. **V:** vástago **Y:** yema adventicia.

Tabla 3. Desarrollo de vástagos en medio MS basal a partir de tejidos organogénicamente inducidos en *A. comosus* ‘Erüwä Känä’

Medios de IO	Desarrollo de vástagos en MS	
	N° vástagos/SBF£*	¥ N° vástagos/SBF
OD.5B3	10,62 ± 3,42	3,45 ± 1,11
OD1B1	13 ± 0,0	0,32 ± 1,44

* **SBF£:** N° de SBF con callo organogénico.

¥ **N° vástagos/SBF:** [N° vástagos/SBF£] X [SBF£/N° total de SBF cultivados]. Los parámetros fueron determinados a las 6 semanas de cultivo.

En el presente trabajo se logró la regeneración de plantas de la piña autóctona ‘Erüwä Känä’ vía ORG indirecta. Sin embargo, antes de su transferencia al campo, es necesario evaluar el efecto del proceso morfogénico *in vitro* sobre la estabilidad genética y/o epigenética de las plantas regeneradas mediante análisis morfológicos, anatómicos y moleculares.

Referencias

- Amin, M.N., Rahman, M.M., Rahman, K.W., Ahmed, R., Hossain, M.S. y Ahmed M.B.** (2005). Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf-derived callus cultures of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Giant Kew). *International Journal of Botany*, 1(2): 128-132.
- Betancourt, D.** (2006) Diversidad y Producción de la Piña en el Municipio Atures del estado Amazonas. *Agronomía de la producción. INIA divulga*, 8: 33-36.
- Blanco H.A., Vargas T.E. y García, E. de.** (2011). Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región Amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. *Interciencia*, 36(6): 437-443
- Coppens d’Eeckenbrugge, G. y Leal, F.** (2003). Morphology, Anatomy and Taxonomy. *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. Bartholomew D. P., Paull R. E., Rohrbach K. G. (eds). **CABI Oxon, Reino Unido**: 13-32.
- Davey, M.R., Sripaoraya, S., Anthony, P., Lowe, K.C. y Power, J.B.** (2007). I.5 Pineapple. Biotechnology in Agriculture and Forestry (Cap. I). *Transgenic Crops 5ta edición*. Pua E. C. y Davey M. R. (eds). **Springer-Verlag Berlin Heidelberg Alemania. Vol. 60**: 97-127.
- FAOSTAT.** (2012a). Top production pineapples 2012. <http://faostat.fao.org/site/339default.aspx>
- FAOSTAT.** (2012b). Top Production Venezuela (Bolivarian Republic of) 2012. <http://faostat.fao.org/site/339default.aspx>
- FAOSTAT.** (2015). Top production countries 2015. <http://faostat3.fao.org>.
- Firoozabady, E. y Moy, Y.** (2004). Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40(1): 67-74.
- Montilla de Bravo, I., Fernández, S., Alcalá de Marcano, D. y Gallardo, M.** (1997). El cultivo de la piña en Venezuela. *Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. FONAIAP. IICA/CReA/PROCIANDINO/FRUTHEX*: 155. Maracay, Venezuela.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- OGTR.** (2008). The Biology of *Ananas comosus* var. *comosus* (pineapple). *Office of the Gene Technology Regulator. Department of Health & Ageing. Australian Government. Version 2*. 43 p. Queensland, Australia.
- Pineda, A., Vargas, T.E., Escala, M. y García, E. de.** (2012). Organogénesis *in vitro* en piña ‘Española Roja’ y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. *Bioagro*, 24(3): 175-186.
- Pineda, A., Vargas, T.E. y García, E. de.** (2014). Regeneración de *Ananas comosus* (L) Merr. ecortipo Tabë Känä, mediante organogénesis indirecta. *Bioagro*. 26 (3):135-142.
- Py, C., Lacoëuilhe, J.J. y Teisson, C.** (1984). L’ananas, sa culture, ses produits, techniques agricoles et productions tropicales. *Paris: G. P. Maisonneuve & Larose*. 562 p.
- Roostika, I. y Mariska, I.** (2003). In Vitro Culture of Pineapple by Organogenesis and Somatic Embryogenesis: Its Utilization and Prospect. *Buletin AgroBio*, 6(1): 34-40.
- Sánchez, P.L.** (2013). La piña: Fruto tropical anclado en las montañas tachirenses. *Banco Agrícola de Venezuela C.A.* www.inti.gob.ve
- Segundo Informe Nacional Venezuela.** (2008). Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos. *El estado de los Recursos Fitogenéticos. Segundo informe nacional sobre Conservación y utilización sostenible para la agricultura y alimentación*. pp: 63-64.
- Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J.B. y Davey, M.R.** (2003). Plant Regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 39: 450-454.

Aplicación de biotécnicas al cultivo de plantas ornamentales y forrajeras de interés comercial

TERESA E. VARGAS, LUIS HERMOSO, VANESSA MEDINA, ALEJANDRA BETANCOURT, ROSA MARVAL, MELVIN MAIQUETÍA, ANDREA MENÉNDEZ-YUFFA, MARCIA TORO Y EVA DE GARCÍA

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela. Correo-e: teoriedu@cantv.net

Dianthus caryophyllus L. ("Clavel"), *Chrysanthemum* sp. ("Crisantemo" variedades "Pompón", y "Cremón"), *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith ("Bastón del Emperador") y *Calopogonium* sp., son cuatro especies vegetales que se han incorporado al Banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE). Plantas de Crisantemo, Clavel y Bastón del emperador, han sido entregadas a los agricultores de la zona del Jarillo, Edo Miranda, como parte de un proyecto financiado por el FONACIT, con el fin de apoyar la producción nacional y disminuir los gastos en divisas por importación de ornamentales. Todo esto ha sido posible con el empleo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Estas especies, también se sumarán al grupo de especies ornamentales medicinales, industriales y hortícolas, que se han mantenido a durante décadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, con repiques sucesivos del material vegetal a medios de cultivo fresco cada 2 meses, con el propósito de tener material vegetal en condiciones de asepsia para futuras investigaciones o producción masiva. También en los últimos años, se ha incursionado en el uso de microorganismos que fijan nitrógeno atmosférico, *Rhizobium* y los hongos *Glomeromycota*, que permiten una mejor nutrición fosforada, favoreciendo la sobrevivencia de las vitroplantas en vivero.

Introducción

Con el uso de biotécnicas se ha propiciado en los últimos años la producción comercial de plantas ornamentales, medicinales, industriales y hortícolas, con fines comerciales ya que permiten la propagación de grandes cantidades de plantas en menor tiempo (10). Así mismo, la incorporación de nuevas especies al banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la UCV, ha sido clave fundamental en el desarrollo de investigaciones enfocadas a solucionar problemas específicos en la agricultura del país.

Micropropagación masiva de Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

El clavel pertenece a la familia *Caryophyllaceae*. Sus flores son muy cotizadas a nivel nacional e internacional, debido a que son flores vistosas de variados colores y de agradable fragancia. También tiene usos medicinales, cosméticos y litúrgicos (5). La floración de esta planta se produce durante casi todo el año. Empleando técnicas de cultivo *in vitro*,

se planteó establecer un sistema de multiplicación masiva de esta especie (6). Se aislaron microesquejes, que fueron desinfectados y posteriormente sembrados en dos medios de multiplicación constituidos por las sales de Murashige y Skoog (1962) (8), suplementados con: 1 mg/L de benciladenina y 0,1 mg/L de ácido naftalenocético (MS1) ó 1 mg/L de cinetina y 0,5 mg/L de ácido indolacético (MS2). Para la etapa de aclimatación se ensayaron dos tipos de sustrato: 1.- tierra con micorrizas y 2.- tierra sin micorrizas. Transcurridas ocho semanas de cultivo se observó la formación de brotes en un 100 % de los explantes para el medio MS1, con 10 brotes/explante, con promedio de altura de 12,5 cm y un 31 % de plantas que formaron raíces, además el 7 % de los brotes presentaron características de hiperhidricidad. En el medio MS2 se observó un porcentaje de multiplicación del 81%, el promedio de brotes/explante fue de 4 con una altura promedio de 7,32 cm, y un porcentaje de formación de raíces del 87% (Fig. 1).

Con los métodos de aclimatación descritos se obtuvo un 10% de sobrevivencia de las plantas. El medio MS1 resulto ser el más apropiado para la multiplicación *in vitro* de clavel (Fig. 2).

Es importante continuar probando métodos de aclimatación para plantas de clavel propagadas *in vitro*.



Figura 1. Plantas *in vitro* de Clavel



Figura 2. Plantas de Clavel en vivero.

Micropropagación masiva de Chrysanthemum sp.

Chrysanthemum sp. (Crisantemo) pertenece a la familia Asteraceae, tiene gran demanda nacional e internacional, debido a que sus flores de diferentes formas y colores son ampliamente utilizadas en la fabricación de ramos. Por ser muy aromática también se emplea en la producción de perfumes (7). Microesquejes de dos variedades de Crisantemo: (Cremón y Pompón) fueron desinfectados y sembrados en dos medios de cultivo para la multiplicación de brotes, constituidos por sales MS (1962) (8), suplementado con: 2 mg/L de cinetina y 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético (medio MS1) o con 1 mg/L de cinetina y 0,5 mg/L de ácido naftalenoacético (medio MS2). Para la etapa de aclimatación se utilizaron dos tipos de sustratos: 1.- tierra con micorrizas. 2.- tierra sin micorrizas.

En la variedad Cremón, transcurridas ocho semanas de cultivo en el medio MS1, se observó un 75% de los explantes con brotes, con un promedio de 2 brotes/explante, con altura promedio de 9,25 cm y 93 % de plantas con formación de raíces; en el medio MS2, un 70% de explantes formaron brotes, con un promedio de 1,5 brotes por explante, una altura promedio de 4,15 cm, y formación de raíces en el 70 % de las plantas. En la variedad Pompón en medio

MS1, un 67% de los explantes formaron brotes, un promedio de 1,5 brotes/explante, con una altura promedio de 4,25 cm, y 95 % de las plantas formaron raíces. En el medio MS2, un 40 % de los explantes formaron brotes, un promedio de 1,2 brotes/ explante, una altura promedio de 3,25 cm, y un 75 % de las plantas formaron raíces (**Fig. 3**). Con el sustrato 2, se obtuvo un 80 % y 15 % de plantas aclimatadas de las variedades Pompón y Cremón, respectivamente (**Fig. 4**). Las pruebas con el sustrato 1 continúan en estudio.

Con los dos medios de cultivo probados, se observaron promedios de multiplicación semejantes en las dos variedades de crisantemo en estudio.



Figura 3. Plantas *in vitro* de Crisantemo.



Figura 4. Plantas de Crisantemo en vivero.

Micropropagación masiva de Etilingera elatior

Esta planta tiene gran demanda a nivel mundial por sus propiedades ornamentales (flores de gran tamaño, de colores rosadas o rojas) y medicinales (antihipertensivo, antimicrobiano, antioxidante y promotor de la actividad antitumoral) (1). Para satisfacer esta demanda se han establecidos diversos protocolos de cultivo *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith, mejor conocida como Bastón del Emperador o Antorcha (Zingiberaceae) para su producción masiva (4). Se extrajeron y desinfectaron

yemas (tamaño 1,5 cm) (explante) de plantas de Bastón del Emperador mantenidas en vivero. Luego se cultivaron en el medio constituido por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962) (8), suplementado con tiamina 0,4 mg/l, inositol 100 mg/l, sacarosa 30 g/l, 5 mg/L de benciladenina (BA) y 3 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), solidificado con agar 8 g/L. Los explantes fueron incubados bajo luz continua (**Fig. 5**). La etapa de enraizamiento se logró en un medio de cultivo sin sustancias de crecimiento. Para la etapa de aclimatación se utilizaron dos tipos de sustratos: 1.- Tierra abonada y 2.- Tierra abonada, turba y arena. Las plantas que se sembraron en tierra abonada presentaron un mayor crecimiento con respecto a las sembradas en tierra con turba y arena, sin importar en que medio de cultivo (MS2, MS3, MS4) se obtuvieron las plantas *in vitro* (**Fig. 6**).

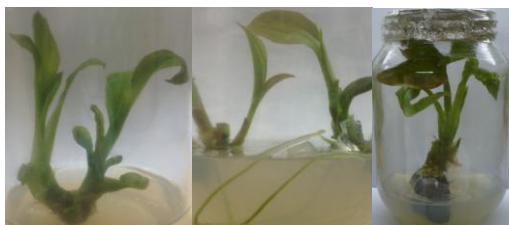


Figura 5. Plantas *in vitro* de *Etiligera elatior*. (Bastón del Emperador)



Figura 6. Plantas de Bastón del Emperador en vivero.

Microorganismos beneficiosos en la aclimatación de vitroplantas de la leguminosa forrajera Calopogonium sp.

Calopogonium sp. es una leguminosa forrajera nativa de las sabanas del estado Guárico, de utilidad por ser comestible para el ganado y enriquecer el suelo con Nitrógeno al descomponerse (9). Por requerirse esta planta en una cantidad importante para la siembra en los sistemas agrícolas de la zona, consideramos

como alternativa la producción de vitroplantas de *Calopogonium sp.* para obtenerlas de manera masiva y rápida en sustitución de las semillas, de difícil obtención. Una vez obtenidas las vitroplantas, se realizó un estudio en microcosmos, en condiciones de invernadero, con un suelo de baja fertilidad proveniente de Santa María de Ipire, Estado Guárico. Se inocularon las vitroplantas con los microorganismos *Rhizobium phaseoli* (R) y hongos Glomeromycota nativos que foman micorrizas arbusculares (MA), por separado o en combinación; se incluyó un tratamiento control sin inoculación (SM), a fin de evaluar si estos microorganismos facilitaban su sobrevivencia en la etapa de aclimatación (3).

Las vitroplantas de *Calopogonium sp.* mostraron adecuada biomasa foliar, caulinar y radical, parámetros con mayores valores según el orden de inoculación MA+R; MA; R; SM respectivamente. Las vitroplantas de *Calopogonium sp.* presentaron estructuras nodulares típicas de *R. phaseoli* (hasta un 85 %) y valores de colonización por MA hasta un 45%, indicando que la inoculación con *R. phaseoli* y los hongos Glomeromycota nativos fue efectiva tanto de forma individual como conjunta y que favoreció la aclimatación de las vitroplantas, ya que se registró una sobrevivencia de 10 % hasta 6 meses después del transplante a tierra (**Fig. 7**).

La aplicación de las micorrizas arbusculares y de un rizobio afín a las vitroplantas de *Calopogonium sp.* favoreció su establecimiento en tierra y podría asumirse como una práctica rutinaria en la aclimatación de vitroplantas de esta especie (2).



Figura 7. Raíces de *Calopogonium sp.* con estructuras nodulares.

Agradecimientos

Estas investigaciones han sido financiadas por el Proyecto PEII. N° 201300629 (ONCTI).

Referencias

1. **Abdelmageed, A.H.A., Faridah, Q.Z., Norhana, F.M.A., Julia, A.A. y Midhzar, A.K.** (2011). Micropropagation of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud. **J. Med. Plant. Res.** 5(18): 4465-4469.
2. **Allen, O.N. y Allen, E.K.** (1981). The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin. Press, Madison.
3. **Azcón-Aguilar, C., Cantos, M., Troncoso, A. y Barea, J.M.** (1997). Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticultural.** 72: 63-71.
4. **Gomes Dias, G., Pasqual, M. y Carvalho, A.C.P.** (2013). Indução de calos embriogénicos em bastão do imperador in vitro. **Scientia Agraria Paranaensis.** 12: 293-300.
5. **Gutiérrez, F., Archila, M. Arias, L. y Juárez, N.** (2010). Optimization of growth regulators and silver nitrate for micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. with the aid of a response surface experimental design. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,** 46(1): 57-63.
6. **Markovic, M., Popovic, M. y Vilotic, D.** (2013). Micropropagation of *Dianthus deltoides* L. through shoot tip and nodal cuttings culture.. **Archives of Biological Sciences,** 65: 17-22.
7. **Márquez, J., Cova, L. y Tovar, R.** (2001). Análisis de correspondencias múltiples en un cultivo *in vitro* de *Crysanthemum*. **Ciencia** 9(3): 334-344.
8. **Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-479.
9. **Mora, E., Toro, M. y López-Hernández, D.** 2013. A survey of arbuscular mycorrhizae, rhizobium and phosphate solubilizing bacteria in low fertility savanna soils in Central Venezuela (Estación Experimental la Iguana). En: **Soil microbiology.** M. Miransari (Ed.) Studium Pressll C, Houston Tx, USA. Pp. 97-114.
10. **Villalobos, V., y Thorpe, T.** (1993). Propagación: conceptos, metodología y

resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia: 127-143.

Factores que afectan la propagación industrial *in vitro* de café en variedades de interés comercial

ANDREA MENÉNDEZ-YUFFÁ¹, LUIS HERMOSO-GALLARDO¹, HIRANI HUGLE-MISLE²,
TERESA E. VARGAS³, BILAL EL AYOUBI⁴

¹Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal, ³Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental, ²Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA)-Táchira.
Correo-e: andrea.menendez@ciens.ucv.ve

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo producido tradicionalmente en forma ecológica por pequeños productores en el país. La propagación *in vitro* de esta planta se ha desarrollado durante varias décadas en el laboratorio, debido a que dichos métodos son útiles en la conservación de germoplasma, el mejoramiento y para la multiplicación industrial de variedades comerciales, sin embargo, aún quedan aspectos que deben ser perfeccionados para realizar el escalamiento a nivel industrial en el país. En la presente investigación se determinó que es importante el tiempo de almacenamiento de las hojas antes de sembrarlas, siendo óptimo pre-incubarlas durante 1 día en condiciones de humedad, porque disminuye la contaminación y aumenta la embriogénesis somática en alta frecuencia, al compararla con 0, 2, 3 y 6 días de almacenamiento. Se logró una aclimatación exitosa de las vitroplantas en los viveros del IBE, utilizando botellas de refresco modificadas, esta situación fue óptima para mantener la humedad elevada que las vitroplantas requieren en esta etapa, y además fue una solución sencilla, económica y amigable con el ambiente, ya que se reciclan envases que de otro modo serían de desecho y contaminan el ambiente.

Introducción

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo producido tradicionalmente en forma ecológica por pequeños productores en el país. La propagación *in vitro* de esta planta se ha desarrollado durante varias décadas en el laboratorio, debido a que dichos métodos son útiles en la conservación de germoplasma, el mejoramiento y para la multiplicación industrial de variedades comerciales, sin embargo, aún quedan aspectos que deben ser perfeccionados para realizar el escalamiento a nivel industrial en el país.

Para establecer y mantener un tejido vegetal en cultivo *in vitro*, sea con fines de investigación o en la producción comercial de plantas, es esencial que los cultivos establecidos *in vitro* estén libres de contaminantes biológicos y sean mantenidos en condiciones asépticas (1), ya que la contaminación puede perjudicar el establecimiento de los tejidos y causar pérdidas en los cultivos ya establecidos, Cassells (1) considera que la contaminación microbiana de los cultivos de tejidos se debe a la alta disponibilidad de nutrientes presente en el medio universalmente usado de Murashige y Skoog (5). Según Lazo-Javalera (3), el procedimiento de desinfección depende de varios factores, incluyendo la planta madre, su edad, el cultivar y el genotipo; también influye el origen y condiciones de crecimiento de las plantas madres, si éstas se

encuentran en vivero o si son de campo, en el caso de tejidos de plantas de campo con muchos microorganismos de suelo y el ambiente es necesario buscar métodos alternativos para obtener tejidos estériles que permitan establecer un protocolo de cultivo de tejidos.

En la presente investigación se trabajó con plantas mantenidas en los jardines del IBE y con material de campo, se estudió el efecto en la desinfección de algunos fungicidas comerciales, y un factor que no se había considerado anteriormente y del cual no encontramos reportes en la literatura, que es la pre-incubación de las hojas en condiciones de humedad.

En este trabajo también se continuaron investigaciones sobre la aclimatación y crecimiento de las vitroplantas de café, sustituyendo el uso de propagadores por envases de refresco modificados.

Materiales y Métodos

Explantos de hoja de las variedades Catimor, Catuai y cinco genotipos promisorios del INIA-Táchira fueron desinfectados y sembrados en el medio básico de Murashige y Skoog (5) según los procedimientos previamente descritos por Menéndez-Yuffá y García (4). Previamente a la desinfección, se aplicaron distintos tiempos (0, 1, 2, 3 y 6 días) de pre-incubación de las hojas en bolsas plásticas con una pequeña cantidad de agua, durante el proceso de

desinfección se incluyeron tratamientos con los fungicidas comerciales Ridomil®, Kocide® y Vitavax®, para determinar su efecto en la contaminación con hongos que es el principal problema que presenta este cultivo para el establecimiento *in vitro*. La aclimatación de las vitroplantas obtenidas por la germinación de embriones somáticos, se llevó a cabo transfiriéndolas a un sustrato constituido por tierra abonada esterilizada por calor, el sustrato se colocó previamente en envases de refresco modificados para este fin (se recortaron las botellas, se les hicieron orificios para permitir el drenaje del agua de riego y se dejaron destapadas para el intercambio gaseoso), de esta forma se logró mantener las plantas con una humedad elevada. La primera etapa de la aclimatación se llevó a cabo en uno de los viveros del Instituto de Biología Experimental con baja incidencia de luz, y luego se transfirieron a otro vivero donde hay mayor incidencia de luz solar, aunque con cierta sombra natural debida a la vegetación circundante.

Resultados y discusión

Un factor que afecta la desinfección de los tejidos que se van a cultivar *in vitro*, es el origen de los mismos (vivero o campo) y las condiciones de crecimiento, por ejemplo, cuando se trabaja con plantas de vivero, éstas se pueden realizar controles fitosanitarios previos a la siembra, esta situación no siempre es posible en el caso de tratarse de plantas silvestres o de un árbol creciendo en campo como el café, por lo cual, se probaron algunos factores para tratar de disminuir los niveles de contaminación en los cultivos iniciales de café, también debe tenerse en cuenta que el tratamiento de desinfección debe mantener un equilibrio con la viabilidad y posterior desarrollo de los tejidos *in vitro*, es decir, para la desinfección se utilizan compuestos que afectan a los microorganismos pero simultáneamente son tóxicos para los tejidos. En los experimentos realizados se obtuvieron desde 24 % hasta un 91 % de explantes iniciales contaminados con hongos y bacterias, el principal problema fue la contaminación con hongos, sin embargo, no se observaron diferencias en la incidencia de los mismos al aplicar tratamientos con los diferentes fungicidas ya mencionados. La pre-incubación de las hojas en condiciones de humedad, se comenzó a aplicar por la necesidad de traer material vegetal de localidades alejadas del laboratorio, al realizar ensayos preliminares se observó que dicho tratamiento parecía tener efecto en los niveles de contaminación, así como también en la frecuencia de inducción de embriogénesis somática en alta frecuencia. El mejor resultado se obtuvo al

pre-incubar las hojas durante un día antes de la siembra, ya que se presentó menor contaminación por hongos que al sembrar inmediatamente o después de 2, 3 y 6 días, cuando las hojas se incubaron por tiempos mayores, especialmente a los 6 días, la contaminación bacteriana pasó a ser mayor que la debida a los hongos, pero ningún explante de aquellos cuyas hojas fueron pre-incubadas 6 días sobrevivió a la contaminación, ni tampoco fue posible su establecimiento *in vitro*. Posteriormente, se observó que la pre-incubación tuvo un efecto sobre la diferenciación de embriones somáticos en alta frecuencia, siendo mayor al aumentar los días de pre-incubación, sin embargo, considerando que la contaminación es mayor a partir de los dos días, recomendaríamos hacer una pre-incubación de un día. El efecto de la pre-incubación en la contaminación, puede deberse a que esta condición permite la germinación de esporas que luego son eliminadas más eficientemente durante el proceso de desinfección, tenemos previsto realizar ensayos para comprobar esta hipótesis. La influencia positiva de la pre-incubación en la inducción de embriogénesis somática en alta frecuencia (Fig. 1), puede estar relacionada con el hecho de que la embriogénesis somática es generalmente favorecida por condiciones de estrés (2,6).

Se innovó en el método para la aclimatación de vitroplantas de café, ya que en vez de utilizar propagadores, los cuales se encuentran limitados en cantidad, ocupan espacio y representan un costo de construcción, se utilizaron envases de refresco modi-

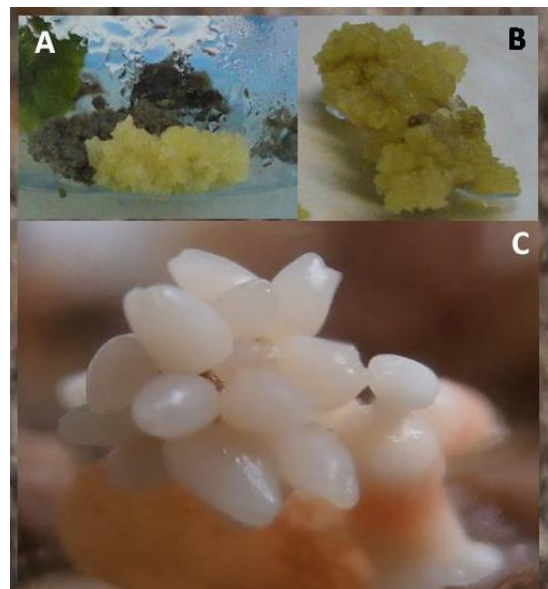


Fig. 1. Callo altamente embriogénico de la variedad Catimor (A); callo altamente embriogénico de la variedad Catuai (B) y embriones somáticos en alta frecuencia (C).

ficados, estos envases permitieron mantener la humedad elevada que las vitroplantas requieren en esta etapa, y constituyeron una solución sencilla, económica y que incluye el reciclaje de desechos contaminantes. Las vitroplantas de café se aclimataron bien en las nuevas condiciones ensayadas (Figuras 2, 3, 4); sin embargo, consideramos que aún se deben mejorar las condiciones de crecimiento en vivero, ya que el crecimiento de las plantas es lento, lo cual puede deberse a las condiciones de iluminación demasiado baja en el primer vivero y el tiempo que las vitroplantas permanecieron en el mismo.



Fig. 2. Uso de envases de refresco en la aclimatación de Vitroplantas de café. s = semanas, m = meses

Conclusiones y recomendaciones

El efecto que tiene la pre-incubación de las hojas de café antes de la desinfección y aislamiento de los explantes, es un factor muy interesante que debe estudiarse con mayor detalle, ya que además de lo novedoso, es un tratamiento que puede disminuir la necesidad de utilizar componentes tóxicos en el proceso de desinfección.

La pre-incubación de las hojas de café en un ambiente húmedo durante un día antes de la desinfección y siembra *in vitro*, tuvo el efecto de disminuir la contaminación de los explantes y mejorar la inducción de embriogénesis somática en alta frecuencia.

El uso de envases de refresco modificados fue adecuado para el trasplante a suelo y para la primera etapa de aclimatación de vitroplantas de café.



Fig. 3. Secuencia de la aclimatación de vitroplantas de café (envase nro. 6). s=semanas, m= meses

Agradecimientos

Al CDCH-UCV por el financiamiento para realizar la presente investigación (Proyecto de grupo PG-03-7661-2009-2). Al Dr. Hervé Etienne del CIRAD-Francia por el asesoramiento y valiosas discusiones durante la investigación.



Fig. 4 . Secuencia de la aclimatación de vitroplantas de café (envase nro. 11). s=semanas, m= meses

Referencias

1. **Cassells, A.C.** (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue cultura. **Methods Mol Biol.** **877:** 57-80.
2. **Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S. y Kamada, H.** (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** **34:** 107-114.
3. **Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M.E., Martínez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A. y Rivera-Domínguez, M.** (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. **Springer Plus** **5:** 453-462.
4. **Menéndez-Yuffá, A. y García de García, E.** (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma,** **199:** 208-214.
5. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiol.** **15:** 473-497.
6. **Zavattieri, M.A. y Frederico, A.M.** Lima, M. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology** **13:** 1-9.

Autoincompatibilidad en especies de *Bauhinia* L. (Fabaceae: Caesalpinioideae) en Venezuela

OMAIRA HOKCHE¹ Y NELSON RAMIREZ²

¹Herbario Nacional de Venezuela, Instituto Experimental Jardín Botánico Dr. Tobías Lasser, Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela. Correo-e:

omaira.hokche@ucv.ve, ohokche@gmail.com ²Laboratorio de Biología Reproductiva.

Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas -

Venezuela. Correo-e: nramirez220252@gmail.com

Se estudió el sistema reproductivo de seis especies de *Bauhinia* creciendo en diferentes localidades del territorio nacional como un aporte al conocimiento de la subfamilia Caesalpinioideae en el país. Se realizaron diferentes pruebas experimentales controladas, en flores aisladas. Se encontró que las especies analizadas son autoincompatibles, produciendo frutos sólo por fertilización cruzada, a excepción de *B. unguolata* que produjo frutos por autofertilización, por lo que puede ser considerada parcialmente autocompatible. Todas las especies presentaron una alta relación P/O, lo que concuerda con lo señalado para especies xenógamas. Los resultados apoyan la asociación entre la autoincompatibilidad y el carácter leñoso de las plantas y permite sugerir el carácter ancestral de la incompatibilidad en género *Bauhinia*.

Introducción

Las Leguminosae constituyen la segunda familia más importante en Venezuela, precedida por las Orchidaceae (5). Tiene distribución casi cosmopolita, y ocupa un amplio rango de hábitats. Actualmente se reconoce una sola familia, Fabaceae, con tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (8), que se diferencian principalmente por sus flores y ciertas características de las semillas. Las Caesalpinioideae son el grupo menos conocido a nivel taxonómico y filogenético (14) y se distinguen por presentar el pétalo posterior distinto a los cuatro restantes, con una prefloración imbricada ascendente (1). En Venezuela, el género *Bauhinia* constituye el tercero más abundante (27 especies) después de *Senna* (47 especies) y *Macrolobium* (35 especies), y representa 9,7% de las especies de Caesalpinioideae que se encuentran en el país (16). Algunas especies son utilizadas como fuente de alimento, en la medicina, en la producción de fibras, como ornamentales, en la industria maderera, y son pioneras en la regeneración de bosques (14). No obstante, son muy escasos los estudios del sistema reproductivo de las especies de *Bauhinia* (2,4,7,10,11,12). En *Bauhinia*, las especies son frecuentemente lianas, árboles o arbustos; se distribuyen en las regiones cálidas del mundo y están ampliamente distribuidas en Venezuela. Las flores hermafroditas, aunque pueden ocurrir flores unisexuales (12), con cinco pétalos ligeramente irregulares, diez estambres, legumbre oblonga o lineal, bivalvada o indehisciente (14). Las flores de las especies neotropicales de *Bauhinia* son

zigomorfas, exhiben una gran diversidad de formas, tamaños y colores, son fragantes, producen néctar y presentan adaptaciones a diferentes síndromes de polinización (6). Reportes sobre la biología reproductiva muestran que las especies de *Bauhinia* son autoincompatible o parcialmente incompatibles (2,4,7,10,11,12). De acuerdo a lo anterior, la autoincompatibilidad en *Bauhinia* parece un carácter ancestral en este género. Con la finalidad de contribuir a establecer las tendencias evolutivas de la reproducción en *Bauhinia*, el objetivo de este trabajo fue determinar el sistema reproductivo de seis especies de dos secciones diferentes.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en diferentes localidades en Venezuela (Tabla 1).

Sistema reproductivo. Un programa de cruces controlados (13,15) fue empleado para determinar el sistema reproductivo. En flores aisladas de la actividad de polinización natural, procedentes de un mínimo de cinco plantas individuales, el número de frutos fue cuantificado en las siguientes pruebas: 1- Agamosperma, yemas emasculadas, 2- autopolinización espontánea, yemas aisladas, 3- autopolinización, yemas aisladas y autopolinizadas en la antesis, y 4- polinización cruzada, yemas emasculadas y polinizadas con polen de otros individuos de la misma especie durante la antesis. Además se determinó la polinización natural, la formación de frutos en un número conocido de flores expuestas a la polinización bajo condiciones naturales. Los niveles de incompatibilidad genética

fueron determinados mediante el índice de Autoincompatibilidad (IAI), dividiendo el número

Tabla 1. Áreas de estudio de especies de *Bauhinia* en Venezuela

Especie	Localidad de estudio	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)
<i>B. aculeata</i> L.	Arboretum de la Escuela de Biología UCV, Bello Monte, Estado Miranda	10°30' N, 66°53' O	1100
<i>B. glabra</i> Jacq.	Arboretum de la Escuela de Biología UCV, Bello Monte, Estado Miranda	10°30' N, 66°53' O	1100
<i>B. multinervia</i> (Kunth) DC.	A lo largo del río Los Caracas, Los Caracas, Estado Vargas	10°37' N, 66°34' O	8
<i>B. pauletia</i> Pers.	Cercanías de San Sebastián de Los Reyes, Estado Aragua	9°56' N, 67°10' O	200
<i>B. rutilans</i> Spruce ex Benth.	Parque Nacional Henri Pittier, Aragua	10°21' N, 67°41' O	1100
<i>B. unguolata</i> L.	Estación Biológica de Los Llanos, Edo. Estado Guárico	8°56' N, 67°25' O	75

promedio de frutos producidos por flor autofertilizada manualmente entre el número promedio de frutos producido por flor por medio de fertilización cruzada manual. Valores iguales a 1 indican que la planta es autocompatible, entre 1 y 0 que la autocompatibilidad es parcial, e iguales a 0 autoincompatibilidad (13). La eficacia reproductiva, definida como el rendimiento reproductivo bajo máximas condiciones de polinización, se determinó comparando el porcentaje de frutos por fertilización cruzada con el número de frutos en condiciones naturales (13,15). Es una medida de la actividad de los polinizadores en condiciones naturales en especies xenogamas.

Relación Polen/Óvulo (P/O). La relación Polen/Óvulo se estimó para cada especie de acuerdo a la metodología descrita por Lloyd (9), cuantificando el número de granos de polen por antera, y el número promedio de óvulos y estambres por flor, en 100 yemas florales provenientes de un mínimo de cinco individuos.

Resultados

Las especies de *Bauhinia* analizadas se ubican en dos secciones: Pauletia, la cual incluye árboles (*B. aculeata*, *B. multinervia*, *B. pauletia*, *B. unguolata*), y Tyloataea que incluye lianas (*B. glabra*, *B. rutilans*) (17). Todas las especies presentaron 5 estambres largos y 5 estambres cortos, a excepción de *B. pauletia* con cinco estambres del mismo largo.

Sistema reproductivo. Los resultados de los cruces controlados indican que todas las especies de *Bauhinia* estudiadas son autoincompatibles; es decir, solo se produjeron frutos por medio de fertilización cruzada (Tabla 2), tampoco fue detectada autopolinización espontánea ni agamosperma. El índice de Autoincompatibilidad (IAI= 0) es propio de especies autoincompatibles, a excepción de *B. unguolata* (IAI= 0,25) que puede ser considerada parcialmente autoincompatible; no obstante, todas

estas especies son xenógamas y requieren de un agente para la transferencia de polen.

Eficacia reproductiva. El porcentaje de frutos/flor formado por fertilización cruzada fue mayor al obtenido por polinización natural, salvo en *Bauhinia aculeata*. La eficacia reproductiva fue 2,8 veces mayor en las especies de la sección Pauletia (árboles) que en las de la sección Tyloataea (lianas) ($t_{28}= 3,75$; $p<0,05$). Esto indica que el porcentaje de frutos formados en condiciones naturales en las especies de lianas fue menor al formado por fertilización cruzada.

Relación Polen/Óvulo. El número de óvulos y de granos de polen por flor fue comparativamente mayor en las especies arbóreas. No obstante, la relación polen/óvulo fue mayor en las especies de lianas y varió desde 1026,23 hasta 2893,59, y en las arbóreas desde 2039,37 hasta 2815,93 (Tabla 3). Aun cuando la relación P/O entre ambas secciones taxonómicas fue estadísticamente significativa ($t_{29}= 9,51$; $p < 0,05$), las especies están catalogadas dentro de la misma categoría y corresponden a especies xenógamas (3).

Discusión

El sistema de autoincompatibilidad encontrado en las especies de *Bauhinia* concuerda con estudios previos donde las especies de *Bauhinia* son autoincompatibles o parcialmente autoincompatibles (2,4,7,10,11,12), lo cual sugiere que la autoincompatibilidad es el sistema reproductivo predominante en especies de *Bauhinia*. Además, la autoincompatibilidad en este género es corroborada por la alta relación P/O en especies de ambas secciones taxonómicas, característica de especies xenógamas (3).

La polinización cruzada obligatoria encontrada en *Bauhinia* y su relación con los altos valores de la relación P/O también se corresponde con los resultados obtenidos respecto a los mecanismos de polinización (6). Las especies arbóreas presentan

adaptaciones florales a la quiropterofilia [excepto *B. aculeata* que es polinizada por un sistema

generalista de insectos diurnos y nocturnos (6)] y las

Tabla 2. Sistema reproductivo de seis especies de *Bauhinia*. AF = autolinización manual, FC = polinización cruzada, PN = polinización natural

Sección Especie	N° Flores polinizadas			N° Frutos producidos			% Frutos/flor		Eficacia reproductiva	IAI
	AF	FC	PN	AF	FC	PN	FC	PN		
Pauletia										
<i>B. aculeata</i>	13	15	23	0	7	14	44,67	60,87	1,36	0,00
<i>B. multinervia</i>	13	5	24	0	3	13	60,00	54,16	0,90	0,00
<i>B. pauletia</i>	6	14	369	0	7	59	50,00	15,99	0,32	0,00
<i>B. unguolata</i> *	126	97	310	14	57	53	58,76	17,09	0,29	0,25
X (DE)									0,70 (0,49)	
Tylotaea										
<i>B. glabra</i>	12	14	148	0	6	19	42,85	10,81	0,25	0,00
<i>B. rutilans</i>	22	15	524	0	2	18	13,33	3,44	0,26	0,00
X (DE)									0,25 (0,01)	

* Datos recalculados de Ramírez *et al.* (12), IAI = Índice de Autoincompatibilidad

Tabla 3. Número de granos de polen/flor, número de óvulos/flor y relación Polen/Óvulo en seis especies de *Bauhinia*

Sección Especie	N° granos polen/antera		N° de granos polen/flor*	N° de óvulos/flor X (DE)	Relación Polen/Óvulo
	Estambres Largos X (DE)	Estambres Cortos X (DE)			
Pauletia					
<i>B. aculeata</i>	1656 (282,7)	927 (151,8)	12915	7,09 (0,77)	1821,57
<i>B. multinervia</i>	4987 (654,9)	4313 (550,8)	46500	16,07 (1,60)	2893,59
<i>B. pauletia</i>	4300 (338,2)	----	21500	20,95 (2,49)	1026,25
<i>B. unguolata</i>	2613 (372,9)	2738 (480,5)	26755	20,33 (1,94)	1316,04
X (DE)	3389(1526,3)	2659,33 (1694,4)	26917,5 (14246,9)	16,11 (6,39)	1764,36 (821,43)
Tylotaea					
<i>B. glabra</i>	949 (48,8)	605 (79,5)	7770	4,12 (1,02)	2039,37
<i>B. rutilans</i>	1025 (142,9)	1025 (197,1)	10250	3,64 (0,56)	2815,93
X(DE)	987 (582,1)	815 (376,6)	4397,5(7772,5)	3,88 (0,26)	2427,65(1811,65)

* [(Estambres Largos x N° estambres/flor) + (Estambres Cortos x N° estambres/flor)]

especies de lianas a la entomofilia o entomofilia-ornitofilia como el caso de *B. rutilans* (6). Las especies quiropterofílicas (arbóreas) tienen una floración más larga comparadas con las lianas, que presentan una floración masiva asociada a una polinización entomofílica (6). La floración extendida en las especies de la sección Pauletia está asociada con un bajo número de flores que abren por inflorescencia cada noche, lo que reduce la posibilidad de geitonogamia y promueve un mayor número de cruces compatibles. Es bien conocido que en especies autoincompatibles la autopolinización produce una reacción de autoincompatibilidad que bloquea la posibilidad en la producción de frutos y semillas. De acuerdo a lo anterior, en las especies quiropterofílicas los murciélagos realizan muchos cruces y por tanto la producción de frutos es mayor. En contraste, las especies de la sección Tylotaea presentan una fenología de floración más corta y un mayor número de flores son producidas por inflorescencia por día, las cuales son polinizadas por un número variado de insectos (6) que puede ser

considerado como un sistema de polinización polifílico. La condición de polinización generalista polifílica asociada a una floración masiva en las especies trepadoras de *Bauhinia* permite un mayor número de autocruces, lo cual conduce a una menor cantidad de frutos producidos naturalmente. La reacción de autoincompatibilidad por los autocruces puede entonces estar asociada con la menor cantidad de frutos producidos en la sección Tylotaea del género *Bauhinia*.

Con base a estos mismos argumentos, la mayor relación P/O encontrada en las especies trepadoras (Sección Tylotaea) podría también estar asociada o con el sistema de polinización polifílico que requiere de mayor producción de polen que las especies con un sistema de polinización más especializado, como la quiropterofilia. Sin embargo, la producción de polen y el número de óvulos por flor son mayores en las especies de la sección Pauletia que en las especies de la sección Tylotaea. Este paralelismo sugiere una correlación numérica entre la producción de polen y

óvulos por flor que resulta en una elevada relación polen/óvulo en ambos grupos taxonómicos.

La mayor eficacia reproductiva encontrada en las especies arbóreas de *Bauhinia* en comparación con las especies trepadoras puede ser relacionada con: 1- una transferencia más efectiva de polen en las especies de la sección Pauletia comparada con el sistema generalista-polifílico de las especies de la sección Tylotaea. 2- La mayor relación P/O en las especies de la sección Pauletia. 3- La floración extendida en las especies de la sección Pauletia que garantiza una mejor distribución de los recursos para reproducción comparada con las especies de la sección Tylotaea con floración masiva.

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan las ideas propuestas respecto a la asociación entre la alta frecuencia de autoincompatibilidad y el carácter leñoso de las especies. Además, también sugieren que la autoincompatibilidad en *Bauhinia* podría ser considerado un carácter ancestral en el género, lo que requiere de muchos estudios sobre los sistemas reproductivos de especies de *Bauhinia* así como estudios filogenéticos.

Referencias

1. **Cárdenas, L.** (1998). Taxonomía de las Leguminosas. p. 19–31. En: Viera Díaz, J. y Marín Chirinos, D. (eds.). Un programa integral de investigación en Leguminosas. **Memorias de Taller. Universidad Central de Venezuela, Vicerrectorado Académico, Caracas.**
2. **Bawa, K.S.** (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution** **28**: 85-92.
3. **Cruden, R.W.** (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution** **31**: 32-46.
4. **Heithaus, E.R., Opler, P.A. y Baker, H.G.** (1974). Bat activity and pollination of *Bauhinia pauletia*: Plant-pollinator coevolution. **Ecology** **55**: 412-419.
5. **Hokche, O. y Berry, P.E.** (2008). Análisis florístico. En: Hokche, O., Berry, P.E. y Huber, O. (eds.). **Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela.** pp. 69-109. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas.
6. **Hokche, O. y Ramírez, N.** (1990). Pollination ecology of seven species of *Bauhinia* L. (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Ann. Missouri Bot. Gard.** **77**: 559– 572.
7. **Lau, Y., Ramsden, C.P.L. y Saunders, R.M.K.** (2005). Hybrid origin of “*Bauhinia blakeana*” (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. **Amer. J. Bot.** **92**: 525-533.
8. **Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M.** (2005). Introduction. En: Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M. (eds.). **Legumes of the World** (pp. 1-12. The Royal Botanic Gardens, Kew.
9. **Lloyd, D.G.** (1965). Evolution of self-incompatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). **Contr. Gray Herb. Harvard Univ.** **195**: 3-133.
10. **Munin, R.L., Teixeira, R.C. y Sigrist, M.R.** (2008). Esfingofilia e sistema de reprodução de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae: Caesalpinioideae) em cerrado no Centro-Oeste brasileiro. **Rev. Bras. Bot.** **31**: 15-25
11. **Neto, H.F.P.** (2013). Floral biology and breeding system of *Bauhinia forficata* (Leguminosae; Caesalpinioideae), a moth-pollinated tree in Southeastern Brazil. **Bras. J. Bot.** **36**: 55-64.
12. **Ramirez, N., Sobrevila, C., De Enrech, N.X. y Ruiz-Zapata, T.** (1984). Floral biology and breeding system of *Bauhinia benthamiana* Taub. (Leguminosae), a bat-pollinated tree in Venezuelan “Llanos”. **Amer. J. Bot.** **71**: 273-280.
13. **Ruiz_Zapata, T. y Arroyo, M.TK.** (1978). Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica** **10**: 221-230.
14. **Quiñones, L.M.** (2005). Leguminosae Subfamilia Caesalpinioideae. pp. 301–328. En: Forero, E. y Romero, C. (eds.). Estudios en Leguminosas colombianas. **Acad. Colombia Cien. Exact. Fis. Nat. Bogotá.**
15. **Sobrevila, C. y Arroyo, M.T.K.** (1982). Breeding systems in a mountain tropical cloud forest in Venezuela. **Pl. Syst. Evol.** **140**: 19-37.
16. **Stergios, B., Klitgaard, B.B. y Redden, K.M.** (2008) Caesalpiniaeeae. En: Hokche, O., Berry, P.E. y Huber, O. (eds.). Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. **Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela.**
17. **Stuard da Fonseca Vas, A.M.** (1979). Consideracoes sobre a taxonomía do genero *Bauhinia* L., sect. Tylotaea Vogel (Leguminosae-Caesalpinioideae) do Brasil. **Rodriguesia** **31**(51): 127-234.

Biología floral de las angiospermas de un humedal con *Copernicia tectorum*

YENI BARRIOS Y NELSON RAMÍREZ

Laboratorio de Biología Reproductiva de Angiospermas, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas – Venezuela. Correo-e: yenicelste@gmail.com

Algunas características de los humedales (aislamiento geográfico y/o ecológico, baja especificidad de polinizadores, alta proporción de especies herbáceas) pueden promover la autogamia en las plantas. Con el objetivo de evaluar la importancia de este sistema reproductivo en una comunidad inundable, diferente de la vegetación seca circundante, se estudió la biología floral de 25 especies en condiciones naturales. El sistema sexual, el tipo de unidad de polinización (UP), las dimensiones florales, los atrayentes y recompensas de la flor, el horario de antesis, la longevidad floral, la existencia de dicogamia y/o hercogamia fueron descritos para cada especie. También se estimó la relación polen/óvulo y se examinó la presencia de autopolinización espontánea. La mayoría de las especies fueron hermafroditas y mostraron UP individualistas con dimensiones mayores a 0,5 cm de diámetro y/o largo, colores y/o aromas atractivos para la fauna antófila, elevada relación polen/óvulo, producción de néctar y otros productos como recompensas. La antesis fue mayormente diurna. Aunque las flores fueron predominantemente homogamas y no hercogamas, así como poco longevas, solo dos especies presentaron autopolinización. De acuerdo con estos resultados, la xenogamia es el sistema reproductivo más importante en esta comunidad, aparentemente no existen presiones de selección que promuevan la reproducción autógena.

Introducción

La alogamia, xenogamia o polinización cruzada constituye la forma de reproducción sexual más común en comunidades de plantas tropicales (2, 3,4,18). Este sistema evita los efectos deletéreos de la endogamia y aumenta la variabilidad genética dentro de las poblaciones. A pesar de estas ventajas y de la eficiencia de los polinizadores, muchas especies presentan sistemas autógamos y/o apomícticos que garantizan la producción de semillas si falla la polinización cruzada (5,11). Incluso existen situaciones en que estos constituyen el principal sistema reproductivo. La presencia del sistema autógeno, por ejemplo, está ampliamente descrita en especies herbáceas y/o de vida corta (5,9,11,14), así como en numerosas familias de plantas acuáticas y de humedales (1,17,19,22). Las situaciones de aislamiento geográfico y/o ecológico, la presencia de polinizadores poco frecuentes o poco especializados y la existencia de sistemas de autocompatibilidad en especies herbáceas y/o de vida corta, son algunos de los factores que favorecen la adquisición de este sistema reproductivo (14).

Algunas características comunes en las plantas autógamas incluyen la presencia de flores hermafroditas, generalmente de dimensiones pequeñas y baja relación polen/óvulo (5). Esto se debe a que la inversión de recursos pre fertilización en estructuras de atracción a los polinizadores y

estructuras sexuales masculinas es reducida en estas flores como resultado de la mayor eficiencia en la transferencia del polen. La longevidad floral también puede reducirse por esta razón así como la separación espacial y temporal de las funciones sexuales (13,15). El interés particular de este trabajo estuvo centrado en estudiar la biología floral de las especies de una comunidad inundable, diferente de la vegetación seca circundante, y determinar si los atributos de las flores favorecen la xenogamia o reflejan adaptaciones relacionadas con la reproducción autógena.

Métodos

Área de estudio. El estudio fue realizado en un humedal boscoso de aproximadamente 80,83 ha de superficie, formado por la desembocadura del Río Mene en terrenos arcillosos, de poca pendiente, en la costa oriental del Lago de Maracaibo, Venezuela (10° 27' Lat. N., 71° 27' Long. O.). El clima del área es cálido y seco. La precipitación media anual es 570,46 mm, la evapotranspiración media anual es 2430,72 mm y la temperatura media mensual es 28,7°C. El promedio mensual de la profundidad del agua es 12,3 cm. La salinidad del agua varía entre 0,1-1,2 g/l, el pH entre 6,8-8,32 y la concentración de oxígeno disuelto entre 1,62-3 g/l. El sustrato sobre el que se desarrolla la vegetación presenta pH ácido (4,25-5,57) y bajo porcentaje de carbono orgánico (0,39-1,02 %). *Copernicia tectorum* constituye el elemento florístico

más representativo del humedal (1). Esta especie es característica de las planicies costeras, estacionalmente anegadas, del Lago de Maracaibo. Generalmente forma manchas mono específicas de tamaño y densidad variable pero puede estar igualmente entremezclada con especies típicas de bosque muy seco tropical, de bosque ribereño y de herbazales inundables (8).

Biología floral. La biología floral de 25 especies de plantas fue estudiada en condiciones naturales. Para cada especie se determinó el sistema sexual (hermafrodita, monoico, dioico), el tipo de unidad de polinización (UP) (flor, inflorescencia), las dimensiones de la UP (diámetro externo y largo), el atrayente principal de la UP (color principal y adicional de las flores, aromas, perfumes), la oferta de recompensas como néctar, polen o partes florales, el horario de antesis, la longevidad floral, la existencia de dicogamia y/o hercogamia en la flor.

Relación polen/óvulo. La relación P/O fue estimada en 21 de las especies dividiendo el número promedio de granos de polen por flor entre el número promedio de óvulos. El número de granos de polen por flor fue determinado utilizando el método descrito por Lloyd (10). El número de óvulos por flor fue cuantificado en 100 yemas florales y posteriormente promediado. La relación P/O refleja la probabilidad de que suficientes granos de polen se depositen en el estigma, por lo tanto, mientras más eficiente resulta la transferencia del polen, la relación P/O se hace menor (5). Así, valores P/O altos indican xenogamia y valores bajos autogamia (5), aunque una baja relación P/O también podría reflejar un comportamiento apomítico.

Autopolinización espontánea. La presencia de autopolinización espontánea fue puesta a prueba en 16 de las especies estudiadas a través del aislamiento de 50 yemas florales con bolsas de material sintético hasta la maduración de los frutos. La producción de frutos en condiciones naturales también fue evaluada a partir del seguimiento de un número similar de flores en antesis. La comparación entre la proporción de frutos producidos de manera espontánea con los producidos por polinización natural permitió determinar la importancia de la autopolinización en la reproducción de las plantas. Esta comparación fue realizada a través de una prueba χ^2 (chi-cuadrado) ($\alpha=0,05$).

Resultados

Biología floral. El sistema sexual más frecuente fue el hermafroditismo (Hermafroditas $n=21$; 84,00%; Monoicas $n=2$; 8,00%; Dioicas $n=2$; 8,00%). Las flores fueron la unidad de polinización predominante (Flor $n=19$; 76,00%; Inflorescencia $n=6$; 24,00%). Las flores e inflorescencias que funcionaron como

unidades de polinización midieron entre 0,23 – 10,98 ($\bar{x}=2,34$) cm de diámetro y 0,29 – 8,32 ($\bar{x}=2,10$) cm de largo. La mayoría de las unidades de polinización fueron conspicuas, con colores ($n=23$; 92,00%) y/o aromas ($n=9$; 33,33%) atractivos para la fauna antófila. Los colores principales de las flores fueron blanco ($n=13$; 56,52%), amarillo ($n=5$; 21,73%) y rojo-rosado ($n=5$; 21,73%). Los aromas fueron mayormente dulces ($n=7$; 70,00%). Las esencias perfumadas ($n=2$; 20,00%) y con olor a fruta fermentada ($n=1$; 10,00%) estuvieron presentes en menor proporción.

El néctar fue la principal recompensa floral de las especies estudiadas ($n=18$; 58,06%), seguida de polen ($n=12$; 38,0%) y partes florales ($n=1$; 3,22%). La antesis fue principalmente diurna ($n=22$; 88,00%). Las especies con antesis nocturna fueron poco frecuentes ($n=3$; 12,00%). La mayoría de las flores tuvieron una longevidad corta, con una duración de un día ($n=11$; 64,70%) o una noche ($n=2$; 11,76%) dependiendo del momento de la antesis; las flores más longevas fueron menos comunes ($n=4$; 23,52%). La mayoría de las flores fueron adicogamas (adicogamia $n=17$; 89,47%; dicogamia $n=2$; 10,52%) y no hercogamas (No hercogamas $n=19$; 82,60%; hercogamas $n=4$; 17,39%).

Relación polen/óvulo. La relación P/O de la mayoría de las especies fue alta lo que indica, de acuerdo con el criterio de Cruden (5), predominancia de sistemas xenogamos ($n=9$; 42,85%) o xenogamos facultativos ($n=4$; 19,04%). Las especies que presentaron índices P/O bajos, indicativos de autogamia facultativa ($n=5$; 23,80%) o autogamia obligada ($n=3$; 14,28%), fueron poco frecuentes.

Autopolinización espontánea. La producción de frutos de la mayoría de las especies de plantas fue dependiente de la actividad de los polinizadores ($n=14$; 87,50%). Sólo dos (12,50%) de las especies analizadas (*Ludwigia leptocarpa* y *Nymphaea ampla*) mostraron autopolinización espontánea. En estas especies la proporción de frutos producidos en las flores aisladas no difirió de la de las flores polinizadas naturalmente ($p=1$).

Discusión

La mayoría de las especies de plantas del humedal estudiado presentaron características florales relacionadas con la xenogamia (5,6): dimensiones mayores a 0,5 cm de diámetro y/o largo, colores y/o aromas atractivos para la fauna antófila, elevada relación polen/óvulo, producción de néctar y otros productos como recompensas para los visitantes. Además, fueron totalmente dependientes de los polinizadores para la producción de frutos.

Posiblemente la distribución relativamente homogénea que presentan estas unidades de vegetación a lo largo de las costas del Lago de Maracaibo (8), la elevada frecuencia de visitas que se registran en las flores y la dominancia de especies perennes en esta comunidad favorecen este sistema reproductivo (Barrios, datos no publicados). Aunque no debe descartarse, dada la dominancia de flores hermafroditas, homogamas y no hercogamas; la existencia de autopolinización facilitada (11) en las especies que mostraron dependencia de los polinizadores para la reproducción. La cantidad de polen propio depositada por los polinizadores sobre los estigmas puede ser muy alta sobre todo cuando estos son poco especializados (11). Por lo tanto, si no existieran barreras de autoincompatibilidad, esta podría ser junto con la geitonogamia una vía de reproducción autogama.

Por otra parte, la proporción de especies que muestran autopolinización espontánea en esta comunidad podría estar subestimada debido a que en algunas de las especies herbáceas (*Ammania auriculata*, *Lemna aequinoctialis*, *Pistia stratiotes*), sufruticosas (*Ludwigia erecta*, *Neptunia plena*) y arbustivas (*Sesbania exasperata*), la mayoría con baja relación polen/óvulo, no fueron realizados experimentos de exclusión de yemas florales. Estas especies, al igual que *Ludwigia leptocarpa* y *Nymphaea ampla*, tienen alta capacidad de colonización (21), estrategia frecuentemente asociada con la reproducción autogama (5,9,20) y con el éxito reproductivo que presentan estas plantas en humedales y/o ambientes acuáticos (1,14,17,19,22).

Otro de los aspectos de la biología floral frecuentemente asociado con el tipo de sistema reproductivo de las especies es la duración de la antesis. Algunos autores (13,15) han señalado que las especies autogamas y/o apomícticas tienden a producir flores de vida corta, con longevidades iguales o menores a un día. Sin embargo, otros autores han encontrado patrones similares de antesis en comunidades predominantemente xenogamas con alta eficiencia de polinizadores (7,12,16). Posiblemente la especificidad y predictibilidad de la polinización por abejas en esta comunidad (Barrios, datos no publicados), en concordancia con los autores anteriormente citados, ha seleccionado esta característica de las flores al igual que otros aspectos de la biología floral relacionados con la melitofilia (6). Por ejemplo: la antesis diurna, las formas florales poco profundas; y la disposición de las flores en unidades de polinización individualistas. Aunque estos caracteres, al igual que la dominancia del blanco como color principal de las flores, han sido asociados

con la polinización por insectos pequeños en general (15,16).

Los resultados registrados en este trabajo permiten concluir que las adaptaciones florales de la mayoría de las especies estudiadas favorecen la xenogamia. Las características de las flores, predominantemente entomófilas, reflejan la selección impuesta por los insectos antófilos. Asimismo, la producción de frutos en la mayoría de las especies requiere de la intervención de estos vectores. De aquí, la importancia de conservar las interacciones planta-polinizador en esta comunidad. Estas garantizan la reproducción y mantienen la diversidad genética de las poblaciones de plantas allí establecidas.

Referencias

1. **Barrios, Y. y Ramírez, N.** (2008). Depresión por exogamia y biología reproductiva de *Nymphaea ampla* (Salisb.) DC. (Nymphaeaceae). **Acta Bot. Venez.** 31 (2): 539-556.
2. **Bawa, K.S.** (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution** 28: 85-92.
3. **Bawa, K.S., Perry, D.R. y Beach, H.** (1985). Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **Amer. J. Bot.** 72: 331-345.
4. **Bullock, S.H.** (1985). Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica** 17: 287-301.
5. **Cruden, R.** (1977). Pollen - ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution** 31: 32-46.
6. **Faegri, K. y van der Pijl, L.** (1979). **The principles of Pollination Ecology.** Pergamon Press, New York.
7. **Frankie, G.W., Haber, W.G., Opler, P.A. y Bawa, K.S.** (1983). Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest. En: C. E. Jones & R. J. Little (Eds), **Handbook of Experimental Pollination Biology:** 411-447. New York: Scientific and Academic Editions.
8. **Huber, O. y Oliveira-Miranda, T.** (2010). Ambientes terrestres de Venezuela. En: J.P. Rodríguez, F. Rojas-Suárez y D. Giraldo Hernández (eds). **Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela.** Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela). Caracas, Venezuela. Pp: 29-89.
9. **Lemus-Jiménez, J.L. y Ramírez, N.** (2005). Sistemas reproductivos de las plantas en tres hábitats de la planicie costera de Paraguaná. **Rev. Biol. Trop.** 53(3-4): 415-430.

10. **Lloyd, D.** (1965). Evolution of self compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). **Contr. Gray Herb.** **195**: 3 -134.
11. **Lloyd, D. y D. Schoen.** (1992). Self-and cross fertilization in plants. I. Functional dimensions. **Int. J. Plant Sci.** **153**(3): 358-369.
12. **Percival, M.** (1974). Floral ecology of Coastal Scrub in Southeast Jamaica. **Biotropica** **6**: 104-129.
13. **Primack, R.B.** (1995). Longevity of individual flowers. **A. Rev. Ecol. Syst.** **16**: 15-37.
14. **Ramírez, N. y Brito, Y.** (1990). Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan llanos. **Amer. J. Bot.** **77**(19): 1260-1271.
15. **Ramírez, N. y Brito, Y.** (1992). Pollination biology in a palm swamp community in the Venezuelan Central Plain. **Bot. J. Linn. Soc.** **110** (4): 277 - 302.
16. **Ramírez, N., Gil, C., Hokche, O., Seres, A. y Brito, Y.** (1990). Biología floral de una comunidad arbustiva tropical en la Guayana Venezolana. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **77**: 383-397.
17. **Raven, P. H.** (1979). A survey of reproductive biology in Onagraceae. **New Zealand Journal of Botany** **17**(4): 575-593.
18. **Ruiz-Zapata, T. y Arroyo, M.T.K.** (1978). Plant reproductive ecology of a secondary deciduous forest in Venezuela. **Biotropica** **10**: 221-230.
19. **Sculthorpe, C.D.** (1967). **The biology of aquatic vascular plants.** Arnolf, London, 610 pp.
20. **Sobrevila, C. y Arroyo, M.T.K.** (1982). Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. **Pl. Syst. Evol.** **140**: 19-37.
21. **Velásquez, J.** (1994). **Plantas acuáticas vasculares de Venezuela.** Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 992 pp.
22. **Wiersema, J.** (1988). Reproductive biology of *Nymphaea* (Nymphaeaceae). **Ann. Missouri Bot. Gard.** **75**: 795-804.

Sistema reproductivo de *Dimorphandra macrostachya* Benth. ssp. *macrostachya* (Fabaceae, Caesalpinioideae)

NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO

Laboratorio de Biología Reproductiva de Angiospermas, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: nramirez220252@gmail.com

La biología reproductiva de *D. macrostachya macrostachya* fue estudiada en el Parque Nacional Canaima, Sector Gran Sabana. Las pruebas experimentales indican autoincompatibilidad, alta relación polen/óvulo y una relación de biomasa floral masculina/femenina mayor de uno, típico de plantas con entrecruzamiento obligado. Observaciones puntuales sugieren que esta especie es polinizada por aves (Passeriformes) que se alimentan de los estaminodios y transportan polen en pico, cabeza y patas. La muy baja producción de frutos y semillas puede ser asociada con la forma de vida arbórea, polinización limitada, autoincompatibilidad y el alto costo de frutos leñosos.

Introducción

Dimorphandra macrostachya es un árbol de 30-40 metros alto en bosques o de 3 a 8 metros de altura en áreas abiertas, dominante en bosques primarios no perturbados y bosques ligeramente perturbados por la quema en la Gran Sabana (5). Además, *D. macrostachya* es una especie fijadora de nitrógeno que contribuye al mejoramiento de los suelos degradados (8). Desde el punto de vista utilitario, la madera de esta especie es empleada para construcciones en general (8). A pesar de la importancia ecológica y utilitaria de *D. macrostachya* muy poco es conocido acerca de su biología, específicamente sobre la forma de reproducción que garantiza la sobrevivencia y permanencia como elemento dominante en los bosques de la Gran Sabana. De acuerdo a la forma de vida arbórea, *D. macrostachya* podría tener un sistema reproductivo autoincompatible (15), y una eficiencia reproductiva baja (12). La producción de frutos también podría ser explicada por las hipótesis basadas en la aptitud masculina (16).

Por otra parte, los atributos reproductivos deberían estar en concordancia con la cantidad de semillas dispersadas. En este sentido, una alta cantidad de semillas de *D. macrostachya* han sido recolectadas en trampas ubicadas en los bosques del gradiente bosque-sabana (7), la cual podría estar relacionada con la abundancia de esta especie en el bosque (5). La presente investigación propone determinar los parámetros asociados con los niveles de eficiencia reproductiva natural con base al sistema reproductivo, modo de polinización y síndrome de dispersión de semillas de *D. macrostachya macrostachya*.

Materiales y Métodos

Área de Estudio. El área de estudio está ubicada en el Parque Nacional Canaima, sector Gran Sabana, al

sudeste del Estado Bolívar, cuenca Alta del río Caroní. Específicamente, el estudio fue realizado en un matorral ubicado en la parte posterior de la Estación Científica de Parupa en las cercanías del río Apongua, confluencia con el río Parupa. Esta comunidad es considerada como una comunidad secundaria, denominada matorral o vegetación de transición (9). Este sitio no ha sido periódicamente perturbado, dada su cercanía a la Estación Científica de Parupa. Este matorral está conformado por especies arbustivas y herbáceas y, en menor proporción árboles de bajo porte (13). Los análisis experimentales y observaciones fueron realizados en seis individuos de relativo bajo porte que crecían en el borde del bosque asociado al matorral.

Estrategia reproductiva.

Las flores fueron caracterizadas de acuerdo a: 1- hercogamia, la separación de las anteras y estigmas durante la anthesis y 2- dicogamia, la separación temporal en la maduración sexual, la cual fue establecida en condiciones de campo.

El sistema reproductivo fue determinado de acuerdo a un programa pruebas de controladas (15): 1- Agamospermia. Yemas florales emasculadas fueron aisladas para establecer la posible producción de frutos y semillas sin fertilización. 2- Polinización automática. Las flores fueron aisladas en estado de yemas hasta la formación de frutos y semillas. 3- Autocompatibilidad. Yemas aisladas y autopolinizadas manualmente durante la anthesis permitieron determinar la capacidad de producir frutos y semillas por autopolinización. 4- Polinización cruzada. Yemas emasculadas, polinizadas con polen procedente de plantas diferentes durante la anthesis y posteriormente aisladas hasta la producción de frutos y semillas, permite cuantificar la eficiencia de la polinización cruzada. La efectividad de cada prueba de polinización fue determinada como: 1- la relación

fruto/flor (frutos producidos por prueba entre el número total de flores) y 2- la relación semilla/óvulo (número total de semillas producidas por prueba entre el número total de óvulos, estimado multiplicando el número de flores por el número promedio de óvulos/flor).

La relación polen/óvulo fue estimada de acuerdo a la metodología descrita (10). El número de granos de polen por flor fue estimado usando cámaras de Neubauer con volúmenes conocidos de dilución. El número de granos de polen por antera fue estimado como el promedio de tres preparaciones y el número de granos de polen por flor fue establecido multiplicando el número de granos de polen por antera por el número promedio de anteras por flor, el cual se cuantificó en yemas florales. La relación polen/óvulo se estimó dividiendo el número de granos de polen por flor entre el número promedio de óvulos por flor.

Eficiencia natural. La producción de frutos fue establecida dividiendo los valores promedios de frutos por infrutescencia y flores por inflorescencia. El número de óvulos por flor fue determinado en flores de diferentes individuos. El número de semillas totales por fruto y el número de semillas abortadas (reconocidas por su tamaño notablemente más pequeño, mal formadas o aplastadas) por fruto fue determinado en frutos maduros. La producción de semillas por óvulo se determinó como la relación entre el número promedio de semillas totales dividido entre el número promedio de óvulos por flor. La fecundidad relativa fue determinada como la fracción de semillas formadas por ovulo por inflorescencia (11).

Asignación de biomasa a estructuras reproductivas. El peso seco del cáliz, corola, androceo, gineceo y de la flor fue determinado para diez flores en una estufa a 40°C hasta peso constante. Además se determinó la biomasa seca de los estaminodios.

Biología floral y polinización. La biología floral fue caracterizada con relación a: 1- La unidad de polinización fue caracterizada de acuerdo a la organización de las flores en la inflorescencia, número de flores abiertas por inflorescencia y al comportamiento de los polinizadores durante la visita (14). 2- El tipo floral fue establecido (6). 3- El color de las flores en el campo. Además, se determinó el tipo de fragancia y recompensa (polen o néctar). 4- Los visitantes florales y su comportamiento fueron registrados mediante observaciones puntuales.

Características de frutos y semillas y dispersión. El peso de frutos y semillas fue determinado en 20 replicas. Con esta información se determinó la relación pericarpio/semilla. El síndrome de dispersión de semillas fue establecido de acuerdo a

la morfología de las diásporas (17) y reportes previos a nivel de género o especie.

Resultados

Las flores de *D. macrostachya macrostachya* son adicogamas y las anteras están separadas del estigma, hercogamas (0,17cm), además, las anteras tienen una dehiscencia extrorsa lo que contribuye con evitar la contaminación del estigma con polen de la misma flor (ver figura 1A).

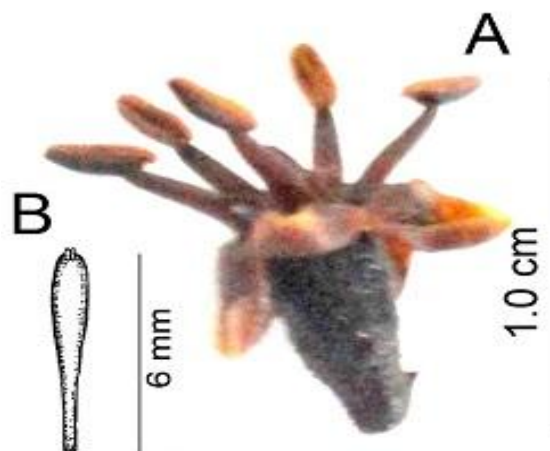


Figura 1. Fotografía de la flor (A) y diagrama del estaminodio (B)

Sistema reproductivo. La producción de frutos y semillas solo ocurrió para la polinización cruzada, lo cual evidencia que *D. macrostachya macrostachya* es una especie autoincompatible (Tabla 1).

Tabla 1. Número y porcentaje de frutos y semillas producidas de las pruebas controladas de polinización

Prueba	Flores		Frutos		Semillas	
	N	N	% ⁽¹⁾	N	% ⁽²⁾	
Agamospermia	100	0	0	0	0	
Polinización espontanea	1244	0	0	0	0	
Autopolinización manual	37	0	0	0	0	
Polinización cruzada	34	4	11,76	28	9,48	

⁽¹⁾porcentaje relativo al número de flores; ⁽²⁾porcentaje relativo al número óvulos (ver métodos)

Relación polen/óvulo. Las flores de *D. macrostachya macrostachya* tienen cinco estambres fértiles. Las anteras contienen 9780,0 granos de polen y el total de de granos de polen por flor fue 48900. La relación polen/óvulo de 5627,2 concuerda con especies xenogamas (4).

Asignación de biomasa floral. La distribución de la biomasa de los verticilos florales muestra que la mayor biomasa es asignada al cáliz y androceo, y que la biomasa del perianto es mayor al de las esporofilas (Tabla 2). Por otra parte, la relación androceo/gineceo mayor que uno indica un sesgo a la función masculina.

Tabla 2. Biomasa seca de flores, frutos y semillas de *D. macrostachya macrostachya*

Atributo	N	X(DS)	%
Biomasa androceo (mg)	10	2,43(0,15)	29,07
Biomasa gineceo (mg)	10	1,20(0,09)	14,35
Biomasa corola (mg)	10	1,87(0,15)	22,37
Biomasa cáliz (mg)	10	2,84(0,44)	33,97
Biomasa flor (mg)	10	8,36(0,69)	-
Relación androceo/gineceo	-	2,03	-
Relación esporofilas/perianto	-	-	-
Biomasa fruto (gr)	20	19,42(4,86)	-
Biomasa semilla (gr)	20	0,27(0,04)	-
Biomasa semilla/fruto	-	1,93	-
Relación pericarpio/semilla	-	9,06	-

Eficiencia natural. La producción de frutos por flor fue muy baja, asociada a un alto número de flores por inflorescencia y muy bajo número de frutos por infrutescencia. En contraste, la relación semilla/óvulo fue alta (Tabla 3). Los valores de semillas abortadas por fruto son variables con una media menor a uno y un porcentaje relativamente bajo (Tabla 3). La eficiencia en la producción de frutos y semillas por polinización cruzada entre la eficiencia en la producción de frutos y semillas naturalmente resultó muy alta en ambos casos (98,0 y 105,3 respectivamente). La fecundidad relativa, la producción de semillas por óvulos por inflorescencia expresada en porcentaje también constituyó un valor muy bajo (0,09%).

Características de frutos y semillas y dispersión. Los frutos de *D. macrostachya macrostachya* son legumbres leñosas explosivas por la desecación. Las legumbres son pesadas y contienen de 3 a 10 semillas ovoides-oblongas de (1,07 x 0,7cm). La biomasa de semillas por frutos es muy baja en comparación con la biomasa del fruto, lo cual produce una relación pericarpio/semilla comparativamente alta. De acuerdo a las características del fruto y semillas, el síndrome de dispersión es por balística (17). Además, semillas de otra especie de *Dimorphandra* son dispersadas por grandes mamíferos (1), lo cual también podría ocurrir en *D. macrostachya macrostachya*.

Tabla 3. Eficiencia reproductiva natural de *D. macrostachya macrostachya* (Porcentajes calculados con base a los valores promedios)

Carácter	N	Rango	X(DS)
Nº flores/inflorescencia	110	313-4812	1907,4(914,5)
Nº frutos/infrutescencia	102	0-10	2,31(1,76)
Frutos/flor (%)	-	-	0,12
Nº semillas/fruto	71	3-10	7,16(1,51)
Nº semillas abortadas/fruto	71	0-7	0,96(1,39)
Nº óvulos/flor	100	8-9	8,69(0,47)
Semillas/óvulo (%)	-	-	82,39
Semillas abortadas (%)	-	-	13,41

Biología floral y polinización. Las inflorescencias de *D. macrostachya macrostachya* son corimbos de espigas dispuestas horizontalmente en forma de perchas, cada una de 20 a 40cm largo. Las flores son coriáceas y sésiles de color anaranjado llamativo

dispuestas apretadamente sobre un eje grueso formando un cilindro con numerosas flores abiertas simultáneamente (29% del total) con los estambres exertos que sobresalen formando una unidad de polinización tipo cepillo (6). Las flores son pequeñas (Fig. 1A) con un cáliz formando un tubo de 1.8mm largo y un diámetro de 2.5mm con el estigma a la misma altura del cáliz. El androceo tiene cinco estambres fértiles y cinco estaminodios de forma ligeramente cónica (Fig. 1B), de consistencia blanda y succulentos con abundante líquido ligeramente dulce.

Visitantes florales. Observaciones puntuales de los visitantes florales, mostraron que las inflorescencias de *D. macrostachya macrostachya* son visitadas por himenópteros [abejas (*Apis mellifera*) y avispas] que transportan polen. Las inflorescencias también fueron visitadas por aves. Sin embargo, solo pudimos observar con detalle a *Coereba flaveola* (Passeriforme), la cual se posa sobre las inflorescencias y consume los estaminodios, impregnándose en pico, cabeza y patas de polen.

Discusión

Las características del sistema de apareamiento indican que *D. macrostachya macrostachya* está adaptada a la polinización cruzada. La autopolinización es evitada por la hercogamia y por la dehiscencia extrosa de las anteras. La autopolinización es impedida por la autoincompatibilidad genética que solo permite la reproducción por exocruces. Dos parámetros adicionales refuerzan la condición xenogama: 1- la alta relación polen/óvulo corresponde con especies xenógamas (4) y 2- la mayor inversión de biomasa en el androceo comparada a la biomasa del gineceo sugiere autoincompatibilidad. Es esperado que la asignación de biomasa floral masculina tienda a disminuir con el incremento en los niveles de autocompatibilidad (3).

Polinización. De acuerdo a las características morfológicas de las flores e inflorescencias, así como el comportamiento observado de los visitantes florales, la polinización en *D. macrostachya macrostachya* es realizado por aves Passeriformes. El comportamiento observado en *Coereba flaveola* permite postular el siguiente mecanismo de polinización: las aves se desplazan sobre las inflorescencias llamativas de color anaranjado, consumen los estaminodios y transportan polen sobre el pico, cabeza y patas. La textura coriácea de las flores y los estigmas inclusos en el cáliz, evita que las aves dañen los estigmas y permite que el polen transportado en las patas esté disponible para la polinización.

Eficiencia reproductiva. La baja producción de frutos, semillas y la fecundidad en *D. macrostachya macrostachya* puede ser asociada a: 1- la autoincompatibilidad, donde la autopolinización puede reducir el número de cruces exitosos (16), 2- deficiencia de polinización, demostrado por comparativa baja producción de frutos relativo a la producción de frutos por exocruces controlados, 3- el alto costos de los frutos parece limitar la cantidad que pueden desarrollarse por infrutescencia (16). La alta relación pericarpio/semilla, revela mayor inversión en el pericarpio de los frutos, lo cual contrasta con la propuesta de que el uso más económico de los recursos maternos ocurre empaquetando tantas semillas como sea posible, reduciendo el costo de la pared del fruto (2). Probablemente, la alta inversión en un pericarpio leñoso y resistente esté relacionada con la protección de las semillas, lo cual podría estar ocurriendo a expensa de la reducción en la eficiencia reproductiva. La forma de vida arbórea, la función masculina de las flores hermafroditas y la alta producción de flores para la atracción de polinizadores son parámetros que pueden también estar limitando la producción de frutos (16), semillas y la fecundidad relativa.

Dispersión de semillas.

El flujo de semillas de *D. macrostachya* pareciera estar restringidos a los bosques y severamente limitado hacia áreas de la sabana (7). Los mecanismos de dispersión por balística y por mamíferos (1) sugieren dispersión a largas distancias, a menos que solo este operando la dispersión balística. La dispersión por grandes mamíferos podría estar limitada por la reducción de la fauna por cacería, lo cual es común en el área de estudio.

Agradecimientos

A la CVG, Autoridad Gran Sabana y personal de la Estación Científica de Parupa por el apoyo logístico.

Referencias

- Bizerril, M.X.A., Rodrigues, F.H.G. y Hass, A.** (2005). Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) by the lowland tapir in the cerrado of Central Brazil. **Braz. J. Biol.** **65**: 407-413.
- Bookman, S.S.** (1984). Evidence for selective fruit production in *Asclepias*. **Evolution** **38**: 72-86.
- Charlesworth, D. y Charlesworth, B.** (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **18**: 237-268.
- Cruden, R.W.** (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution** **31**: 32-46.
- Dezseo, N., Chacón, N., Sanoja, E. y Picón, G.** (2004). Changes in soil properties and vegetation characteristics along a forest-savanna gradient in southern Venezuela. **Forest Ecol. Manag.** **200**: 183-193.
- Faegri, K., yvan der Pijl, L.** (1979). The principles of pollination ecology. Third Edition. Pergamon Press. Oxford.
- Flores, S. y Dezseo, N.** (2005). Variaciones temporales en cantidad de semillas en el suelo y en lluvia de semillas en un gradiente bosque sabana en la Gran Sabana, Venezuela. **Interciencia** **30**: 39-43.
- Gómez-Restrepo, M.L. y Toro-Murillo, J.L.** (2007). Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque húmedo tropical. Boletín Técnico Biodiversidad N°2. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia, Medellín, Colombia, 71pp.
- Hernández, L. y Fölster, H.** (1994). Vegetación de transición. En: N. Dezseo (ed.). Ecología de la Altiplanicie de la Gran Sabana (Guayana Venezolana). **Scientia Guianae** **4**: 118-144.
- Lloyd, D.G.** (1965). Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). **Contr. Gray Herb.** **195**: 3-134.
- Ramírez, N.** (1992). Las características de las estructuras reproductivas, niveles de aborto y semillas producidas. **Acta Cient. Venez.** **43**: 167-177.
- Ramírez, N.** (1993). Producción y Costo de frutos y semillas entre formas de vida. **Biotropica** **25**: 46-60.
- Ramírez N., Hokche, O. y Briceño, H.** (2012). Florística y grupos funcionales de plantas en comunidades herbáceo-arbustivas del sector Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. **Acta Bot. Venez.** **35**: 247-302.
- Ramírez, N., Gil, C., Hokche, O., Seres, A. y Brito, Y.** (1990). Biología floral de una comunidad arbustiva tropical en la Guayana venezolana. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **77**: 383-397.
- Ruiz-Zapata, T. y Arroyo, M.K.** (1978). Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica** **10**: 221-230.
- Sutherland, S. y Delph, L.F.** (1984). On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set. **Ecology** **65**: 1093-1104.
- van der Pijl, L.** (1972). Principles of dispersal in higher plants. Second Edition. Springer-Verlag, Berlin.

Mirmecocoría en especies de los Altos Llanos Centrales Venezolanos

NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO

Laboratorio de Biología Reproductiva de Angiospermas, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: nramirez220252@gmail.com

El transporte de semillas por hormigas fue determinado experimentalmente en ensayos de campo para 13 especies de plantas en los Altos Llanos Centrales Venezolanos. Inicialmente las semillas; fueron caracterizadas morfológicamente y la presencia de estructuras con contenido graso en la cubierta seminal (reactivas al Suddan III) fueron establecidas previo al estudio de campo. Los resultados del estudio de campo demostraron que las diásporas de las especies de plantas con estructuras grasas en la cubierta seminal fueron transportadas a los hormigueros por tres especies de hormigas. Además, frutos y plántulas de *Erythroxylum orinocense* y *Hyptis suaveolens* fueron encontradas en las cercanías de los hormigueros de (*Ectatomma ruidum* y *Atta sexdens*). Las semillas presentaron diferentes tipos de estructuras grasas en la cubierta seminal (funículos, carúnculas, arilos, y cubierta seminal grasa. Por otra parte, las especies de plantas mirmecócoras son principalmente herbáceas, y son más abundantes en áreas perturbadas y sabana, lo cual permite suponer que la dispersión por hormigas está asociada con la abundancia de especies herbáceas en hábitats perturbados en los Altos Llanos Centrales Venezolanos.

Introducción

La mirmecocoria es un mecanismo de dispersión de semillas ampliamente distribuido en comunidades templadas y tropicales. La frecuencia de la mirmecocoria puede ser comparativamente alta en zonas tropicales (2,6) y templadas (1). Sin embargo, la abundancia de especies de plantas dispersadas por hormigas en áreas neotropicales es menor (5,6,8,9, 12) al reportado para comunidades subtropicales (1) y tropicales de Australia (1). Uno de los factores que influencia la presencia de mirmecocoria a nivel comunitario es la forma de vida de las plantas y la condición sucesional de las comunidades. La dispersión por hormigas es muy frecuente en especies herbáceas (6,9,12) y comunidades secundarias o perturbadas (6). De acuerdo a lo anterior, la mirmecocoria en los Altos Llanos Centrales Venezolanos debe ser más abundantes en ambientes alterados donde son muy frecuentes formas de vida herbáceas son comunes (10).

Uno de los aspectos más importantes en la dispersión de semillas por hormigas es la adaptación de las diásporas, específicamente por la presencia de estructuras con contenido graso (elaiomas) o cualquier otra estructura asociada a las diásporas con grasa o contenido graso (13). Especies de plantas con estructuras grasas en sus diásporas son diagnosticadas como mirmecócoras, sin embargo, la confirmación de mirmecocoria es obtenida por observaciones de campo o ensayos experimentales donde se determine el transporte de las semillas por hormigas. De acuerdo a lo anterior, el presente estudio plantea confirmar que especies con diásporas con variada morfología en las estructuras grasas son

dispersadas por hormigas en los Altos Llanos Centrales Venezolanos. En esta localidad, se ha reportado un número importante de especies con síndrome mirmecócoro (11,4%; N. Ramírez, datos no publicados) con base a la presencia de grasa en diferentes estructuras presentes en la cubierta seminal de las semillas o en la superficie externa de los frutos. Además, en observaciones de campo fue establecido que las semillas de *Copaifera pubiflora*, especie con semillas ariladas y dispersada principalmente por aves y mamíferos, es también dispersada por hormigas en los Altos Llanos Centrales Venezolanos (11).

La diversidad de hábitats (bosque, ecotono, sabana y área perturbada), formas de vida de las plantas y la relación entre hábitat y forma de vida (especies herbáceas más abundantes en áreas perturbadas y sabana) en los Altos Llanos Centrales Venezolanos (10) permite evaluar la mirmecocoria en entre formas de vida y hábitats. La abundancia de mirmecocoria reportadas en especies herbáceas de diferentes hábitats de bosques subtropicales (1) y en comunidades tropicales (8,12), así como la ausencia en especies mirmecócoras en el dosel y muy escasa en el sub-dosel de bosques tropicales (7) permite postular que la mirmecocoria podría ser más abundante en ambientes dominados por hierbas en los Altos Llanos Centrales de Venezuela.

Materiales y Métodos

Área de Estudio. Este trabajo fue realizado en la Estación Biológica de los Llanos de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales, situada aproximadamente a 12 km. al sudeste de la ciudad de

Calabozo (8°56'N, 67°25'O), estado Guárico, Venezuela, a una altitud de 75 m y un clima con una precipitación anual que varía desde 779 a 1839 mm, y el promedio anual de temperatura es 27,6°C. El área de estudio había sido protegida del fuego y el pastoreo durante varias décadas antes de la realización del presente estudio. La estructura de la vegetación está representada por al menos cuatro tipos de vegetación (10): bosque (dominado por árboles), ecotono (área de transición entre el bosque y la sabana, sabana (área caracterizada por la presencia de especies de Poaceae) y áreas alteradas, producto de la actividad antrópica.

Adaptación a la dispersión por hormigas. Una muestra representativa de especies fue caracterizada con síndrome mirmecócoro por la presencia de excrecencias seminales o restos de tejido placentario graso presente en las semillas maduras, determinado por la prueba histoquímica del Sudán III, lo cual es un indicativo de la presencia de grasas. Las estructuras con contenido graso presentes en diásporas de las especies seleccionadas fueron clasificadas en: 1- pericarpio carnoso, 2- funículo, restos funiculares persistentes en las semillas, 3- carúncula, excrecencia sólida, 4- arilo, excrecencia de consistencia esponjosa y suave y 5- cubierta seminal, caracterizada por células epidérmicas o restos del endocarpio persiste en la superficie de la semilla.

Prueba de transporte de semillas. Las pruebas experimentales fueron realizadas durante dos periodos contrastantes del año: seco y lluvioso. En cada periodo cuatro hojas de papel de superficie corrugada fueron colocadas en el suelo y niveladas con tierra, para evitar impedimento entre el papel y el suelo. Estas hojas de papel fueron colocadas una en cada hábitat (Bosque, ecotono, sabana y área perturbada). En cada hoja de papel fueron colocadas diez semillas de cada una de las especies que habían sido caracterizadas en cuanto a la presencia de excrecencias o superficies reactivas al Saddán III. Las hojas fueron revisadas periódicamente por un intervalo de tres días y si las semillas habían sido removidas, estas eran reemplazadas. Las todas las hormigas que transportaban semillas a sus hormigueros fueron capturadas y preservadas en alcohol 70%. Posteriormente, las hormigas capturadas fueron enviadas a especialistas para su identificación. Adicionalmente, se realizaron censos de hormigueros en cada uno de los cuatro hábitats y se determinó la presencia de las semillas utilizadas en la prueba de remoción, así como de semillas y plántulas de otras especies.

Resultados

Las diásporas de un total de 15 especies de plantas pertenecientes a 8 familias de plantas fueron transportadas por hormigas en los Altos Llanos Centrales de Venezuela (Tabla 1). Las diásporas fueron removidas por un total de cinco especies de hormigas pertenecientes a la familia Formicidae. Las diásporas de trece especies fueron efectivamente transportadas por hormigas en los ensayos experimentales, mientras que las diásporas y plántulas de *Erythroxylum orinocense* y *Hyptis suaveolens* fueron encontradas en las adyacencias de los hormigueros de *Ectatomma ruidum* y *Atta sexdens* (Tabla 1).

Unidad de dispersión y adaptación a la dispersión por hormigas. La unidad de dispersión de las especies mirmecócoras fue la semillas para 14 especies y solo una especie presente el fruto como unidad de dispersión (Tabla 1). Los tipos de estructuras presentes en las diásporas de las especies dispersadas por hormigas fueron principalmente funículos o restos funiculares (N=7; 46,7%), seguido por carúnculas (N=4; 26,7%) y arilos (N=2; 13,3%); los menores valores fueron cubierta seminal con grasa (N=1; 6,7%) y pericarpio (N=1; 6,7%). En el caso de *Erythroxylum orinocense*, los frutos transportados a las cercanías de los hormigueros fueron despojados de su pulpa. Las semillas con funículos y carúnculas eran despojadas de estos apéndices, y el caso de especies con arilos pequeños y con epidermis seminal con grasa, estas no fueron totalmente despojadas de las estructuras grasas.

Formas de vida y hábitat de especies mirmecócoras. Las formas de vida más frecuentes fueron hierbas anuales (N= 7; 46,7%) y hierbas perennes (N= 7; 46,7%) y los menos frecuentes fueron los arbustos (N=1; 6,6%) para el total de 15 especies de plantas mirmecócoras estudiadas. La dispersión por hormigas fue encontrada más frecuentemente en el área perturbada (N= 9; 42,8%) y Ecotono (N= 7; 33,3), seguida por las plantas que crecen en la sabana (N=4; 19,1%). La frecuencia de especies mirmecócoras en el bosque fue la más baja de la muestra examinada (N= 1; 4,8%). La relación entre formas de vida y hábitat para las especies dispersadas por hormigas estudiadas mostro que la mayoría de las hierbas anuales (6 de 7 especies) crecían en el área perturbada, mientras que las hierbas perennes ocurrieron en la sabana (4 de 7 especies), área perturbada y ecotono (ver tabla 1).

Discusión

Las diásporas de 15 especies con diferentes tipos de estructuras grasas asociadas a las semillas o frutos son efectivamente dispersadas por hormigas en la vegetación de los Altos Llanos Centrales de

Tabla 1. Lista de especies de plantas, características ecológicas, morfología de las estructuras grasas y especies de hormigas dispersoras de semillas en los Altos Llanos Centrales Venezolanos.

Familia Especie	Forma de vida ¹	Unidad de dispersión	Tipo de atractivo reactivo al Suddan III	Habitat ²	Hormiga dispersante
Erythroxilaceae <i>Erythroxylum orinocense</i> *	AR	Fruto	Pericarpio (pulpa)	B;E	<i>Ectatomma ruidum</i> ; <i>Atta sexdens</i>
Euphorbiaceae <i>Croton lobatus</i>	HA	Semilla	Carúncula	P	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Croton trinitatis</i>	HA	Semilla	Carúncula	P	<i>Conomyrma</i> sp.
Fabaceae (Faboideae) <i>Eriosema rufum</i>	HP	Semilla	Arilo	S	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Eriosema simplicifolium</i>	HP	Semilla	Arilo	P	<i>Camponotus</i> sp.; <i>Conomyrma</i> sp.
Fabaceae (Caesalpinioideae) <i>Chamaecrista cultrifolia</i>	HP	Semilla	Funículo	E;S	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Chamaecrista diphylla</i>	HA	Semilla	Funículo	E	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Chamaecrista flexuosa</i>	HP	Semilla	Funículo	S	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Chamaecrista nictitans</i>	HA	Semilla	Funículo	E;P	<i>Conomyrma</i> sp.
<i>Chamaecrista serpens</i>	HP	Semilla	Funículo	P	<i>Conomyrma</i> sp.
Lamiaceae <i>Hyptis suaveolens</i> *	HA	Semilla	Funículo	E;S;P	<i>Ectatomma ruidum</i> ; <i>Atta sexdens</i>
<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	HA	Semilla	Funículo	P	<i>Conomyrma</i> sp.
Malvaceae <i>Melochia parvifolia</i>	HP	Semilla	Cubierta seminal	E;P	<i>Conomyrma</i> sp.; <i>Pheidole</i> sp.
Passifloraceae <i>Turnera ulmifolia</i> var. <i>intermedia</i>	HA	Semilla	Carúncula	P	<i>Camponotus lindigi</i> ; <i>Conomyrma</i> sp.; <i>Pheidole</i> sp.
Violaceae <i>Hybanthus calceolaria</i>	HP	Semilla	Carúncula	E;S	<i>Conomyrma</i> sp.; <i>Pheidole</i> sp.

1 = AR = arbusto, HA = Hierba anual, HP = Hierba perenne; 2 = De acuerdo a Ramírez (10): B = bosque, E = Ecotono, S = sabana, P = área perturbada. * Semillas y frutos despojados de funículos y pericarpio encontrados en las adyacencias de los hormigueros juntos con plántulas de las mismas especies.

Venezuela. Sin embargo, solo trece de las quince especies están claramente adaptadas a la dispersión por hormigas. Las otras dos especies están adaptadas a otros agentes de dispersión: *Hyptis suaveolens* es dispersada por epizoochoria (13) y en el caso de *Erythroxylum orinocense* los frutos rojos concuerdan con el síndrome ornitocórico (13). Las hormigas pueden actuar como dispersores secundarios de especies de plantas no mirmecócoras como Anacardiaceae, y Cactaceae (8), y en *Copaifera pubiflora*, la cual fue observada en la misma área de estudio (11). En estos casos, las hormigas son atraídas a las diásporas caídas en el suelo y retiran la pulpa de los frutos o arilos de las semillas durante el transporte al nido sin causar daño a las semillas (8,11). Este mecanismo secundario de dispersión, considerado de corta distancia, evita la depredación de semillas post-dispersión (11).

La dispersión por hormigas de *Erythroxylum orinocense* (este trabajo) y *Copaifera pubiflora* (11)

es realizada por especies del género *Atta* (Formicidae) en los Altos Llanos Centrales de Venezuela. El género *Atta* pertenece al grupo de hormigas podadoras, especializadas en coleccionar hojas y flores para el cultivo de hongos (4). El transporte efectivo de diásporas y desarrollo de plántulas en las cercanías de los nidos de las hormigas sugiere un mecanismo de dispersión efectivo. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar: 1- las características de atracción de estas hormigas, 2- si las plántulas que crecen en las cercanías de los hormigueros son consumidas por las hormigas y 3- la utilidad de la pulpa de frutos y arilos para especies del género *Atta*.

La incidencia de la dispersión por hormigas. Un bajo número de especies con síndrome mirmecócoro ha sido reportado en comunidades tropicales (6,9,12). Contrariamente, un gran número de especies de plantas son dispersadas por hormigas en

la Caatinga Brasileira (8), aunque muchas de las especies reportadas en esta comunidad no presentan las estructuras grasas típicas de la mirmecocoria. El número de especies mirmecócoras en la vegetación de los Altos Llanos Centrales Venezolanos es superior a los reportes de comunidades tropicales (6,9,12), a pesar que es solo una fracción de las especies con elaiosoma en el área de estudio (datos no publicados). La diversidad de especies mirmecócoras puede ser asociada a la diversidad de adaptaciones de atracción para las hormigas dispersoras (carúnculas, funículos, arilos y cubierta seminal con contenido graso) presentes en diferentes familias de plantas, lo cual sugiere diferentes niveles de adaptación morfológicas en concordancia con los grupos taxonómicos de plantas.

La forma de vida de las plantas y el estado sucesional de la comunidad parecen estar relacionados con la abundancia de la mirmecocoria en comunidades tropicales. La dispersión por hormigas es común en especies herbáceas de comunidades subtropicales (1) y tropicales (6,9,12). La relación de hábito herbáceo y la mirmecocoria en la vegetación de los Altos Llanos Centrales Venezolanos podría estar relacionada con la distancia de dispersión, la cual puede ser mayor de 11 metros (8). Esta distancia puede ser adecuada si consideramos que muchas de las especies herbáceas mirmecócoras son menores de medio metro de altura. La relación distancia de dispersión relativa a la altura de la planta puede representar una medida relativa de la efectividad de dispersión: especies de plantas de menor tamaño podrían tener una distancia de dispersión efectiva menor que plantas de mayor tamaño. De acuerdo a lo anterior, la abundancia de mecanismos de dispersión por hormigas en especies herbáceas podría estar también relacionada con el valor relativo de la distancia de dispersión.

La abundancia de hierbas mirmecócoras en áreas perturbadas sugiere que la dispersión por hormigas puede ser exitosa bajo condiciones de perturbación ambiental. La perturbación ambiental produce la desaparición de muchos de los mecanismos de dispersión bióticos de la comunidad. En ambientes perturbados proliferan los hormigueros (3) por la alteración del ambiente físico y biológico, lo cual podría promover la presencia de plantas con síndrome de dispersión mirmecócoras.

Agradecimiento

Gracias a la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales por facilitar la realización de esta investigación en la Estación Biológica de los Llanos.

Referencias

1. **Beattie, A.J. y D.C. Culver.** (1981) The guild of myrmecochores in the herbaceous flora of west Virginia forests. **Ecology** **62**:107-115.
2. **Berg, R.Y.** (1975) Myrmecochorous plants in Australia and their dispersal by ants. **Austr. J. Bot.** **23**: 475-508.
3. **Brown, K. S. Jr.** (1991) Conservation of neotropical environment; insects as indicators, p. 342-352. In N. M. Collins & J. Thomas (eds.). Conservation of insects and their habitats. Academic, San Diego.
4. **Cedeño-León, A.** 1984. Los bachacos: Aspectos de su ecología. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, Caracas, 73 pp.
5. **Escala-Jiménez, M.** (1994) Biología de diseminación de un bosque húmedo achaparrado (Cerro Copey, Isla de Margarita). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
6. **Escala, M. y N.X de Enrech** (1991) Estudio morfoanatómico de semillas mirmecócoras en un ecosistema semiárido Venezolano. **Orsis** **6**: 45-59.
7. **Kimmel, T.M., L.M. do Nascimento, D. Piechowski, E.V.S. Sampaio, M.J.N. Rodal & G. Gottsberger.** (2010) Pollination and seed dispersal modes of woody species of 12-year-old secondary forest in the Atlantic forest region of Pernambuco, NE Brazil. **Flora** **205**: 540-547.
8. **Leal, I.R.** 2003. Dispersão de sementes por formigas na caatinga. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C da Silva (eds.), pp. 593-624, Ecologia e Conservação da caatinga. Ed. Universitária da UFPE, Brasil.
9. **López, M. y N. Ramírez.** 1998. Síndromes de dispersión de diásporas de una comunidad arbustiva de la Guayana venezolana. **Ecotropicos** **11**: 15-32.
10. **Ramírez, N.** (2003) Diversidad de especies y estructura de la vegetación de una comunidad de sabana en los Altos Llanos Centrales Venezolanos. **Acta Biol. Venez.** **23**: 47-76.
11. **Ramírez, N. y M. K. de Arroyo.** 1982. Mecanismos de dispersión y dinámica de regeneración en *Copaifera pubiflora* Benth. (Caesalpinioideae) en los Altos Llanos Centrales de Venezuela. **Bol. Soc. Venez. Cienc. Nat.** **140**: 291-311.
12. **Ramírez, N. y Y. Brito.** 1988. Síndromes de dispersión de una comunidad de pantanos de palmeras (morichal) en los Altos Llanos Centrales Venezolanos. **Rev. Chilena Hist. Nat.** **61**: 53-60.
13. **van der Pijl, L.** (1972) Principles of dispersal in higher plants. Second Edition. Springer-Verlag, Berlin.

Respuestas ecofisiológicas y productiva del cacao Venezolano y Ecuatoriano al estrés

WILMER TEZARA^{1,2}, ANA HERRERA¹, JENNY DE ALMEIDA¹, MILTON BOLAÑOS² Y VICTOR REYNEL²

¹Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas; Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. Correo-e: wilmer.tezara@ciens.ucv.ve

²Facultad de Ciencias agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica Luis Vargas Torres,
Estación Experimental Múlite, Esmeraldas

Se estudió la respuesta fisiológica del cacao al déficit hídrico (DH), el anegamiento (AN) y el estrés lumínico, con la finalidad de identificar clones con un buen desempeño fisiológico y productivo. Se evaluó la fotosíntesis (A), conductancia estomática (g_s), eficiencia de uso de agua (EUA), eficiencia cuántica (Φ_{PSII}) y máxima (F_v/F_m) de diferentes clones en Venezuela y Ecuador. Se estudió el efecto del tipo de secado sobre características organolépticas de las almendras. El cacao fue sensible al DH y al AN; siendo F_v/F_m y EUA posibles indicadores de la tolerancia que poseen los clones de cacao a diferentes estreses. El cacao venezolano mostró bajas A a luz saturante y una alta Φ_{PSII} , característicos de un cultivo de sombra; mientras que en el cacao ecuatoriano, A fue mayor y se saturó a mayores intensidades lumínicas. Los clones de cacao mostraron aclimatación morfoanatómica y regulación descendente del aparato fotoquímico a altas intensidades lumínicas. Los clones ecuatorianos evaluados a plena exposición, en ambientes con baja demanda evaporativa tienen mayores A a las reportadas previamente en cacao a nivel mundial, lo cual se confirmó con un incremento del 38% en A medidos a $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que podría explicar parcialmente una mayor producción.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es considerado uno de los cultivos perennes más importantes a nivel mundial, con una producción estimada de 4,23 millones de toneladas en 2014/2015 (5). El Ecuador es el sexto productor de cacao a nivel mundial y el primero en Suramérica, siendo el primero en la producción de cacao fino de aroma, con una producción de 250.000 toneladas y un área de siembra de 500.000 ha (5); según la FAO el Ecuador aporta el 5% del cacao que se consume a mundial. Venezuela tan solo produce 19.400 toneladas, es decir, el 0,08% del cacao a nivel mundial (4). No obstante, debido a las características sensoriales (fino sabor y aroma) de los cacaos venezolanos y nacionales ecuatorianos, se exportan en mayor proporción en relación a otros tipos de cacaos de menor calidad.

Tanto Venezuela como Ecuador tienen una gran cantidad de cultivares (Criollos, Trinitarios y Forasteros); muchos de los Trinitarios resultan de la hibridación de Criollos y Forasteros. Muchas variedades Trinitarias, venezolanas y Amazónicas, fueron introducidas al Ecuador en la década de los 40, lo que condujo a que las plantaciones que mantenían la característica de sabor fino de aroma denominado “sabor arriba” propio del Ecuador se hayan mezclado con híbridos.

El cacao es una especie leñosa tropical nativa de los bosques lluviosos de la cuenca amazónica. En el occidente de Venezuela se encuentran cacaos Criollos puros (con un alto porcentaje de homocigocis); en el Ecuador, por el contrario, se puede decir que prácticamente no existe una variedad nacional genéticamente pura del cacao, pues lo que se encuentra es una mezcla de híbridos naturales que se agrupan en el complejo “Nacional x Trinitario” (6).

La variedad Nacional ecuatoriana es diferente por ser nativa y proviene de los declives orientales de la Cordillera de los Andes en la hoya amazónica y se conservó como exclusivo hasta 1890, cuando se inició la introducción de material de origen Trinitario desde Venezuela.

El cacao es sensible tanto al déficit hídrico (DH) como al anegamiento (AN), especialmente durante la etapa juvenil (2,3). En cuatro clones venezolanos en invernadero, después de 35 días de tratamiento se presentaron descensos en el potencial hídrico (Ψ) con el DH (66%) y el AN (23%). La A disminuyó en promedio 46 y 60% debido al DH y al AN, respectivamente, siendo el clon 447 el más susceptible al DH y el 415 el más susceptible al AN.

El análisis de componentes principales de las variables en plantas sometidas a DH en el campo y el vivero indicó que la mayor proporción de la

varianza quedó retenida en los dos primeros componentes. Las variables Ψ , g_s , A y eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}) se relacionaron positivamente con el primer componente y el coeficiente de extinción no fotoquímica (q_N) con el segundo (Fig. 1).

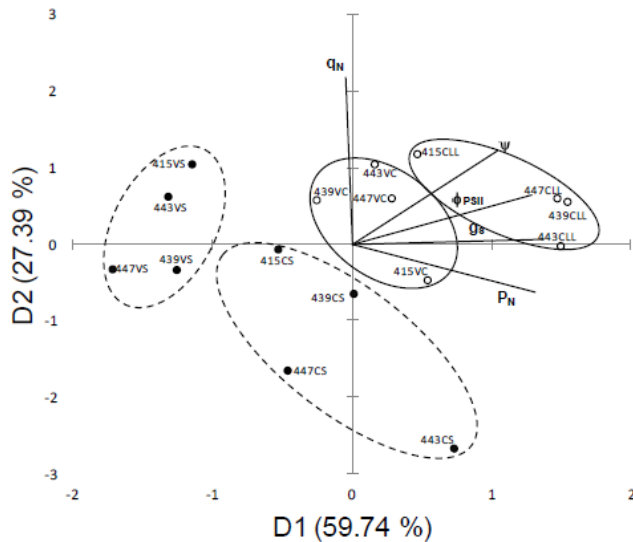


Fig. 1. Análisis de componentes principales en 4 clones de cacao sometidos a DH en el campo y el vivero. Símbolos vacíos y elipses continuas, plantas en época de lluvias o riego en el vivero; símbolos llenos y elipses quebradas, plantas en época de sequía o DH en el vivero. Se indica el número del clon. CLL, campo en lluvias; VC, vivero control; CS, campo en sequía; VS, vivero en DH.

El clon 439, con mayor densidad de lenticelas, fue el que más se recuperó del AN. La aparición de raíces adventicias caulinares y la hipertrofia de lenticelas fueron parte de los mecanismos de aclimatación al AN. Las respuestas observadas permiten sugerir que todos los clones son aptos para el cultivo en zonas propensas a sequía, y el clon 439 el más apto para terrenos anegadizos (2,3).

En clones tanto venezolanos como ecuatorianos, los cambios en g_s explicaron el 68 % de variaciones observadas en A , y las mayores A en los cacao ecuatorianos fueron debidas a mayores g_s en comparación con los cacao venezolanos (Fig. 2). Los valores de g_s en los clones de cacao nacionales ecuatorianos a densidad de flujo fotónico (DFF) de 1000 y 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron mayores de 250 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esto implica una menor resistencia a la difusión de CO_2 hacia el interior de la hoja y por tanto hay una mayor disponibilidad de CO_2 para la carboxilación, en comparación a los bajos g_s , <150 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reportados para otros cultivares de cacao

(1,8), que conlleva limitaciones en el intercambio de gases.

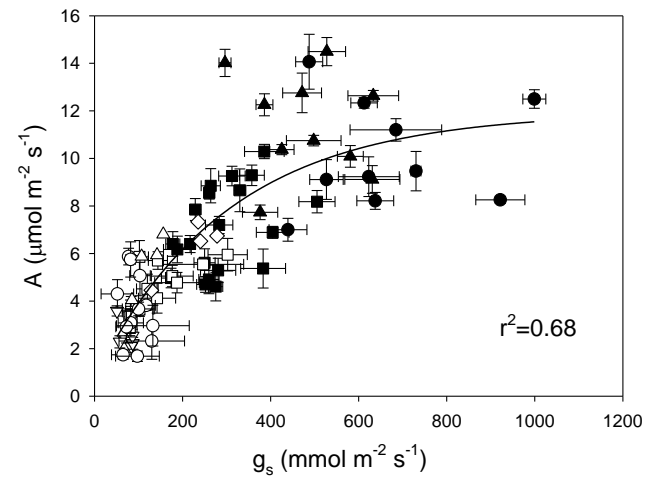


Fig. 2. Relación entre la tasa de fotosíntesis (A) y la conductancia estomática (g_s) en clones de cacao de Ecuador, evaluados en Colon Eloy (●), San Agustín (▲) (Norte de Esmeraldas) y en EET Pichilingue (■) y cacao venezolanos (diferentes símbolos abiertos). $A=11,95-11,19 e (-0,0033 * g_s)$; $r^2 = 0,68$; $p < 0,05$.

El cacao se considera una especie tolerante a la sombra, cuyas A se saturan a baja DFF (400-600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (1,8). Las A y g_s reportadas de los diferentes cultivares de cacao son bajas y varían entre 3 a 7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 50 a 120 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (1,8) las respuestas a altas intensidades de radiación y sus efectos sobre el crecimiento varía entre cultivares (8,9).

En cacao es probable que cuando las plantas están expuestas a altas DFF, la cantidad de energía lumínica interceptada sobrepase la capacidad de la maquinaria fotosintética de procesar dicha energía, dando lugar a fotoinhibición, proceso caracterizado por ocasionar una disminución en la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) y de A .

La información sobre estudios ecofisiológicos y parámetros fotosintéticos en cacao (criollo o forastero) arboles adultos es escasa (8,9) y para nuestro conocimiento no existen trabajos en los cuales se comparen las respuestas ecofisiológicas a DFF de los diferentes genotipos de cacao ecuatoriano (9).

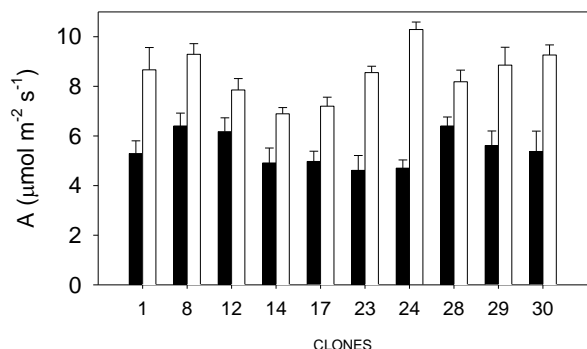


Fig. 3. Tasa fotosintética en árboles de 7 años de 10 clones de cacao ecuatorianos medidos a dos diferentes DFF: 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (barras negras) y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (barras blancas), en lluvia en la EET- Pichilingue, Ecuador.

A bajos DFF, las A fueron en promedio $\sim 5,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3), mientras que a altas DFF las A promedio fue de $8,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3); todos los clones mostraron mayores A a altas DFF. Los clones T14 y T17 tuvieron menores tasas con respecto a la alcanzada por el T24 ($10,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La A en clones ecuatorianos incrementó en un 38% a altas DFF.

El hecho de que en el Ecuador el cacao se cultiva a plena exposición solar sugiere que este cultivo tiene la capacidad de crecer a altas DFF. La evaluación de caracteres morfoanatómicos (área foliar específica, AFE) y fisiológicos (actividad fotoquímica del PSII), al igual que las respuestas del intercambio gaseoso foliar del cacao élite ecuatoriano a diferentes DFF podría ser una importante estrategia para mejorar la producción de este tipo de cacao basándose en un manejo agrícola adecuado que trajera mayores beneficios a los productores del país.

En una evaluación de 17 clones nacionales ecuatorianos, provenientes de una selección de híbridos en la EET-Pichilingue y 3 clones Criollos que se encuentran cultivados en dos ensayos diferentes, ubicados en la finca de la Asociación de productores de cacao de Colón Eloy (CE) y en San Agustín (SA) en el norte de Esmeraldas, se concluyó que en los clones cultivados a plena exposición solar (SA) se redujeron significativamente el AFE (Fig. 4) y la F_v/F_m (Fig. 5), mostrando aclimatación morfoanatómica y regulación descendente del aparato fotoquímico; esto podría permitir ajustarse a las diferentes condiciones lumínicas de Esmeraldas (9).

Se evaluó el efecto de diferentes tipos de secado (en carreteras de asfalto, carreteras de concreto, secadoras a gas, diésel, tendales de cemento y marquesinas) sobre la calidad organoléptica de las almendras mediante análisis sensoriales (Tabla 1) y

determinación de la concentración de metales pesados (Cd, Pb) en las almendras de cacao en el eje vial La Concordia-Esmeraldas, Ecuador (7,9,10).

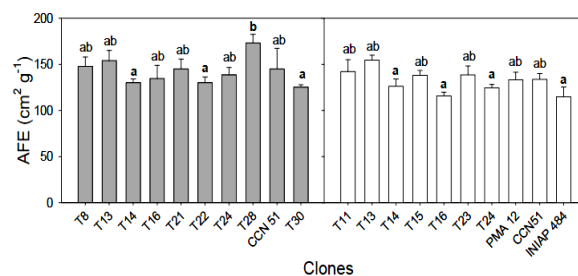


Fig. 4. Área foliar específica (AFE) en diferentes clones de cacao de plantas sombreadas (barras grises, CE) y expuestas (barras blancas, SA). Los valores son la media \pm ES (n=6).

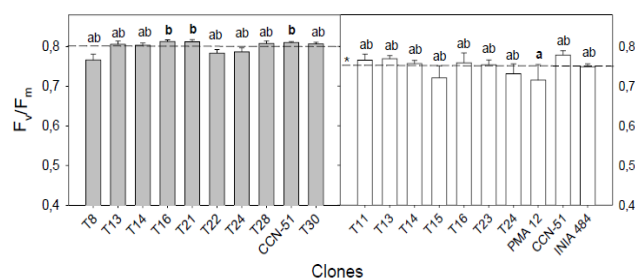


Fig. 5. Eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) en diferentes clones de cacao de plantas sombreadas (CE) y expuestas (SA). Los valores son la media \pm ES (n=6). Líneas quebradas representan los valores promedios de clones en cada localidad, el asterisco muestra diferencia significativa entre las localidades ($p < 0,05$).

Tabla 1. Efecto de los diferentes tipos de secado del cacao sobre las características organolépticas y sensoriales de las almendras.

Tratamientos	sabor cacao	sabor floral	sabor fruta	Sabor nuez	sabor dulce
T 1 Carretera asfalto	1.3 a	0.41 a	1.17 a	0.83 a	0.25 a
T 2 Carretera concreto	2.38 a	0.93 a	2.43 a	0.42 a	0.08 a
T 3 Tendal concreto	5.18 a	0.5 a	1.17 a	0.32 a	0.42 a
T 4 Secadora a gas	2.92 a	0.71 a	1.63 a	0.42 a	0.25 a
T 5 Secadora a diésel	3.58 a	0.08 a	2.92 a	1.33 a	0.29 a
T 6 Marquesina	3.08 a	1.34 a	2.16 a	1.26 a	0.49 a

Medias con una misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

El 70% de las muestras analizadas presentaron buena fermentación, siendo el tiempo promedio de fermentación 4-5 días; se encontró una calidad de sabor favorable, con una baja [Cd] y [Pb]. La producción anual promedio en el eje vial Esmeraldas-La Concordia fue de 4,5 quintales $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ (7,10,11).

Se observaron diferencias significativas en la producción de diferentes clones de cacao ecuatoriano (Fig. 6) (10). Se diferenciaron en cinco grupos: 1) T8 – T18 ($3161 - 3128 \text{ kg ha}^{-1}$); 2) T29 (2563); 3) T16 – T3 ($2301 - 1565$); 4) T6 – T21 ($1416 - 1059$), y 5) T25 – T23 ($851-646$).

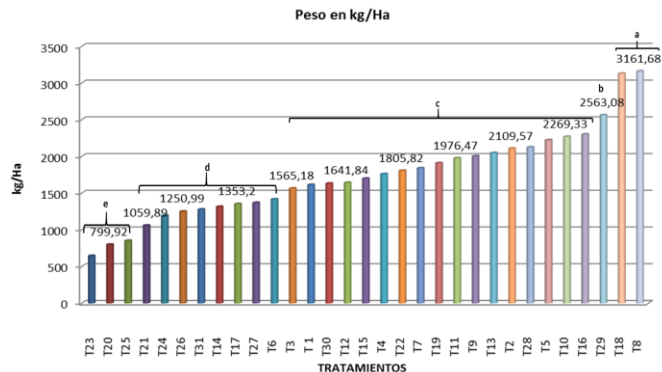


Fig. 6. Peso seco en kg ha^{-1} de 31 clones de cacao nacional, con la aplicación de un biocontrolador para moniliasis.

La producción de 10 clones nacionales de cacao en EET-Pichilingue en dos temporadas lluvias y sequía se muestra en la Fig. 7. El peso seco por planta en los clones T1 y T23 llegó a $2 \text{ Kg planta}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mientras que en el clon T30 (CCN 51) a solo $1,2 \text{ Kg planta}^{-1} \text{ año}^{-1}$. Existen diferencias en los clones entre la producción que se obtiene en lluvia y sequía (8,10). Los clones T1, T8 y T30 mostraron mayor producción en sequía, mientras que en otros los clones los rendimientos fueron mayores en lluvia. En sequía, los rendimientos en peso fresco en los clones T1, T8 y T30 fueron 33, 39 y 45 % mayores que lo obtenido en lluvia, mientras en los clones T17 y T24 la producción en lluvia fue de 48 y 36 %, mayor que en sequía (Fig. 4).

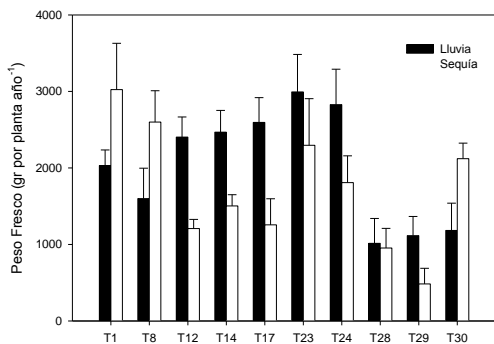


Fig. 7. Producción de 10 clones nacionales de cacao en EET-Pichilingue en dos temporadas lluvias y sequía.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por CDCH PG 03.7981.2011-1 and PEI 20122000649 (WT), CDCH PG 03.7381.2011-1 (AH) y PROMETEO-20150158BP (WT) del SENESCYT de la República del Ecuador.

Referencias

1. Ávila-Lovera, E., Coronel, I., Jaimez, R., Urich, R., Pereyra, G., Araque, O., Chacón, I. y Tezara W. (2016). Ecophysiological traits of

adult trees of Criollo cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) from a germplasm bank in Venezuela. **Experimental Agriculture** 52(1): 137–153.

2. De Almeida, J., Tezara, W. y Herrera, A. (2015). Estado hídrico y fotosíntesis de cuatro clones de cacao sometidos a déficit hídrico o a anegamiento. **XI Congreso Venezolano de Ecología**, Margarita.
3. De Almeida, J. (2015). Respuestas fisiológicas a la sequía y el anegamiento de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados para su cultivo en la región de Barlovento. **Trabajo de Grado de Maestría**, Facultad de Ciencias, UCV.
4. Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios FEDEAGRO (2015). <http://www.fedeagro.org/>
5. International Cocoa Organization (ICCO). (2016). **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, Vol. XXXIX, No. 2, Cocoa year 2014/15.
6. Loor, R. y Amores, F. (2003). Explorando la variabilidad del cacao tipo Nacional para identificar clones elite. **Revista Sabor Arriba** 2(4): 18–19.
7. Reynel, V.H., Loor Castro, O.A., Bolaños, M.J. y Tezara, W. (2016). Efectos del tipo de secado en la calidad organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Esmeraldas, Ecuador. **Investigación y Saberes**. Vol. IV. En prensa.
8. Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R.E., Coronel, I., Araque, O., Azócar, C. y Chacón, I. (2016). Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics than Forastero? **Botanical Sciences** 94 (3): En prensa.
9. Tezara, W., De Almeida, J., Valencia, E., Cortes, J.L. y Bolaños, M.J. (2015). Actividad fotoquímica de clones élités de cacao (*Theobroma cacao*) ecuatorianos en el norte de la Provincia Esmeraldas. **Investigación y Saberes**. 4(3): 37-52.
10. Tezara, W. (2015). Ecofisiología de clones élités de cacao (*Theobroma cacao*): tolerancia al estrés. **Memorias científicas del simposio internacional de ecofisiología y manejo integral de agrosistemas**. ISBN: 978-9942-21-892-6. 1º Edición, Ecuador. 10p.
11. Tezara, W., De Almeida, J., Valencia, E., Cortes, J.L., y Bolaños M.J. (2015). Ecofisiología del cacao: actividad fotoquímica de clones élités de cacao (*Theobroma cacao*) Ecuatorianos en el norte de la Provincia Esmeraldas. **VII Congreso Latinoamericano de Agronomía**. Memorias ISBN 978-9942-21-267-2. p. 34.

Comparación fisiológica y productiva entre el clon nacional ecuatoriano PMA 12 y el CCN 51

WILMER TEZARA^{1,2}, MÁXIMO PINCAY*, JENNY DE ALMEIDA¹, VICTOR REYNEL² Y MILTON BOLAÑOS²

¹Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas; Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. Correo-e: wilmer.tezara@ciens.ucv.ve

²Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica Luis Vargas Torres,
Estación Experimental Mulite, Esmeraldas.

*Selección y clonación del PMA 12

En Ecuador los programas de mejoramiento están centrados en obtener clones de cacao nacionales de alto rendimiento productivo y resistente a enfermedades. Simultáneo al mejoramiento en la producción, deben estar incluidos y evaluados los cambios en las variables fisiológicas. Para ello se evaluó la capacidad fotosintética en dos clones de cacao: PMA 12 (clon nacional ecuatoriano) y el híbrido CCN 51 altamente productivo, cultivados a plena exposición solar, en una finca ubicada en San Antonio, Malimpia, Artonal, Quinindé y en el Norte de Esmeraldas. Se midió el intercambio gaseoso (IG), la actividad fotoquímica del fotosistema II y el rendimiento (producción de mazorcas) de ambos clones. Se encontró una marcada diferencia en el área foliar (AF) entre clones; las mayores tasas de fotosíntesis (A) y menores conductancias estomáticas (g_s) fueron observadas en el clon PMA 12, lo que se tradujo en mayores eficiencias uso de agua (EUA) en comparación con el CCN 51; estas características fisiológicas y tamaño de la hoja podrían explicar el mayor requerimiento hídrico en el híbrido CCN 51. En condiciones de campo el clon PMA 12 presentó mayores rendimientos que el CCN 51.

Introducción

Ecuador es actualmente el primer productor de cacao (*Theobroma cacao*) en Suramérica. Se estimó que la producción para el año 2015 fue de 500 Kg/ha, es decir 250 mil toneladas/500000 ha (4). Este país tiene una gran cantidad de clones que han sido el resultado de la hibridación de Forateros, y variedades: Trinitarias, Venezolanos y Amazónicos, introducidas al Ecuador de diferentes países en la década de los 40 que conllevó a que las plantaciones que mantenían la característica de “sabor arriba” propio del Ecuador se hayan mezclado con híbridos y en consecuencia produjo un cambio y deterioro de la calidad (1).

En el Ecuador, prácticamente no existe una variedad Nacional genéticamente pura de cacao (3), lo que se encuentra es una mezcla de híbridos naturales que se agrupan en una población conocida con el nombre de complejo “Nacional x Trinitario” (5). Esta variedad Nacional es diferente por ser nativa y proviene de los declives orientales de la Cordillera de los Andes en la hoya amazónica y se conservó como exclusivo hasta 1890, cuando se inició la introducción de material de origen Trinitario desde Venezuela (11).

A través de los programas de mejoramiento se han obtenido híbridos altamente productivos y resistentes a enfermedades, que se han establecido en varias colecciones nacionales e internacionales en diferentes regiones del Ecuador. A finales de los

años 50 se obtuvieron híbridos de tipo Nacional con producciones que superaban los promedios nacionales por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). En la década de 70 el INIAP liberó por primera vez a los productores clones de tipo Nacional.

Luego de muchos años de esfuerzo y sin apoyo oficial, el Sr. Homero Castro en 1960, logra seleccionar varios híbridos, en su finca “Theobroma” localizada en Naranjal; procediendo luego a clonar algunos de ellos a los que los denominó con las siglas CCN 51 cuyo significado es “Colección Castro Naranjal” (Tabla 1). Los diferentes clones CCN fueron obtenidos del híbrido entre los clones ICS 95 x IMC 67 y luego realizar un segundo cruce entre dicho híbrido con un cacao encontrado en el Oriente ecuatoriano, denominado “Canelos”.

El CCN 51 es un clon que no tiene relación con el cacao Nacional (2), con mazorcas de color rojizo (Fig. 1); sin embargo, el CCN 51 a pesar de su baja calidad sensorial y organoléptica (sin la característica de aroma y “sabor Arriba” del Cacao Nacional), ha sido diseminado por todo el territorio ecuatoriano, debido a su precocidad, alta productividad y a la tolerancia a la escoba de bruja, resistencia moderada a la *Phytophthora*, aunque susceptible a la monilia y mal de machete.

Recientemente, el Sr. Máximo Pincay con la asesoría de la Universidad Luis Vargas Torres (UTELVT) logró seleccionar un grupo de árboles parentales que presentaban características deseables, de este grupo de árboles seleccionó un clon regional del complejo Nacional, precoz, con alta producción y características sensoriales excelentes a diferencia del CCN 51 (Fig. 2), el cual los denominó PMA 12, cuyo significado es “Pincay Máximo Artonal”. Este clon se encuentra en la Finca del Sr. Pincay, ubicada en San Antonio, Malimpia, Artonal, Cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas (Tabla 1). El clon PMA 12 tiene mazorcas de color amarillo (Fig. 1), es resistente a moniliasis, escoba de bruja y ligeramente susceptible a *Phytophthora*.

Tabla 1. Clones de cacao, acrónimo, genotipo y procedencia de los clones que fueron utilizados en la evaluación fisiológica.

Clon	Acrónimo	Genotipo	Procedencia
Máximo Pincay Artonal	PMA 12	Nacional	Quinindé, Esmeraldas
Colección Castro Naranjal	CCN 51	Trinitario	Naranjal, Tenguel



Figura 1. Árboles de cacao PMA 12 y CCN 51, se muestra diferencias en el color del fruto y tamaño de la hoja.

Se evaluaron plantas de cacao (PMA 12 y CCN 51), de tres años de edad, cultivadas a plena exposición solar, en San Agustín, Norte de Esmeraldas (N 01°03'15.3'', W 078° 55'03.3'') en la Finca del Sr. Enqui Valencia y árboles de 8 años de edad, cultivadas en la finca la Finca de Sr. Máximo Pincay (N 00°24'57'', W 079° 24' 26'') en Quinindé.

El cacao ha sido considerado tradicionalmente como una planta de sombra, pero en el caso de la región ecuatoriana las condiciones climáticas

ofrecen la posibilidad de cultivarla a plena exposición solar (8,9).

En ambos clones, se determinó el *área foliar* (AF) y *área foliar específica* (AFE) y se realizaron medidas fisiológicas: *Intercambio de gases*: las medidas de tasa de fotosíntesis (A), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y eficiencia de uso de agua (EUA) se realizaron utilizando un analizador infrarrojo de gases (CIRAS 2, PPSsystems, R.U.). Todas las medidas se realizaron a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , 21% de O_2 , 28°C de temperatura y densidad de flujo fotónico (DFF) de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *Actividad fotoquímica*: las medidas de fluorescencia de la clorofila *a* se realizaron con un fluorímetro portátil (PAM 2100, WALZ, Alemania).

Resultados

El área foliar del CCN 51 fue 2,3 veces mayor al del PMA 12 (Tabla 2; Fig. 1); sin observarse diferencias significativas en el AFE, ni en el CRA (Tabla 2). Se observó un menor CAF en PMA 12 en comparación con el CCN 51.

Tabla 2. Área foliar, área foliar específica, contenido relativo de agua y contenido de agua foliar de dos clones evaluados en periodo de lluvia en Quinindé, Esmeraldas.

	AF (cm^2)	AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	% CRA	% CAF
PMA 12	183±21	145,6±5	63,9± 3	48,4±2
CCN 51	415±14	138,5±4	72,0±2	62,4±6

Producción de mazorca

El rendimiento de cacao seco por año evaluado en las condiciones agroclimáticas de Esmeraldas fue 1964 Kg/ha (43,3 qq) para PMA 12 y 1297 Kg/ha (28,6 qq) para CCN 51. Mientras que la producción reportada del CCN 51 en Naranjal fue de 2415 Kg/ ha, el doble de la reportada en Esmeraldas. Esto nos indica que la producción depende de la zona donde estén cultivados los clones de cacao.

Los promedios de rendimiento de cacao a nivel mundial están en promedio 570 Kg/ha (4). Sin embargo, se han reportado altas producciones (entre 900 - 1300 kg ha⁻¹ año⁻¹) a plena exposición solar (10).

Ambos clones (PMA 12 y CCN 51) comienzan su primera floración a los 18 meses, y a los 2 años ya se obtienen las primeras mazorcas maduras; en la zona de San Antonio de Malimpia se obtienen dos cosechas picos la primera en Mayo-Junio y la otra en Octubre-Noviembre donde el PMA 12 muestra su alto potencial de producción que llega de 32 a 43 qq de cacao seco por hectáreas.

Consideramos que no existe el clon universal para cualquier zona agroecológica en el Ecuador. La producción dependerá del genotipo y de la zona agroecológica donde estén cultivado cada clon.

El proceso de mejoramiento de cacao Nacionales en Ecuador ha logrado superar las producciones que se obtienen con el CCN 51. En el futuro, Ecuador tendrá mayores producciones de cacao Nacional con características organolépticas superiores y deseadas en la industria chocolatera.

Los programas de mejoramiento además de mantener el sabor “arriba” que los distinguen, buscan unos nuevos patrones sensoriales, en los diferentes cruces. De manera que no solo sea el aumento de la producción lo que condiciona su selección, sino también los aromas y sabores que se desarrollan en el nuevo genotipo, proceso de cosecha y poscosecha del cacao (fermentación y secado) que influyen en la calidad sensorial (6).

Una de las características sensoriales que distinguen el cacao Nacional es su excelente calidad y aroma floral (Fig. 2). El híbrido CCN 51 es un cacao que tiene sabor ácido, amargo y astringente en comparación con el PMA 12 alto sabor a cacao, con algo de sabor floral, alto sabor a nuez y frutal que lo hace un cacao de mayor calidad sensorial que el CCN 51 (Fig. 2).

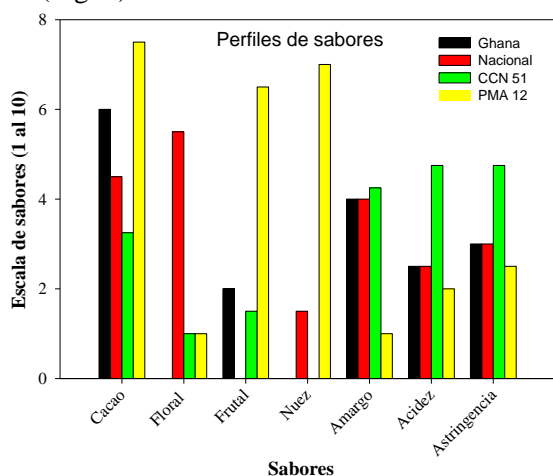


Figura 2. Perfil organoléptico de cacao forastero (Ghana), cacao Nacional y dos variedades clónales (CCN 51 y PMA 12), analizados en el laboratorio de calidad integral de la EET-Pichilingue.

Aunque se tiene información de producción, calidad sensorial y tolerancia a las principales enfermedades de la mayoría de los clones de cacao, los programas de mejoramiento en Ecuador carecen de información fisiológica (8). Esta información es necesaria para entender las respuestas potenciales de aclimatación a variables ambientales y su relación con las variables de producción de los nuevos clones a las diferentes regiones agroecológicas del Ecuador.

La información sobre parámetros fotosintéticos en cacao (criollo o forastero) ecuatoriano, es escasa (7,8,9). Así mismo, tampoco se conocen las relaciones entre las características fotosintéticas y los altos rendimientos reportados para el CCN 51 en

varias regiones ecuatorianas (2,10). Esto conlleva a plantearse si los altos rendimientos están asociados a mejoras en la capacidad fotosintética o se deben a cambios en los patrones de distribución de asimilados que pueden variar entre los clones.

Intercambio gaseoso

El PMA 12 mostró altas A ($12,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mayores a las del CCN 51 ($10,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ambos valores significativamente superiores a los reportados en cacao ($A < 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lo cual podría constituir una ganancia genética importante en la obtención de mayores producciones. Para ambos clones la g_s estuvo comprendida entre 360 y $581 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo mayores en CCN 51 y como consecuencia presentan mayor E y por tanto una menor EUA (Tabla 3), esto sumado a un mayor AF, lo que podría explicar parcialmente el alto requerimiento hídrico del CCN 51 en comparación con el PMA 12.

Tabla 3. Intercambio gaseoso: fotosíntesis, conductancia estomática, tasa de transpiración y eficiencia uso de agua de dos variedades clonales en dos localidades de Esmeraldas.

Parámetros	Quinindé		San Agustín	
	PMA 12	CCN 51	PMA12	CCN51
A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	12,4±0,9	10,2±0,5	10,8±0,2	10,09 ±0,5
g_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	360,9±14	462,6±18,3	497,9±62	581,1 ±30
E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4,02±0,2	5,6±0,34	4,2±0,3	4,4 ±0,1
EUA (mmol mol^{-1})	2,93±0,3	1,89±0,16	2,74 ±0,2	2,32±0,09

Las A y g_s reportadas en diferentes cultivares de cacao son bajas y varían entre 3 a $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 50 a $120 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (7) y las respuestas a altas intensidades de radiación y sus efectos sobre el crecimiento varía entre cultivares (8,9).

Actividad Fotoquímica

El clon CCN 51 mostró ligeramente una mejor actividad fotoquímica en comparación que el PMA 12 (Tabla 4). Las mayores F_v/F_m , ETR, y q_p fueron observadas en CCN 51. Sin embargo, el PMA 12 mostró una mayor disipación de energía en forma de calor (mayor q_N), lo que representaría una ventaja en cacao expuesto a alta exposición solar.

La respuesta de A a la DFF para los clones PMA 12 y CCN 51 fue la típica parábola rectangular (Fig. 3), el CCN 51 mostró una respuesta característica de plantas de sombra (muy eficiente utilizando la luz a bajas DFF, pero se saturó a una DFF de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) lo cual ha sido reportado previamente en otros tipos de cacao a nivel mundial. Por el contrario y lo novedoso es que el clon ecuatoriano Nacional (PMA 12) mostró una respuesta positiva a altas DFF, mostró una alta eficiencia cuántica a bajas DFF, parecidas al CCN 51, pero se saturó a altas DFF, mostrando además mayores tasas de A ($\sim 9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

$^2 \text{ s}^{-1}$). Sugiriendo que el cacao ecuatoriano está aclimatado y probablemente “adaptado” a altas intensidades lumínicas, por lo cual este tipo de cacao se puede cultivar a plena exposición solar (8,9).

Tabla 4. Eficiencia cuántica máxima del PSII evaluadas en hojas adaptadas a oscuridad, tasa de transporte de electrones ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), eficiencia cuántica relativa del PSII, coeficiente de extinción fotoquímica, coeficiente de extinción no fotoquímica en PMA 12 y CCN 51 medidos a una DFF de $440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Parámetros	PMA 12	CCN 51
F_v/F_m	$0,75 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,01$
ETR	$55,5 \pm 5$	$74,1 \pm 4$
Φ_{PSII}	$0,36 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02$
q_P	$0,55 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,03$
q_N	$0,80 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,08$

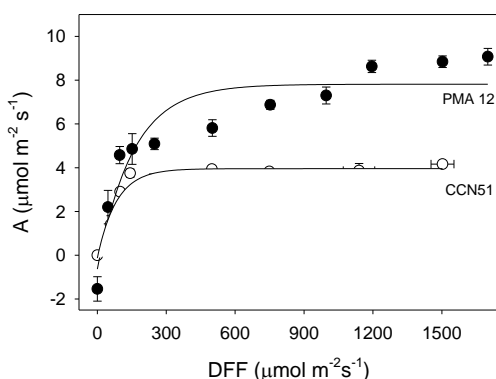


Figura 3. Curva de respuesta de la Fotosíntesis a la densidad de flujo fotónico en un clon Nacional PMA 12, y el CCN 51, en la hacienda del Sr. Máximo Pincay en Quinindé.

En el Ecuador se cultiva el cacao a plena exposición solar, sugiere que este cultivo tiene la capacidad de crecer a altas DFF, la evaluación en el balance entre la captura de luz y en la disipación de energía del exceso de luz; al igual que las respuestas del intercambio gaseoso foliar (A , g_s , E , EUA) del cacao élite ecuatoriano a diferentes intensidades lumínicas, podría ser una importante estrategia para mejorar la producción de este tipo de cacao basándose en un manejo agrícola adecuado, trayendo mayores beneficios a los productores del país.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por PROMETEO-20150158BP (WT) del SENESCYT de la República del Ecuador. Al Sr. Máximo Pincay por permitirnos trabajar en su Finca, con el clon PMA 12.

Referencias

1. **Arosemena, G.** (1991). Las décadas olvidadas (1933-1966). En: **El Fruto de Los Dioses: El**

cacao en el Ecuador, desde la colonia hasta el ocaso de su industria, 1600-1983. Arosemena G. (Ed.). Volumen 2 pag. 49-176. Editorial Graba, Guayaquil, Ecuador 853 p.

2. **Boza, E., Motamayor, J., Amores, F., Cedeño, –Amador, S., Tondo, C., Livingdtone, D., Schnell, R. y Gutiérrez, O.** (2014). Genetics characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. **Journal American Society Horticulture Science** 139: 219-224.
3. **Escobar, R.** (2008). Comportamiento de seis clones de “cacao” (*Theobroma cacao* L.) en Guasaganda, provincia de Cotopaxi, Ecuador. **La Granja** 7(1): 9-12.
4. **ICCO.** (2016). **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXIX**, No. 2, Cocoa year 2014/15.
5. **Loor, R. y Amores, F.** (2003). Explorando la variabilidad del cacao tipo Nacional para identificar clones elite. **Revista Sabor Arriba** 2(4): 18–19.
6. **Reynel, VH., Loor Castro, O.A., Bolaños, M.J. y Tezara, W.** (2016). Efectos del tipo de secado en la calidad organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Esmeraldas, Ecuador. **Investigación y Saberes**. Vol. IV. En prensa.
7. **Tezara, W., Urich, R., Jaimez, RE., Coronel, I., Araque, O., Azócar, C. y Chacón, I.** (2016). Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics than Forastero? **Botanical Sciences** 94(3): En prensa.
8. **Tezara, W., De Almeida, J., Valencia, E., Cortes, J.L. y Bolaños, M.J.** (2015). Actividad fotoquímica de clones élites de cacao (*Theobroma cacao*) ecuatorianos en el norte de la Provincia Esmeraldas. **Investigación y Saberes** 4(3): 37-52.
9. **Tezara, W.** (2015). Ecofisiología de clones élites de cacao (*Theobroma cacao*): tolerancia al estrés. **Memorias científicas del simposio internacional de ecofisiología y manejo integral de agrosistemas**. ISBN: 978-9942-21-892-6. 1ª Edición, Ecuador. 10p.
10. **Sánchez, F., Medina, S., Díaz, G, Ramos, R., Vera, J., Vásquez, F., Troya, F., Garcés, F. y Onofre R.** (2015). Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador. **Revista Fitotecnia Mexicana** 38: 265-274.
11. **Wood, G.A.R. y Lass, R.A.** (1959). El cacao en el Ecuador. En: **Notes on Three Cocoa Diseases, Cocoa Growing in Venezuela, Colombia, and Ecuador**. Cadbury Brothers Ltd. Bournville, USA. pp. 35-52.

Establecimiento y caracterización del banco de germoplasma *in vitro* de ñame (*Dioscorea* sp.)

MAYELI MORENO, EDER DURANGO, RUDY CABRITA, YAYFRE REINA Y MAIRA OROPEZA

Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical,

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Apartado 47114. Caracas - Venezuela.

Correo-e: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

La producción de ñame en Venezuela se desarrolla bajo un manejo inadecuado del cultivo. Implementando biotécnicas se pueden obtener plantas libres de patógenos y microtubérculos que pueden ser utilizados como semilla. En el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal se estableció y caracterizó el banco de germoplasma *in vitro* de ñame, estudiando el efecto del fotoperiodo, de la consistencia del medio de cultivo, reducción y concentración de las sales minerales y combinaciones hormonales sobre la producción de vitroplantas y microtubérculos. En medio líquido, con las sales completas Murashige y Skoog (1962) (MS) se obtuvo la mayor longitud de los brotes ($17,3 \pm 0,2$ cm) en plantas de clon criollo colombiano (CCC) bajo 12 horas luz y $12,1 \pm 0,4$ cm para el clon criollo venezolano (CCV) bajo luz continua. El mayor número de microtubérculos se obtuvo en plantas cultivadas en medio MS sólido para CCC (4 microtubérculos/planta) y en medio líquido para CCV (1 microtubérculo/planta) bajo fotoperiodo de 12 horas luz. El mayor porcentaje de embriones somáticos, tanto para los clones Diamante 22 y CCC, se obtuvo a partir de ápices de raíces con 1 mg/L de 2,4 D. La caracterización molecular RAPD permitirá analizar el polimorfismo de los clones regenerados.

Introducción

El ñame (*Dioscorea* sp.) es uno de los cultivos más promisorios dentro del grupo de raíces y tubérculos tropicales (5). El género *Dioscorea* agrupa aproximadamente 600 especies de importancia económica y medicinal. La producción nacional de ñame para el año 2013 fue de 144.680 Tm obtenidas en una superficie de 11.000 Ha (6).

El ñame se cultiva de manera convencional utilizando el tubérculo entero o fraccionado como semilla; sin embargo, este tipo de propagación vegetativa suele incrementar la dispersión de ciertos patógenos, lo cual conduce a la muerte de la cosecha y ocasiona grandes pérdidas económicas. La micropropagación, la embriogénesis somática y la microtuberización son algunas de las alternativas para superar este inconveniente, pudiendo obtener plantas libres de patógenos y microtubérculos que pueden ser utilizados como semillas certificadas, en menor tiempo en comparación a los tiempos de cosecha convencional y facilitando su traslado a campo (9). Con el propósito de optimizar las condiciones de cultivo que permitan establecer un banco de germoplasma y lograr una mayor producción de microtubérculos con características apropiadas para que puedan ser utilizados posteriormente en campo, es necesario evaluar el efecto de algunos factores que afectan dichos procesos (1).

Una vez establecido el banco de germoplasma, es importante caracterizar a nivel molecular las plantas de ñame mediante el uso de marcadores moleculares. Los RADPs (Random Amplified

Polymorphic DNA) son marcadores dominantes basados en la reacción en cadena de la polimerasa. Las mayores ventajas de los ensayos RAPD es que no se requiere información previa de las secuencias genéticas, el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar y no usa radiactividad (15). En este sentido, en esta investigación se propone establecer el banco de germoplasma *in vitro* de ñame optimizando, entonces, la micro propagación, micro tuberización y la embriogénesis somática, así como la identificación mediante RAPD de cada material de ñame introducido en este banco.

Materiales y métodos

1.-Material vegetal

a) Se utilizaron materiales de ñame donados por los INIAs Miranda y Barinas: Clon Criollo Colombiano (CCC), Clon Criollo Venezolano (CCV), Diamante 22 (D22), D7, D8 y D11 que supuestamente son clones de la especie *Dioscorea alata* L. Para la micropropagación y la microtuberización, segmentos nodales de vitroplantas de CCC y de CCV de dos meses de edad, fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) (8) suplementado con tiamina (0,4 mg/L), mio-inositol (100 mg/L), cisteína (100 mg/L), sacarosa (30 g/L) y solidificado con agar (7 g/L); e incubados bajo condiciones de luz blanca continua a 25 ± 1 °C.

b) Para la inducción de embriones somáticos, segmentos de raíces y entrenudos de tallos de 1 cm de longitud, provenientes de vitroplantas de los clones D22 y CCC.

c) Para el análisis RAPD se extrajo el ADN de CCC, CCV, D7, D8 y D11.

2.- Micropropagación

Se probaron medios de cultivo sólido y líquido y la combinación hormonal Ácido Naftalenacético-Benciladenina (ANA-BA). Se tomaron 36 segmentos nodales de vitroplantas de CCV y CCC de dos meses de edad y se cultivaron en fiolas de 250 mL de capacidad, que contenían medio MS (8) suplementado con ANA (0,5 mg/L) y BA (1 mg/L). Para el medio sólido se empleó agar (7 g/L). El pH de los medios se ajustó a 5,8 y se esterilizaron a 120°C con 15 libras de presión, durante 15 min. Los segmentos nodales se mantuvieron en agitación constante para el medio líquido, bajo condiciones de luz blanca (24 h de luz) a 25 ± 1 °C, durante dos meses.

3.- Microtuberización

Para evaluar el efecto de la concentración de las sales MS (8) y del fotoperiodo, 18 vitroplantas micropropagadas en medio sólido y 18 micropropagadas en medio líquido se subcultivaron en medios MS (8) que contenían las sales completas mientras que otras 18 vitroplantas en medio sólido y 18 en medio líquido se subcultivaron en medios que contenían 1/5 de las sales MS (8). A su vez, 9 vitroplantas subcultivadas en medios sólidos y 9 subcultivadas en medios líquidos que contenían las sales completas MS (8) se incubaron bajo condiciones de luz blanca continua y fotoperiodo de 12 horas luz. Esto también se hizo con las 9 vitroplantas subcultivadas en medios sólidos y con las 9 vitroplantas subcultivadas en medios líquidos que contenían 1/5 de las sales MS (8). Todo el material se incubó a 25 ± 1 °C y en agitación orbital para el cultivo en medio líquido, durante seis meses. Finalizado este tiempo de cultivo, se determinó el número de microtubérculos por planta, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos.

4.- Embriogénesis somática

Se inocularon 5 segmentos de entrenudos de tallos y de raíces en cápsulas de Petri que contenían medio MS (8), suplementado con 0.4 mg/l Tiamina, 100mg/l de mio-inositol, 30 g/L de sacarosa y diferentes concentraciones de hormonas vegetales (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,5; 1; 2 mg/L); Dicamba (0,5; 1; 2 mg/L) y Picloram (2,4; 4,8; 7,2 mg/L). Los explantes se incubaron en oscuridad durante 10 días a 25 ± 1 °C, hasta la iniciación o formación de callo embriogénico. Se registró el número de explantes que formaron callo embriogénico, el tiempo de formación, así como la coloración de los explantes. Los embriones somáticos obtenidos, fueron transferidos a medio MS (8) suplementado con 30 g/L sacarosa, 0.5 mg/L BA y

solidificado con 8 g/L de agar. Los embriones se incubaron bajo luz continua a 25 ± 1 °C, registrándose el número de plantas regeneradas y el tiempo de regeneración.

5.- Estimación de la variabilidad genética

El ADN se extrajo de acuerdo con el procedimiento establecido por Weising y Kahl (14). El ADN extraído fue evaluado mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (12). El ADN se amplificó vía RAPD, utilizando el iniciador de secuencia nucleotídica arbitraria OPA 12. Las condiciones de reacción y los parámetros de amplificación se establecieron de acuerdo con el procedimiento de Ramser y col. (10).

Resultados y Discusión

1.- Micropropagación

Luego de dos semanas se evidenció la formación de callo en los segmentos nodales de CCV y de CCC, cultivados en medio sólido y en medio líquido, haciéndose más evidente su formación en medio sólido (**Fig. 1**). La ventaja de promover la formación de callo es la obtención de un mayor número de nuevos brotes que serán luego subcultivados para iniciar el proceso de microtuberización. A los pocos días de cultivo, los segmentos nodales de CCV sufrieron oxidación de sus tejidos, lo cual provocó la pérdida de algunos de estos explantes a pesar de haber agregado cisteína al medio de cultivo. La adición de dicho antioxidante no detuvo la oxidación, por lo que se tuvo que hacer recambios de medio cada semana para evitar la pérdida de más explantes.

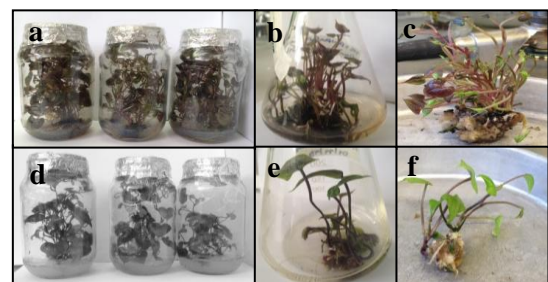


Figura 1. Vitroplantas de CCV (arriba) y de CCC (abajo) de dos meses de edad, micropropagadas en (a y d) medios de cultivo sólidos, (b y e) líquidos. Detalle de la formación de callo en las vitroplantas de CCV (c) y en (f) las vitroplantas de CCC.

La mayor longitud de los brotes se obtuvo en plantas de CCC ($17,3 \pm 0,2$ cm) y CCV ($12,1 \pm 0,4$ cm) micropropagadas en medio de cultivo líquido, con las sales MS (8) completas, incubadas bajo 12 horas de luz y luz blanca continua, respectivamente. Estos resultados coinciden con Cabrita (2), quien obtuvo la mayor longitud de los brotes en vitroplantas de CCC cultivadas en medios de cultivo líquidos, suplementados con 75 g/L de sacarosa.

2.- Microtuberización

El mayor número de microtubérculos se obtuvo en plantas cultivadas en medio sólido para CCC (**Fig. 2**) y en medio líquido para CCV (**Fig. 3**), con las sales MS (8) completas y fotoperiodo de 12 horas de luz: 4 microtubérculos por vitroplanta de CCC con un promedio de 1,37 cm de diámetro; 1,2 g de peso fresco y 0,05 g de peso seco y 1 microtubérculo por vitroplanta de CCV con un promedio de 1,10 cm de diámetro; 0,81 g de peso fresco y 0,07 g de peso seco.



Figura 2. Microtubérculos en vitroplantas de CCC cultivadas en MS (8) sólido completo, a los seis meses de cultivo y fotoperiodo de 12 horas de luz.



Figura 3. Microtubérculos en vitroplantas de CCV cultivadas en MS (8) completo líquido a los seis meses de cultivo y fotoperiodo de 12 horas de luz.

Marcos y col. (7), reportaron que en el desarrollo de las plantas de ñame, fotoperiodos mayores de 12 horas de luz favorecen el alargamiento de la fase vegetativa, mientras que fotoperiodos igual o menores a éste favorecen el desarrollo y crecimiento de los tubérculos de manera más rápida, acortando la fase vegetativa. Muchas veces la tuberización de las distintas especies de ñame no depende principalmente de las condiciones de cultivo, sino del genotipo (4). Comparando el comportamiento de las plantas de CCC y CCV en la microtuberización, las vitroplantas de CCC respondieron mejor a los distintos tratamientos que las plantas de CCV, en las cuales solo dos de los ocho tratamientos ensayados promovieron la formación de microtubérculos. Royero y col. (11), reportaron que el 82,14% de las plántulas de CCV formaban microtubérculos luego de

cuatro meses de cultivo en medio sólido con 1/5 de MS y sin hormonas vegetales.

3. Embriogénesis somática

Se logró la inducción de embriones somáticos tanto en explantes de tallo como de raíces a partir de vitroplantas de los clones D22 y CCC; observándose poca formación de callo y embriones globulares a los 49 días en los explantes de raíces y a los 56 días en explantes de tallo (**Fig. 4**). Este resultado concuerda con lo reportado por Twyford y Mantell (13), quienes obtuvieron embriones somáticos de *D. alata* cv "Oriental Lisbon" a los 38 días de cultivo en medio líquido con 1 mg/l de 2,4-D, a partir de explantes de raíz.

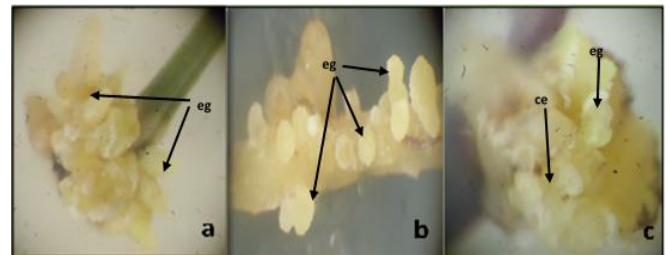


Figura 4. Callo embriogénico (ce) y embriones somáticos en estado globular (eg) obtenidos en el CCC con; a) Picloram, b) 2,4-D, y c) Dicamba. (20X).

La rápida respuesta embriogénica en los explantes de raíz se debe probablemente a la alta concentración endógena de citoquininas que es sintetizada en el ápice de la raíz y que interactúa con las auxinas adicionadas al medio, alcanzando el balance hormonal apropiado, induciéndose la embriogénesis somática (3). En este estudio se demostró el potencial de los explantes de raíces, obteniéndose el 70% de callo embriogénico y un promedio de 9 embriones somáticos con 1 mg/L de 2,4-D en el clon D22, y 83,3% de callo embriogénico y 13 embriones somáticos en el clon CCC. A partir de explantes de tallo, se alcanzaron 70% en el clon D22 y el 80 % en el CCC, con 2 mg/L de 2,4-D, de los cuales se obtuvieron 10 y 9 embriones para cada clon, resultados que coinciden con los reportados por Twyford y Mantell (13).

El análisis histológico de los embriones somáticos mostró por primera vez cada una de las diferentes etapas del desarrollo ontogénico (globular, cotiledonar temprana y cotiledonar tardía) del embrión somático de *D. alata* en el CCC.

La maduración y germinación de los embriones somáticos en los clones D22 y CCC se logró a las 6 semanas en el medio de cultivo suplementado con 0,5 mg/L de BA, 30g/L de sacarosa y 8 g/L de agar y a las siete semanas y media en el mismo medio sin adición de hormonas vegetales. Se obtuvieron plantas completas a las 9 semanas de la iniciación de la maduración (**Fig. 5**).



Figura 5. Plantas del clon D22 obtenidas por embriogénesis somática.

4. Análisis RAPDs

Se obtuvo un extracto de ADN de calidad, libre de polisacáridos y proteínas y a una concentración adecuada para el análisis RAPD.

Se logró la estandarización del protocolo RAPD con el iniciador OPA12 (**Fig. 6**) para en un futuro caracterizar todos los clones de ñame del banco de germoplasma con al menos 15 iniciadores arbitrarios.

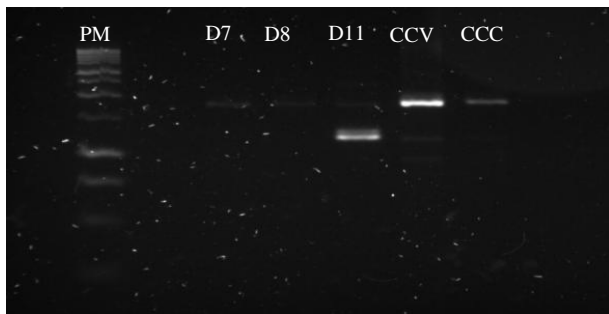


Figura 6. Amplificación RAPD con el iniciador OPA12

El análisis RAPD, además de validar los sistemas de regeneración *in vitro* como la embriogénesis somática (3), permitirá crear un patrón de bandas específico para cada clon de ñame y así lograr la identificación específica de cada material establecido en el banco de germoplasma *in vitro*.

Agradecimientos

Al FONACIT UCV-Proyecto 20121357. A la Ing. Carolina Paesano del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Miranda). Al CDCH Proyecto PG-03-7984-2013/2

Referencias

1. Aighewi, A.B., Asiedu, R., Maroya, N. y Balogun, M. (2015). Improved propagation methods to raise the productivity of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **Food. Sec. 7:** 823-834.
2. Cabrita, R. (2014). Optimización de un sistema de regeneración *in vitro* para el clon criollo colombiano de ñame (*Dioscorea* sp.). Tesis de

Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

3. Durango, E. (2015). Embriogénesis somática en dos cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.). Tesis Doctoral. Doctorado en Biotecnología Agrícola. Escuela Socialista de Agricultura Tropical.
4. Fotso, N., Mbouobda, M., Djocgoue D. y Omokolo, F.D. (2013). Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from microtubers induced *in vitro*. **Afr. J. Biotechnol. 12:** 1057-1067.
5. González, M. (2012). El ñame (*Dioscorea* sp.): características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales. 33:** 5-15.
6. Hoja de balance de alimentos (2010-2013), **Instituto Nacional de Nutrición.** Caracas, Venezuela.
7. Marcos, J., Lacoite, A., Tournebize, R., Bonhomme R. y Sierra, J. (2009). Water yam (*Dioscorea alata* L.) development as affected by photoperiod and temperature: Experiment and modeling. **Field Crops Research. 111:** 262-268.
8. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum 15:** 475-597.
9. Olivier, K., Konan, K., Anike, F., Agbo, G. y Dodo, H. (2012). *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* complex). **Plant Cell, Tiss. Organ. Cult. 109:** 179-189.
10. Ramser, J., Weising, K., Chikaleke V. y Kahl, G. (1997). Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. **BioTechniques. 23:** 285-290.
11. Royero, M., Vargas, T.E. y Oropeza, M. (2007). Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata*. **Interciencia. 32:** 247-252.
12. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
13. Twyford, C. y Mantell, S. (1996). Production of somatic embryos and plantlets from root of the greater yam. **Plant Cell, Tiss. Organ. Cult. 46:** 17-26.
14. Weising, K. y Kahl, G. (1997). Hybridization-based microsatellite fingerprint of plants and fungi. In: Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M, (Ed.). DNA markers. Protocols, applications and overviews. Wiley-VCH, New York. pp. 27-54.
15. Williams, J.K., Rafalki J.A. y Tingey, S.V. (1992). Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzimology 218:** 704-740.

Diagnóstico de bacterias patógenas de plantas

RAIZA BARRIOS, FRANCESCA COPPOLA, MARY CARMEN FERNANDES, MAYBELING JUNCO
ANA KARINA MARCANO Y MAIRA OROPEZA

Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.
Correo-e: maira.oropeza@ucv.ve

Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola a nivel mundial, y su manejo se realiza básicamente empleando métodos químicos, lo cual, tiene un costo tanto económico como ambiental. En este sentido, un sistema de manejo integrado de las enfermedades basado en el diagnóstico de las mismas y la evaluación de riesgos es fundamental, por tal motivo el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (IBE-UCV) viene desarrollando una serie de metodologías para la identificación de bacterias patógenas de cultivos de interés comercial. Para ello, se realizó una caracterización bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa y de geranio con sintomatología de bacteriosis. Los resultados mostraron que mediante el uso de pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares fue posible la identificación de *Pectobacterium carotovorum* y *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* presentes en los cultivos de estas especies vegetales en nuestro país. Esta identificación inequívoca permitirá el establecimiento de programas preventivos y manejo integral para aumentar la producción nacional. Se destaca además el uso del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para el establecimiento de pruebas de patogenicidad y comprobación de los postulados de Koch en la identificación de estos patógenos.

Introducción

Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola a nivel mundial, y su manejo se realiza básicamente empleando métodos químicos, lo cual, tiene un costo tanto económico como ambiental (10). Las fitobacterias causan diversos síntomas en campo, invernadero y/o almacén, por lo que se utilizan diferentes métodos para detectar los géneros y especies de cada una de ellas. Los métodos más usados son los microbiológicos, bioquímicos y patogénicos; sin embargo, estos estudios fenotípicos deben ser complementados con otros métodos de detección y caracterización de las especies, como es el uso de técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es una herramienta rápida y sensible (8). En este sentido, en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV) del Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela (IBE-UCV) se han venido desarrollando una serie de metodologías para el diagnóstico de patógenos de cultivos de importancia económica, utilizando material vegetal *in vitro* para el análisis de pruebas de patogenicidad y postulados de Koch (1), con el fin de implementarlas como un sistema de referencia para la identificación de estas especies. Una estrategia para evitar la pérdida total o parcial de los cultivos, es el empleo de semillas certificadas a partir del cultivo *in vitro*, garantizando así la producción de plantas libres de patógenos. El objetivo de este trabajo fue la identificación y

caracterización de bacterias patógenas de cultivos de interés comercial, como lo son la papa y el geranio. En relación a la papa, tenemos que la pudrición blanda es una de las patologías que mas afecta a este cultivo y es producida por las bacterias pertenecientes a los géneros *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Pectobacterium*; mientras que en geranio, la bacteriosis es generada por el género *Xanthomonas* (Fig. 1).

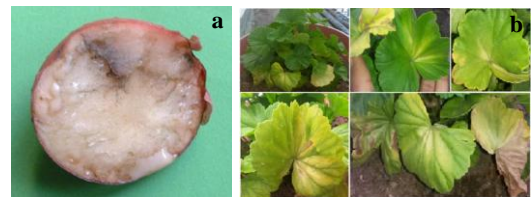


Figura 1. Tubérculo de papa mostrando pudrición blanda (a). Hojas de geranio con sintomatología de clorosis, necrosis y marchitamiento (b).

Metodología

Material Vegetal: Hojas de papa colectadas en el Estado Mérida en el valle de los ríos Chama y Mucujún y plantas de geranio adquiridas en vivero, todas con síntomas de bacteriosis. Tubérculos de papa provenientes de Sanare, estado Lara que mostraban pudrición. Tubérculos comerciales, microtubérculos y hojas de vitroplantas de las variedades “Granola” y “Arbolona negra” (4).

Cepas bacterianas: 6 aislados bacterianos (LMV27, LMV28, LMV29, LMV30, LMV31 y LMV32) de

hojas de papa del Valle del río Chama y 2 del valle del río Mucujún (LMV33 y LMV34). 3 aislados de tubérculos de papa de Sanare (LMV10, LMV11, LMV12). Un aislado de una planta de geranio con sintomatología de bacteriosis (LMV14). Además, se utilizaron como controles positivos las cepas *Ralstonia solanacearum* (LMV24), *Pectobacterium carotovorum* (LMV11) y *Burkholderia gladioli* (LMV01) para papa y para geranio se utilizaron las cepas *Xanthomonas campestris* (CVCM2063 y CVCM2065) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (CVCM2059) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (CVCM 2093) y *Xanthomonas albilineans* (LMV08). Como control negativo se utilizó *Escherichia coli* (CVCM76).

Caracterización morfológica: Para iniciar la tipificación de los aislados patogénicos, los mismos se sembraron en medios nutritivos y se identificaron según las características de forma, tamaño, bordes, superficie, levantamiento, consistencia, transparencia y color de las colonias bacterianas.

Caracterización bioquímica: A todos los aislados se les aplicó un esquema de pruebas bioquímicas y de tinción descritas para bacterias patógenas de plantas (13) dentro de las cuales usamos: detección de la actividad de la enzimas catalasa y citocromo-oxidasa, fermentación de glucosa y lactosa, hidrólisis de almidón, esculina y gelatina, Simmons citrato, KOH, producción de indol, agar YDC y D5, Urea, formación de ácidos a partir de Rafinosa, Sorbitol, D-ribosa y Fructosa, y motilidad.

Pruebas moleculares: Para la obtención del ADN bacteriano de los aislados, se empleo la metodología propuesta por Gomes y col. (6). Posteriormente se llevó a cabo una PCR empleando iniciadores universales para la región ARN 16S ribosomal. Luego para determinar a que género pertenecían los aislados tanto de papa como de geranio, se realizó una amplificación PCR utilizando iniciadores específicos para *R. solanacearum*, *B. gladioli*, *P. carotovorum* y *X. hortorum*. Además en papa se realizó una amplificación de la región intergénica espaciadora transcripta (ITS-PCR) según lo descrito por Jensen y col. (8). Por último se hizo una genotipificación mediante ERIC-PCR.

Pruebas de patogenicidad: Se realizaron pruebas de patogenicidad en microtubérculos y hojas de vitroplantas de papa de las variedades “Granola” y “Arbolona Negra” (4), y en una planta de geranio mantenida en condiciones de vivero. Para ello se inoculó el material vegetal con 10 µl de cultivo bacteriano y se colocaron en cámaras húmedas durante 6 días a temperatura ambiente y a 32°C.

Postulados de Koch: Para corroborar la identidad de los aislados obtenidos, se tomó una porción de cada

tejido infectado en la prueba anterior, se creció en caldo LB durante 24 h y posteriormente las bacterias re-aisladas se sembraron en placas con agar LB para su posterior re-identificación por pruebas bioquímicas y moleculares (1).

Resultados y discusión

1) Caracterización de bacterias patógenas de papa:

1.1) **Tubérculos de papa provenientes de Sanare:** Los tres aislados bacterianos que resultaron patogénicos en pruebas preliminares con tubérculos comerciales de papa (LMV10, LMV11 y LMV12), fueron sometidos a Tinción Gram, resultando todos bacilos Gram negativos. Presentaban una coloración de blanca a crema en agar nutritivo mientras que la cepa control *R. solanacearum* presentó colonias más pequeñas de borde regular y blancas. Al crecer todas las cepas en Agar YDC se observaron distintas características tales como coloración crema, secas, de superficie lisa y de bordes irregulares para las tres cepas en estudio, mientras que las colonias del control resultaron ser blancas, redondas y secas. Así, los aislados LMV10, LMV11 y LMV12, según sus características fisiológicas, fueron ubicados en el género *Pectobacterium*, siendo las pruebas fundamentales para su identificación la óxido-fermentación de carbohidratos, la coloración en medio YDC, el crecimiento a 37°C y las pruebas de catalasa y oxidasa. La diferencia más importante entre los tres aislados y el control positivo es que los primeros son anaeróbicos facultativos, mientras que *R. solanacearum* no tiene la capacidad de fermentar azúcares. Estos resultados coinciden con lo reportado para *Pectobacterium carotovorum* por Schaad y col. (13) y por Garrity y col. (5). Luego se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S, a fin de comprobar la calidad del DNA extraído y verificar si se trataba de material genético de procarionta utilizando los iniciadores universales U1 y U2 (9) (**Fig. 2**); y con la PCR usando iniciadores específicos, no se logró la identificación de la especie. La amplificación de secuencias repetitivas permitió diferenciar al aislado LMV10 de los aislados LMV11 y LMV12; estos dos últimos presentaron resultados similares en las pruebas bioquímicas y perfiles de bandas idénticos en la genotipificación por ERIC-PCR.

1.2) **Hojas de papa provenientes del Valle del río Chama, Mérida:** Estos 6 aislados (LMV27, LMV28, LMV29, LMV30, LMV31 y LMV32) que causaron marchitez en hojas de papa y pudrición en tubérculos comerciales, fueron descritos como bacilos Gram negativos. Las pruebas bioquímicas indicaron que dichas bacterias son anaerobias facultativas, no presentan mucosidad ni coloración amarilla o naranja

en agar YDC y son oxidasa negativas, lo cual sugiere que también pertenecen al género *Pectobacterium*; a diferencia de los controles positivos *R. solanacearum* y *B. gladioli*, que también causan podredumbre en papa y son aerobias estrictas.

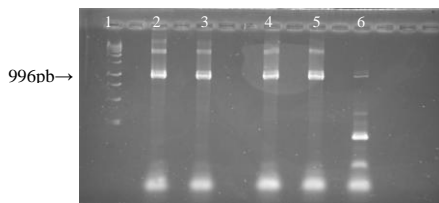


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos PCR empleando los iniciadores universales U1 y U2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb. Carril 2: LMV11. Carril 3: LMV12. Carril 4: LMV13. Carril 5: *R. solanacearum*. Carril 6: CVC76

La confirmación de la identidad de los aislados patogénicos se realizó por PCR especie-específica según lo establecido por Fonseca (4). Estos 6 aislados no corresponden a *R. solanacearum* ni a *B. gladioli*, enfocando nuestra atención en *Pectobacterium carotovorum* (Fig. 3). Mediante la PCR empleando los iniciadores Y1pel y Y2pel específicos para esta especie, se obtuvo una banda de 434 pb para todas las cepas analizadas, lo cual coincide con lo reportado por Darrase y col. (3), corroborando la identidad de todos estos aislados como *P. carotovorum* (Fig. 4).

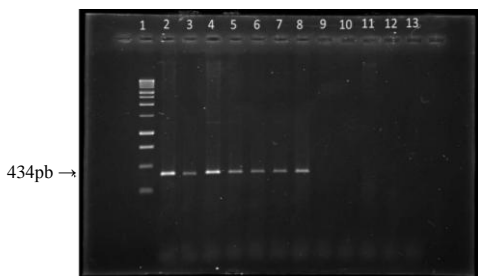


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1,3% de los productos de PCR para la detección de *P. carotovorum*, empleando los iniciadores específicos Y1pel Y2pel. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb Carril 2: LMV27. Carril 3: LMV28. Carril 4: LMV29. Carril 5: LMV30. Carril 6: LMV31. Carril 7: LMV32. Carril 8: postulado de Koch. Carril 9: LMV11. Carril 10: LMV24. Carril 11: LMV01. Carril 12: CVC76. Carril 13: control negativo.

Para discriminar entre las subespecies de *P. carotovorum*, se realizó una PCR con los iniciadores G1 y L1 y se obtuvo el mismo patrón de bandas para los 6 aislados bacterianos patogénicos y para el aislado correspondiente al postulado de Koch (7). Además, estos iniciadores no amplificaron para los controles (carriles 10 y 11). Estos resultados son un aporte para los laboratorios de diagnóstico en enfermedades bacterianas en papa, ya que se puede descartar la presencia de *R. solanacearum* y/o *B.*

gladioli por la ausencia de bandas empleando estos iniciadores (Fig. 4). Por último se hizo la genotipificación de los aislados usando las secuencias ERIC, lo cual permite discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas no relacionadas clonalmente (12). En este sentido la técnica ERIC-PCR permitió corroborar lo que las pruebas moleculares anteriores determinaron; es decir, las 6 cepas patogénicas aisladas de hojas de papa son genéticamente idénticas debido a la similitud en la cantidad y el tamaño de los fragmentos amplificados, y que el postulado de Koch se cumple a cabalidad, puesto que su patrón de bandas es idéntico al aislado original.

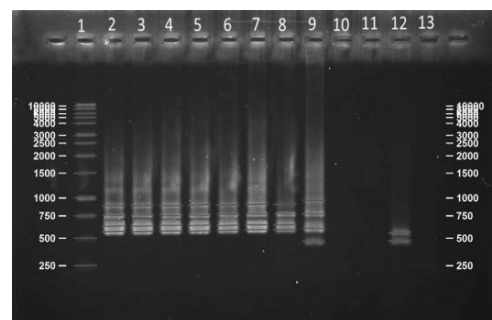


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR de la región ITS 16S – 23S RNAr, empleando los iniciadores G1 y L1. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb. Carril 2: LMV28. Carril 3: LMV29. Carril 4: LMV30. Carril 5: LMV31. Carril 6: LMV32. Carril 7: postulado de Koch. Carril 8: LMV11. Carril 9: LMV24. Carril 10: LMV01. Carril 11: CVC76. Carril 12: control negativo.

1.3) Hojas de papa provenientes del Valle del río Mucujún, Mérida: A los 2 aislados que resultaron patogénicos en pruebas preliminares de patogenicidad con tubérculos comerciales de papa (LMV33 y LMV34) se les realizaron las pruebas morfológicas y bioquímicas encontrándose bacilos Gram negativos colonias redondas, irregulares, color crema y no mucosas. Los aislados se caracterizaron como bacterias oxidasa negativa, anaerobias facultativas, capaces de utilizar la glucosa, mas no la lactosa. Estos resultados también apuntan hacia bacterias del género *Pectobacterium* y actualmente se están realizando las pruebas moleculares para la corroboración de esta identidad.

2) Caracterización de bacterias de geranio: El aislado LMV14 resultó ser un bacilo Gram negativo, móvil, con crecimiento en agar D5, indol negativo, catalasa positivo, citrato positiva, Kligler, oxidasa negativo y ureasa negativo, lo cual coincide con las características de *X. hortorum* pv. *pelargonii* según lo reportado por en el manual de Bergey's (2). La amplificación con iniciadores universales originó la

banda de 996 pb esperada de la misma intensidad en todas las muestras. La PCR con iniciadores específicos (P1 y P2) permitió la identificación definitiva de esta bacteria al amplificar, sólo en este aislado la banda de 1,2 Kb (Fig. 5), tal y como lo reportan Manulis y col. (11).

3) Pruebas de patogenicidad: La identificación de organismos patógenos debe complementarse con el empleo de pruebas donde se evalúe la patogenicidad del organismo en cuestión y se reproduzca la sintomatología en los cultivos, utilizando plantas libres de patógenos obtenidas mediante el cultivo *in vitro* (4). Las pruebas de patogenicidad realizadas en hojas y en tubérculos de papa demostraron que la variedad “Arbolona Negra” es resistente a los aislados bacterianos estudiados, mientras que la variedad “Granola” es altamente susceptible. Del mismo modo, en geranio se realizaron estas pruebas determinando así la patogenicidad de *X. hortorum* pv. *pelargonii* utilizando en este caso una planta sana mantenida en condiciones de vivero.

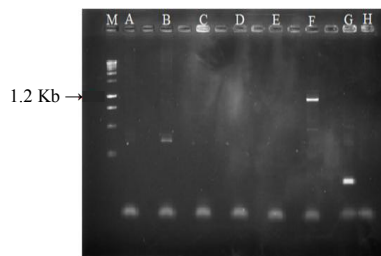


Figura 5. Electroforesis en geles de agarosa al 1.3% de los productos de PCR, empleando los iniciadores específicos P1 y P2. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb. Carril A: CVC2063, Carril B: CVC2065, Carril C: CVC2059, Carril D: CVC2093, Carril E: LMV08, Carril F: LMV14. Carril G: CVC2076, Carril H: control negativo.

4) Postulados de Koch: Los postulados de Koch se cumplieron cabalmente. Los aislados inoculados en los distintos materiales vegetales reprodujeron los síntomas y al re-aislarlos fueron identificados mediante las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares, mostrando resultados similares a las pruebas de identificación de los aislados originales.

Agradecimientos:

FONACIT Proyecto PEII N° 2012001357.

Referencias

1. **Agrios, G.** (1989). Fitopatología. Editorial LIMUSA, Mexico. 741 pp.
2. **Bergey's W.** (1994). Manual of determinative bacteriology. 9ª edición. Lippincott William y Wilkins. Philadelphia. 787 pp.

3. **Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A. y Bertheau, Y.** (1994). PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. **Applied Environmental Microbiology** **60**: 1437-1443.
4. **Fonseca, I.** (2014). Identificación bioquímica y molecular de *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
5. **Garrity, G., Brenner, M., Krieg, D.J., Staley, N.R. y James, R.** (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A-C. Springer-Verlag. 408 pp.
6. **Gomes, L., Roncato, M., Andriano, F., Almeida, F.** (2000). A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. **Scien. Agric.** **57**: 553-555.
7. **Helias, V., Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier J.P. y Jouan, B.** (1998). Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato. **Eur. J. Plant Pathol.** **104**: 685-699.
8. **Jensen, M., Webster, J. y Straus, N.** (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction – amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **American Society for Microbiology** **59**: 945-952.
9. **Lu, J., Perng, C., Lee, S. y Wan, C.** (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.** **38**: 2076-2080.
10. **Madriz, K.** (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta patógeno. **Manejo integral de plagas** **63**: 22-23.
11. **Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A. y Gabriel, D.** (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**:4094-4099.
12. **Rivas, J., Redondo, C. y Alonso, G.** (2006). Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. **Act. Cient. De la Soc. Venez. de Bioanal.** **9**: 3-7.
13. **Schaad, N., Jones, J. y Chun, W.** (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS PRESS. Third Edition. Minnesota, USA. 350 pp.

Genes relacionados con la respuesta de plantas a patógenos

INGRID FONSECA, BEATRIZ ALVEZ Y MAIRA OROPEZA

Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Apartado 47114. Caracas - Venezuela.
Correo-e: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

El mejoramiento vegetal se hace tradicionalmente mediante cruces y retrocruces para lograr la transmisión de una característica de resistencia de una variedad silvestre a una variedad de interés comercial; sin embargo, la obtención de estas variedades mejoradas puede tardar hasta 15 años. En la actualidad, se pueden identificar los genes responsables de la resistencia de las plantas hacia determinados patógenos y así realizar el Mejoramiento Asistido con Marcadores Moleculares en un período de tiempo más corto. Una de las líneas de investigación del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal es el estudio de las interacciones planta-patógeno en la búsqueda de estos genes. En este trabajo se muestra el hallazgo de genes relacionados con la resistencia/susceptibilidad de *Solanum tuberosum* a *Burkholderia gladioli* y con la resistencia/susceptibilidad de *Saccharum* sp. a *Xanthomonas albilineans*. Para esto se realizó la amplificación de fragmentos de restricción del ADN complementario (ADNc-AFLP) para el estudio de la expresión diferencial de genes. Se encontraron transcriptos asociados con la patogenicidad en bacterias, con la resistencia horizontal asociada a la Respuesta Hipersensible y Respuesta Sistémica Adquirida, regulación y homeostasis celular, en las variedades 'Arbolona negra' y 'Granola' de papa y las variedades V0050 y V781 de caña de azúcar.

Introducción

Un aspecto importante en el mejoramiento de especies vegetales, lo constituye la liberación de materiales con resistencia a las principales plagas y patógenos. Tradicionalmente, el mejoramiento vegetal se hacía realizando cruces y retrocruces con las variedades silvestres, para lograr la transmisión de una característica de resistencia a una variedad de interés comercial; sin embargo, la obtención de estas variedades mejoradas mediante la genética mendeliana puede tardar hasta 15 años. En la actualidad, con el uso de técnicas de Biología Molecular, se pueden identificar los genes responsables de la resistencia o susceptibilidad de las plantas hacia determinados patógenos y el hallazgo de características fenotípicas específicas ligadas a estos genes puede permitir el Mejoramiento Asistido con Marcadores Moleculares o Selección Asistida por Marcadores Moleculares (8). Durante la interacción planta-bacteria patógena, se hace necesario estudiar estos genes para determinar con precisión la secuencia de eventos que ocurren una vez que la bacteria coloniza los tejidos vegetales, procede la infección sistémica y se generan los síntomas de la enfermedad; además de los diferentes aspectos moleculares por los que puede generarse la muerte de la planta o la bacteria permanecer en un estado de latencia por tiempo indefinido. En esta revisión se muestran los avances alcanzados en el estudio de la interacción *Saccharum* spp. - *X. albilineans* y en la interacción *Solanum tuberosum* - *Burkholderia gladioli*, a fin de identificar los genes responsables de la resistencia de estas dos especies vegetales a estos

patógenos y acortar el lapso de tiempo para la obtención de variedades mejoradas resistentes a la escaldadura foliar de la caña de azúcar y a la pudrición ocasionada por *B. gladioli* en papa.

En caña de azúcar, esta investigación representa el primer aporte en Venezuela sobre la identificación de algunos de los genes que se expresan o se reprimen en respuesta a la infección con la bacteria fitopatógena *X. albilineans*, combinando el análisis de isoenzimas implicadas en la primera respuesta de defensa de las plantas con el análisis de ADNc-AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados de ADN complementario) que genera numerosos fragmentos de ADN que corresponden a genes implicados en la respuesta de defensa global de las plantas. En papa, se hace también por primera vez el reporte de la presencia de *B. gladioli* en Venezuela y con el análisis ADNc-AFLP se identifican también por primera vez genes en las variedades Arbolona negra (subespecie *andigena*) y Granola (subespecie *tuberosum*) de papa, relacionados con la respuesta de estas variedades a la presencia de esta bacteria patógena.

Materiales y Métodos

Para todos los análisis de expresión diferencial de genes de plantas de caña de azúcar y de papa ante la presencia de los respectivos patógenos, se utilizaron hojas de vitroplantas de caña de azúcar y papa con el fin de establecer patosistemas que garanticen la ausencia de otros patógenos y condiciones ambientales controladas (4). En el caso de caña de azúcar se seleccionaron las variedades V 00 50 como

tolerante a la escaldadura foliar de la caña de azúcar y la variedad V 78 1 como susceptible, por presentar una respuesta diferencial ante esta importante enfermedad. Se emplearon 50 vitroplántulas de 30 días de crecimiento, por variedad, 10 sirvieron como control, inoculadas con caldo LB estéril (Tiempo 0), y 40 se inocularon con la bacteria, 10 para cada tiempo de inoculación: 3, 5, 18 y 24 horas post inoculación (hpi) y se evaluó el progreso de la infección.

En el caso del estudio de la interacción *S. tuberosum* - *B. gladioli*, se emplearon hojas de vitroplantas de las variedades de papa 'Arbolona negra' (resistente) y 'Granola' (susceptible). Para la inoculación de las hojas se empleó el aislado LMV01 correspondiente a la cepa de referencia de *B. gladioli*, infectando 400 mg de hojas por ensayo, colocando en la superficie adaxial 15×10^8 UFC/mL de cultivo en fase exponencial. Las hojas, mantenidas en cámaras húmedas a 25°C y luz continua, fueron colectadas a las 8, 16 y 24 hpi.

Las hojas inoculadas de papa y caña de azúcar, a los diferentes tiempos de inoculación, fueron colectadas para el análisis ADNc-AFLP. Para la extracción del ARN total se empleó el método del fenol caliente propuesto por Bachem (7) modificado por Alva (3) y para la extracción del ARNm se utilizó el sistema PolyAtract1000 de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los ADNc-AFLP la síntesis de la primera y segunda cadena del ADNc se realizó según el protocolo de Bachem y col. (6), y la digestión, ligación y la amplificación diferencial (con 40 combinaciones) se realizó según Briceño y col. (9). Los fragmentos obtenidos se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con nitrato de plata. Se seleccionaron visualmente las bandas diferenciales, se recuperaron utilizando la metodología propuesta por Briceño y col. (9), modificada por Alva (3) y se purificaron empleando el kit de AXYGEN siguiendo las instrucciones dadas por la casa fabricante. La secuenciación de las mismas se realizó en el UEGF-IVIC y su análisis en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante los algoritmos BLASTn, BLASTp y BLASTx, para establecer la identidad de las secuencias y predecir su función a través del programa ORF finder del NCBI.

Resultados y discusión

1) Interacción *Saccharum* spp. - *Xanthomonas albilineans*

Las plantas, a diferencia de los mamíferos, no poseen células especializadas en la defensa contra agentes extraños ni un sistema inmune adaptativo. En su lugar, la célula vegetal posee en su pared celular o matriz extracelular, proteínas secretadas que

participan en la defensa contra patógenos bacterianos, hongos y virus (2,13). Mediante la técnica ADNc-AFLP, se encontraron genes involucrados en la respuesta ante la infección con *X. albilineans*, y se analizó su expresión diferencial entre plantas susceptibles y resistentes a la escaldadura foliar de la caña de azúcar.

Considerando la calidad y concentración de los productos purificados, se enviaron a secuenciar 35 bandas, las cuales comprenden 2 presentes en la variedad susceptible V 78 1, 19 presentes en la variedad resistente V 00 50 y 14 presentes en ambas variedades.

El análisis de las secuencias permitió clasificarlas en 14 grupos, de acuerdo con su función biológica y con el porcentaje que representa cada grupo de secuencias, como se muestra en la **Figura 1**.

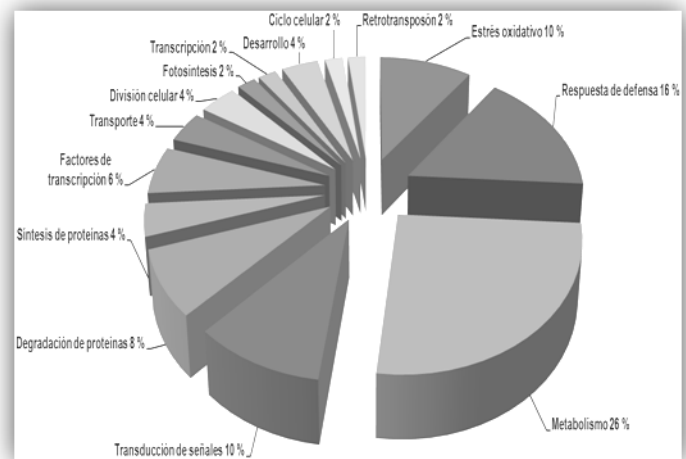


Figura 1: Posible función biológica de los genes expresados diferencialmente en caña de azúcar en respuesta a la infección por *X. albilineans*.

Las principales respuestas de defensa son el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, cambios en la expresión de algunos genes, la activación de MAPKs, y la muerte programada de las células a nivel local o respuesta de hipersensibilidad (1).

La activación de las defensas de las plantas se inicia al reconocerse las moléculas efectoras, generales o específicas del patógeno. Los efectores generales como quitina o flagelina son llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (11). En *X. albilineans*, el daño asociado por la fitotoxina albicidina (15) y la exposición a otras moléculas de la bacteria pueden servir como PAMP para proporcionar señales que activan la regulación y expresión de las proteínas asociadas con la resistencia. Los hallazgos sugieren que la resistencia a *X. albilineans* se expresa durante el establecimiento de la infección sistémica (10).

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una información importante para el estudio de los mecanismos de resistencia de plantas de caña de azúcar ante el ataque por la bacteria fitopatógena *X. albilineans*, considerando que es una primera aproximación del estudio de los genes involucrados en dicha interacción. Por lo tanto es necesario evaluar los genes con una expresión diferencial entre las plantas susceptibles de la variedad V 78 1 y la variedad resistente V 00 50, como por ejemplo: glutatión S transferasa, peroxidasa, citocromo P450, lectina, germina, leucotrieno hidrolasa, galactosa oxidasa e invertasa ácida, los cuales se expresaron sólo en la variedad resistente y pueden ser útiles como marcadores de resistencia en esta interacción. Estos genes de resistencia serían los candidatos para ser incorporados en programas de mejoramiento de este cultivo para ser empleados directamente como marcadores de la resistencia.

2) Interacción *Solanum tuberosum* - *Burkholderia gladioli*.

Una vez establecido este patosistema, aislados y re-amplificados los fragmentos, se seleccionaron 28 por su calidad en cuanto a tamaño e intensidad y que hubieran arrojado valores de identidad dentro de un rango adecuado en los análisis de secuencias. Se encontraron alineamientos significativos con proteínas relacionadas con-respuestas de defensa que corresponden a mecanismos de resistencia horizontal y respuesta hipersensible (HR) proporcionándole a la planta un mecanismo de defensa ideal contra un sin número de patógenos (no necesariamente de tipo bacteriano) y la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR), permitiéndole a la planta mantener estas respuestas de defensa en el tiempo.

Se encontraron identidades significativas con genes codificantes para las siguientes proteínas:

- Proteína tipo alfa tubulina, proteína tipo 22 asociada a la maquinaria de traducción y chaperona ADNJ tipo 15. Actúan en el reconocimiento del patógeno y el reordenamiento del citoesqueleto.
- Precursor de la apoproteína CP26 de unión a clorofila A-B y citocromo P450 tipo 71A4. Actúan en la respuesta local de defensa confinando al patógeno al sitio de infección; en la aparición de la lesión necrótica y señalización para inducción de SAR.
- Proteína homóloga a notum (Pectin Acetiltransferase), cafeoil-CoA O-metiltransferasa tipo 5 y Proteína del floema tipo 2- A9. Actúan en el modelamiento y/o reforzamiento de las paredes celulares.
- Transportador putativo tipo 4 glicerol-3-fosfato, transportador ABC de la familia C, isoforma 2 y transportador ABC de la familia G, tipo 28. Actúan

en la inducción de la SAR, transporte y modelamiento de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) en la SAR.

e) Factor de transcripción tipo LHW. Regula SA y JA en SAR.

f) Proteasa 1D específica tipo ubiquitina, isoforma X3 y caja F del complejo ubiquitin- ligasa. Actúan en la ubiquitinación y SAR.

g) Dominio putativo DUF26 tipo protein-quinasa y Sorbidraft – Exoribonucleasa (2) ARNm - ARN polimerasa II. Actúan en la señalización mediada por kinasas y SAR y otros mecanismos de regulación.

h) Poliproteína putativa Gag/pol y retrotransposon putativo de la subclase Ty1. Regulan mecanismos de defensa mediados por la interferencia del ADN del patógeno por Ty1 y Gag/Pol.

Se encontró que en ‘Arbolona’ se expresaron un gran número de proteínas involucradas tanto en la inducción de mecanismos SAR y HR como en su regulación que no fueron expresadas en Granola ante la infección con *B. gladioli* (Tabla 1).

‘Granola’	‘Granola y Arbolona negra’	‘Arbolona negra’
Retrotransposon Ty1. ARN Pol I. GagPol.	DUF cinasa. A-tubulina. P22 de maquinaria traduccional. Citocromo P450. Proteína de unión a clorofila ab. Factor de transcripción LHW	Sorbidraft-exoribonucleasa. Cafas F ubiquitin ligasa y ubiquitin proteasa. Apoproteína CP26, Cafeoil- CoA O-metiltransferasa. Proteína de floema 2 A9. Transportador G-3-P. Transportadores ABCG y ABC

Tabla 1: Proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a la infección con *B. gladioli*.

En términos generales, es probable que la bacteria esté utilizando el sistema de secreción tipo VI (12) para infectar la planta y ‘Arbolona negra’ sea capaz de activar, como primer mecanismo de defensa, el reordenamiento del citoesqueleto debido al incremento de los niveles de expresión de α -tubulina de la pectin-acetiltransferasas y de la cafeoil-3-metiltransferasa, reguladas en la traducción por la proteína 22 (14). Adicionalmente las chaperonas moleculares DnaJ, estarían activando liberando el factor bZIP al citosol, induciendo junto a los microtúbulos la relocalización del núcleo cerca del sitio de la infección (14). Las DnaJ a su vez inducirían la Muerte Celular Programada o HR, dependiente de MAPKKK seguido de una acumulación de ROS en el cloroplasto las cuales

interactuarían con el fotosistema II para mediar la modulación hormonal de ABA (16). Esto conduciría a la aparición de la lesión necrótica la cual provoca una respuesta generalizada indispensable en la activación de la SAR y mediada posiblemente por el transportador glicerol-3-fosfato relacionado con la sobreexpresión de genes de resistencia (5). Una vez activada la SAR, las hormonas JA y SA serían transportadas y moduladas en su expresión por el factor de transcripción LWH el cual es capaz de regular la velocidad y duración de la respuesta de los mecanismos de defensa, permitiéndole a la planta defenderse efectivamente a largo tiempo contra este patógeno. En conclusión, la metodología empleada para los ensayos de ADNc- AFLPs, resultó ser altamente efectiva para la detección de genes relacionados con respuestas de defensas en las interacciones planta-patógeno entre *S. tuberosum* y *B. gladioli*. Se logró la primera caracterización molecular de la respuesta de 'Arbolona negra' ante la infección con un patógeno bacteriano mediante el ensayo de interacciones implementado.

Agradecimientos

Al CDCH Proyectos PI 03 7281-2010/2 y PG 03-7327-2008. Al FONACIT Proyecto PEII 2012001357

Referencias

1. **Abramovitch, R., Anderson, J. y Martin, G.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 7: 601-611.
2. **Afzal, A., Wood, A. y Lightfoot, D.** (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. **Mol. Plant Microbe Interact.** 21: 507-517.
3. **Alva S.** (2014). Evaluación de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary mediante el uso de marcadores AFLP en plantas de *Solanum tuberosum* (L.) cultivadas *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
4. **Alva Ticona, S. y Oropeza, M.** (2013). Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. **Revista Colombiana de Biotecnología** 15: 55-62.
5. **Amudha, J. y Balasubramani, G.** (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review.** 6:31-58.
6. **Bachem, C., Oomen, R. y Visser, R.** (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. **Plant Mol. Biol. Rep.** 16:157-173.

7. **Bachem, C.W.B.** (2004). cDNA-AFLP: A tool for transcriptome analysis. (En línea) En: http://www.plantbreeding.wur.nl/Projects/Markers/aflp_cDNAAFLP.html visitado el 04 de junio de 2014.
8. **Birch, R.** (2001). *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Mol. Plan. Pathol.** 2: 1-11.
9. **Briceño, A., San Roman, M., Moreno, M. y Fermin, G.** (2009). Population structure of *Phytophthora infestans* in the Venezuelan Andes (2004-2007). **Acta Horticulturae.** 834: 129-140.
10. **Champoiseau, P., Daugrois, J., Girard, J., Royer, M. y Rott, P.** (2006). Variations in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology.** 99: 33-45.
11. **Díaz, N.** (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. **Biotecnol. Agrop. Agroind.** 10: 257-267.
12. **Fory, P., Triplett, L., Ballen C., Abello J., Duitama, J., Aricapa, M., Prado G., Correa F., Hamilton, J., Leach, J., Tohme, J. y Mosquera, G.** (2014). Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. **Phytopathology.** 104: 436-444.
13. **Kim, S., Kang, Y., Wang, Y., Wu, J., Park, Z., Rakwal, R., Agrawal, G., y col.** (2009). Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. **Proteomics.** 9: 1302-1313.
14. **Muench, D., Zhang, C. y Dahodwala, M.** (2012). Control of cytoplasmic translation in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.** 3:178-194.
15. **Rott, P., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M. y Gabriel, D.** (2011). Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. **Molec. Plant-Microbe Interact.** 24: 594-605.
16. **Solis, M.** (2012). Reprogramación del polen a embriogénesis inducida por estrés: identidad celular, muerte celular programada y papel de la metilación de DNA. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas Madrid, España.

Crecimiento y actividad enzimática en plantas micorrizadas del bosque seco tropical

ALICIA CÁCERES, KARLA CÁCERES-MAGO, ARNELD SULBARÁN Y MAOLY MARQUEZ

*Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Silvestres. Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: alicia.caceres@ciens.ucv.ve*

La evaluación de enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo en plantas micorrizadas (fosfatasa ácida y alcalina) y la relación con su crecimiento y estatus nutricional, podrían ser criterios importantes de selección de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), eficientes en el crecimiento y establecimiento de especies arbóreas utilizadas en la recuperación de áreas perturbadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento, el contenido foliar de nitrógeno y fósforo y la actividad de las fosfatasas en raíces de cuatro especies arbórea (*Bulnesia arborea*, *Caesalpinia mollis* y *Piptadenia flava* y *Platynicum pinnatum*), inoculadas con HMA nativos. Los resultados mostraron que la acumulación de biomasa total en plantas inoculadas (I) de *B. arborea*, *P. flava* y *P. pinnatum* fueron 44%, 30% y 35% mayores, respectivamente, con respecto a las plantas no inoculadas (NI), mientras que en *C. mollis* no se observaron diferencias significativas. La actividad enzimática en plantas I varió dependiendo de las especies, y éstas fueron significativamente mayores que el tratamiento no inoculado (NI). Se concluye que una mayor respuesta de crecimiento en plantas inoculadas, está asociada con una mayor acumulación de biomasa y una mejora significativa en los contenidos de nutrientes foliares (N y P).

Introducción

En Venezuela, las continuas perturbaciones antrópicas de los bosques secos y vegetación asociada han producido que extensas áreas sean consideradas en la categoría de riesgo de eliminación, más alta (en peligro o en peligro crítico), según los criterios establecidos en el Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela (8). En la Península de Macanao, ubicada al oeste de la Isla de Margarita, la explotación de minas de arena a cielo abierto se ha llevado a cabo durante cinco décadas (6). Este tipo de perturbación implica el movimiento de la superficie del suelo, lo cual ha alterado radicalmente la matriz suelo-vegetación, tanto en el sector norte como en el sector sur de la península (6). Hoy en día es una imperante la necesidad realizar estudios conducentes a investigar, no sólo las especies vegetales afectadas por los disturbios, sino las asociaciones que éstas poseen con los diferentes microorganismos del suelo, con el fin de establecer criterios de selección planta-microorganismos cónsonos con el ambiente.

Entre las diferentes especies arbóreas que se han utilizado para la recuperación de áreas degradadas, las leguminosas pasan a ser una de las familias más importantes, no sólo por ser capaces de formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico (rizobios), sino también porque la presencia de ambos simbioses (rizobio-MA) es estrictamente necesaria y se complementan

funcionalmente (2). La contribución de la MA en el mejoramiento de la nutrición de elementos como el fósforo (P), deberá estar relacionada con todos los mecanismos de incorporación de P desde el suelo hasta la planta hospedera, asociado a la presencia de enzimas que incrementen la absorción del mismo o su intervención en los procesos metabólicos del P dentro de la planta. La mineralización del fósforo es un proceso enzimático mediado por las fosfatasas (2,3,5), las cuales catalizan la hidrólisis de enlace éster C-O-P característico de los compuestos orgánicos. Estas enzimas son inducibles y se producen predominantemente bajo condiciones de baja disponibilidad de P. Las fosfatasas han sido clasificadas en alcalinas y ácidas, de acuerdo a su pH óptimo en la reacción de hidrólisis que llevan a cabo por debajo o por encima de pH 7. Las fosfatasas alcalinas (FAI) son secretadas principalmente por bacterias, mientras que las fosfatasas ácidas (FA) son secretadas tanto por bacterias como por hongos saprofitos y micorrizas; igualmente, son ubicuas en las plantas y se encuentran localizadas principalmente en el citoplasma (2,4). El papel de la actividad enzimática en el control bioquímico del metabolismo del fosfato en las MA es aún materia de especulación; sin embargo, las evidencias muestran la acción de varias enzimas en los procesos de nutrición de P (2,4). Se ha encontrado actividad de la fosfatasa alcalina dentro de las vacuolas de las hifas que acumulan fosfatos, y particularmente alrededor del tonoplasto del hongo, mientras que la actividad de la fosfatasa ácida se ha encontrado en el citoplasma de las células radicales y en los extremos de las hifas

externas del hongo. Su función dentro de las células de la raíz está asociada a la hidrólisis de los polifosfatos a formas Pi para su transferencia a la planta a través del arbúsculo. Se sugiere que su función en el micelio externo puede estar asociada a la incorporación de P en la rizósfera (2,4).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento, el contenido foliar de nitrógeno y fósforo y la actividad de las fosfatasa ácida y alcalina en raíces de cuatro especies arbóreas *Caesalpinia mollis* H.B.K. (Caesalpinaceae), *Piptadenia flava* (DC) Benth. (Mimosaceae) y *Platymiscium pinnatum* (Jacq.) Dugand (Fabaceae), inoculadas con HMA nativos del bosque (I) y no inoculadas (NI) en suelos no estériles del bosque de referencia. Las plantas fueron cosechadas a los 240 días.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestra la acumulación de biomasa seca total en las diferentes especies utilizadas. El efecto positivo de la inoculación con HMA sobre las especies estudiadas, se observó por un incremento significativo en la acumulación de biomasa seca total en las plantas inoculadas (I) de *B. arbórea*, *P. flava* y *P. pinnatum*, que fueron del 44%, 30% y 35% mayores, respectivamente, con respecto a la biomasa total acumulada en las plantas no inoculadas (NI), mientras que en *C. mollis* no se observaron diferencias significativas.

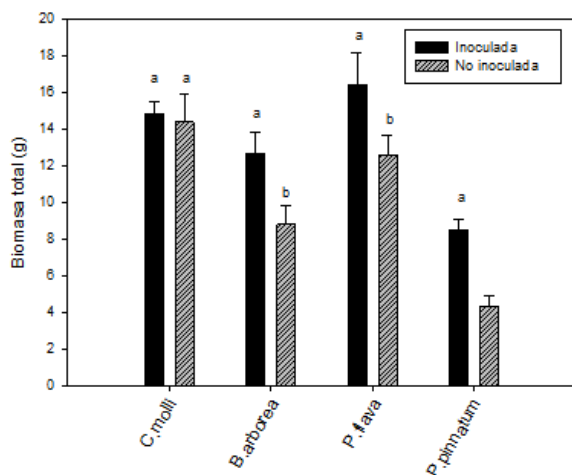


Fig. 1. Biomasa total en 4 especies arbóreas del bosque seco. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que los HMA que colonizan las raíces de las plantas en los diferentes tratamientos varían en su capacidad infectiva. En este sentido, se considera que la presencia de diferentes HMA en condiciones

naturales, varía en su capacidad de colonizar las raíces (infectividad) o incrementar las respuestas de crecimiento de las plantas (efectividad) y tanto la capacidad infectiva y/o efectividad varía cuando se producen inóculos. El desempeño de los HMA va a depender de la combinación planta-hongo que se encuentren en condiciones naturales y de algunos factores intrínsecos de las plantas, como la susceptibilidad a la colonización y tasa de crecimiento de la raíz (2,10). Aunque la rápida colonización de MA se espera que provea una ventaja competitiva a las plántulas, el grado de colonización no se correlaciona necesariamente con el crecimiento. Cabe mencionar que los valores de colonización (datos no mostrados) en todas las especies analizadas fueron altos (<30%). Resultados similares han sido señalados para algunas especies leñosas en Brasil (9,10). Existe una variación considerable entre las especies de plantas en cuanto a la sensibilidad de ser colonizadas que dependerá de las variables ambientales, especialmente cuando la concentración de P en el suelo es alta; en este caso, los valores de P oscilan entre 7-8 ppm. Pareciera entonces que existe un amplio intervalo en la capacidad de respuesta a la colonización por HMA en especies leñosas, que se asocian en parte con la demanda nutricional de las especies vegetales, sus características, ecofisiológicas y el estado sucesional (o grupo funcional) de las mismas (10). Igualmente, en estudios conducentes a evaluar la respuesta de crecimiento de especies arbóreas, se deben tomar en cuenta aspectos relacionados con los morfotipos de HMA presentes en los inóculos, ya que al igual que las especies vegetales, estos presentan diferentes estrategias de crecimiento, que afectará no sólo la infectividad de los mismos, sino su eficiencia en producir respuesta de crecimiento (1,2,9).

La evaluación de la actividad de las fosfatasa ácida (FA) y alcalina (FAI) en plantas inoculadas fue significativamente mayor en relación a las plantas del tratamiento no inoculadas. *Bulnesia arborea*, *Piptadenia flava* y *P. pinnatum* mostraron los mayores valores de actividad de FAI.

La actividad FA presentó la misma tendencia, en cuanto a que las plantas inoculadas presentaron valores significativamente mayores que las plantas no inoculadas, a excepción de *C. mollis*, que no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 2).

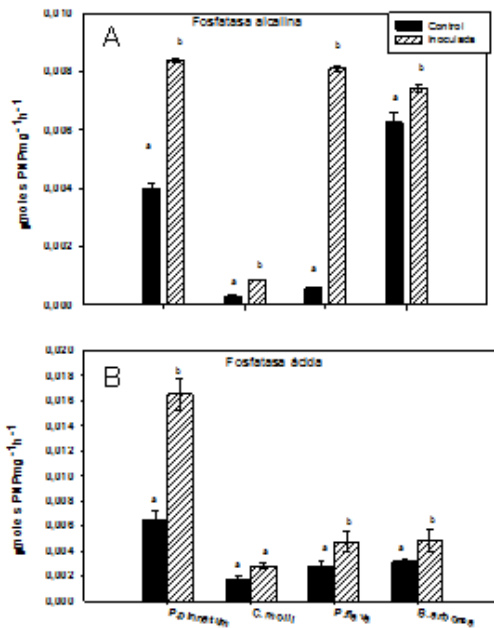


Fig. 2. Actividad de la fosfatasa alcalina (A) y fosfatasa ácida (B) en raíces de 4 especies arbóreas. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Por lo general, los incrementos en las actividades de las fosfatasas ácida y alcalina en las plantas inoculadas se encuentran asociadas al inicio de la respuesta por parte de las plantas a la inoculación, en términos de acumulación de biomasa. Sin embargo, hay que considerar que el tratamiento sin inocular utilizado en este trabajo fue el suelo natural sin esterilizar, lo que indica que estas plantas igualmente se encuentran micorrizadas. Otros trabajos realizados en especies arbóreas en bosque nublados y bosques deciduos mostraron que plántulas de especies arbóreas presentaban una relación positiva entre el incremento de la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina y la respuesta de crecimiento de las especies (1,4,7).

En muchos casos, la respuesta de crecimiento de las especies puede relacionarse con el mejoramiento en la incorporación de P, que se evidencia por un mayor contenido de fósforo foliar en las plantas en los tratamientos inoculados. En este sentido, aunque en ambos tratamientos se presentó colonización micorrízica, las diferencias en los contenidos de P foliar en las plantas inoculadas fue significativamente mayor en ambas cosechas, lo que podría atribuirse a una mayor eficiencia en la incorporación de P por parte de las especies de HMA que dominan el inóculo. Estos resultados apoyan hallazgos anteriores que indican la

importante contribución de las micorrizas arbusculares en el crecimiento vegetal y el aumento de la absorción de P al menos durante algunas etapas de desarrollo de la planta (9,10). En el caso de los contenidos foliares de N, se observó que las plantas I presentaron los mayores valores en comparación con las plantas cultivadas en suelos sin esterilizar a excepción de *C. mollis* (Fig. 3).

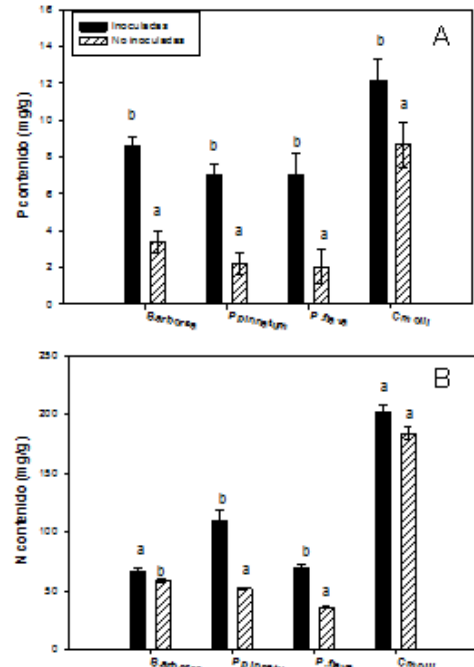


Fig. 3. Contenido de: A) P y B) N foliar en 4 especies arbóreas. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

El índice de respuesta micorrízica (IRM) determina el grado en el cual una planta se beneficia de la presencia de las MA y es frecuentemente utilizado para comparar la eficiencia simbiótica de distintos inóculos (6,7). En este caso la respuesta fue evaluada en términos de producción de biomasa de plantas creciendo en suelo nativo *versus* plantas creciendo en suelo nativo e inoculadas (Tabla 1).

Tabla 1. Índice de respuesta micorrízica en 4 especies arbóreas.

Especie	Índice de respuesta micorrízica (IRM)
<i>B. arborea</i>	31 %
<i>P. flava</i>	23 %
<i>C. mollis</i>	3 %
<i>P. pinastum</i>	37%

Los valores de IRM mostraron ser mayores del 20%, que indica que todas las especies, a excepción de *C. mollis*, tuvieron una respuesta de crecimiento

positiva ante el proceso inoculación con MA. Pareciera entonces que las especies en zonas áridas, donde el único factor que está afectando la disponibilidad de P son los prolongados períodos de sequía, el IRM tiende a valores \leq al 50% (considerado como un IRM moderado), mientras que las especies que crecen en suelos ácidos, tanto la dependencia como en la respuesta comprenden valores \geq 50% (1,9,10). Cabe acotar que en muchos casos esta respuesta está asociada a la compatibilidad funcional que las especies presenten con determinado inóculo (6). En este trabajo, aun cuando no se logró caracterizar el inóculo utilizado, la lista obtenida de los principales morfotipos en la rizósfera de las especies vegetales estudiadas (datos sin publicar), permite inferir que la producción del inóculo podría haber favorecido el crecimiento de alguna especie o géneros cuyas características funcionales hayan sido una rápida colonización y eficiencia, como sería el caso de *Glomus*, el cual fue el morfotipo más abundante en todas las especies estudiadas (1,6,7). Faltarían estudios más detallados para corroborar de manera más precisa este resultado.

Se concluye que una mayor respuesta de crecimiento en plantas inoculadas, está asociada no sólo con la asignación de biomasa a compartimientos con actividad fisiológica (vástago), sino también a una mejora significativa en los contenidos de nutrientes foliares (N y P) y en la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo. Igualmente, se debe considerar el uso de inóculos de micorrizas como una herramienta importante en ensayos de restauración y que se deben utilizar no sólo los propágulos nativos del suelo, sino también el suelo donde la planta crece (sin esterilizar), de manera de obtener resultados muchos más consonos con el ambiente que se está estudiando.

Referencias

1. Cáceres, A. y Cuenca, G. (2006). Response of seedlings of two tropical species *Clusia minor* and *Clusia multiflora* to mycorrhizal inoculation in two soils with different pH. **Tree Structure and Function** 20: 593-600.
2. Ezawa, T., Smith, S. y Smith, S. (2001). Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**. 149: 555-563.
3. Barea, J., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., López-García, A., Estrada, B., Azcón, R., Ferrol, N. y Azcón-Aguilar, C. (2011). Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. Deserts of the World Part IV: Iberian Southeast. **Journal of Arid Environments** 75: 1292-1301.
4. Gianinazzi-Pearson, V., Smith, E., Gianinazzi, S. y Smith, A. (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺ - ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interface. **New Phytol.** 117: 61-76.
5. González, V. (2007). La vegetación de la Isla de Margarita y sus interrelaciones con el ambiente físico. **Memorias de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales** 167: 131-161.
6. Kalinhoff, C. (2012). Influencia de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y respuesta a la sequía de *Piscidia Cartagenensis* Jacq.: Implicaciones en la recuperación de un bosque seco de la península de Macanao, Isla de Margarita. **Tesis Doctoral**. Universidad Central de Venezuela. Caracas, 185 p.
7. Mora, G. (2010). Efecto de las micorrizas arbusculares (MA) sobre la fotosíntesis, crecimiento y establecimiento de *Pachira quinata* en la Reserva Forestal de Caparo. **Tesis doctoral**. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
8. Oliveira-Miranda, M.A. (2010). Riesgo de eliminación de los ecosistemas terrestres de Venezuela. Pp. 109-231. En: Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela. Rodríguez J, Rojas-Suarez, F. & Giraldo-Hernández, D. (eds.). Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela). Caracas, Venezuela.
9. Siqueira, J. y Saggin-Junior, J. (2001). Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza** 11: 245-255.
10. Zangaro, W., Bononi, V. y Trufem, S. (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 16: 603-621.

Morfología y Anatomía Foliar. Aplicación e Importancia en Bromelias del Arboretum-IBE

MARCIA ESCALA Y LUIS HERMOSO

Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: mescala2006@gmail.com

La anatomía foliar ha mostrado ser de utilidad taxonómica en numerosos grupos de angiospermas. El estudio de las características morfoanatómicas de la hoja de la familia Bromeliaceae, se viene planteando también con objetivos diversos. Gracias al aporte extraordinario hecho por la Sociedad Venezolana de Bromeliología, contamos con una colección de especies de Bromelias, las cuales, sumadas a las que crecen de manera natural en nuestro Arboretum constituyen el objetivo principal de esta investigación. Es nuestro interés, realizar un estudio detallado de la hoja de los diferentes taxa de Bromeliaceae, para determinar caracteres de valor diagnóstico que permitan su mejor identificación y evaluar aquellos caracteres que puedan tener valor adaptativo, para su mejor comprensión, establecimiento y mantenimiento. En estudios previos, hemos caracterizado los frutos y semillas de algunas especies y destacado tanto su valor diagnóstico, como su importancia en la estrategia de disseminación y distribución de las mismas. Las 21 especies que hasta el momento hemos estudiado pertenecen principalmente a las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae. El patrón anatómico foliar es el típico de la familia Bromeliaceae, se observan diferencias a nivel de subfamilia, género y especies. Se establecen patrones de tipificación y comparación, entre los géneros y especies estudiados.

Introducción

La familia Bromeliaceae está conformada por 308 especies, agrupadas en 56 géneros, siendo la de mayor número de especies dentro de las angiospermas originarias del Neotrópico. Tradicionalmente ha sido dividida en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae. Presenta especies epífitas, terrestres y rupícolas, adaptadas a una gran variedad de hábitats que incluye páramos, bosques lluviosos de tierras bajas, bosques montañosos, bosques nublados, sabanas, zonas secas e incluso rocas desnudas (1,3). En Venezuela de las tres subfamilias la mejor representada es la Pitcairnioideae, con 192 especies incluidas en 9 géneros. Algunas especies de la familia son utilizadas con propósitos ornamentales y otras son de utilidad alimenticia, por su alto contenido en azúcares y vitaminas, o comercial, por la utilización de sus fibras en la elaboración de cordeles, hamacas, redes, entre otros (1). La información que se ha generado para la familia Bromeliaceae, está enfocada principalmente en el aspecto taxonómico, donde destacan las descripciones morfológicas y anatómicas, desarrollo de claves y en algunos casos el aspecto cariológico. (3,6). Este grupo es considerado monofilético debido principalmente a las siguientes sinapomorfías: a) tricomas multicelulares escamosos únicos para esta familia, b) cuerpos silíceos solitarios, largos en las células epidérmicas, c) perianto conspicuamente sepaloide y petaloide. La subfamilia Pitcairnioideae es la más primitiva de acuerdo a la estructura floral,

Tillandsioideae de acuerdo al ovario principalmente súpero podría indicar que se ubica en una rama temprana de la familia, sin embargo sus semillas plumosas muestran un claro avance y su posición intermedia se evidencia en el elevado número de híbridos interespecíficos obtenidos principalmente en uno de los géneros más avanzados como es *Vriesea*. Bromelioideae con el ovario ínfero y fruto tipo baya se considera como la subfamilia más evolucionada dentro de la familia, la cual muestra una considerable distinción en la forma del polen, siendo comunes los híbridos interespecíficos. Tradicionalmente, la separación de Bromeliaceae en tres subfamilias se ha sostenido en el uso de distintos caracteres como tipo de margen de la hoja, posición del ovario, tipo de fruto y apéndices de la semilla (1,6). La anatomía foliar ha mostrado ser de utilidad taxonómica en numerosos grupos de angiospermas (4,6,7,8). Dentro de las Bromeliaceae, existen dos importantes trabajos en el aspecto anatómico. En el primero de ellos, se estudian especies de las tres subfamilias y encuentran que la epidermis expresa una alta especialización ecológica y posibles caracteres ocultos conservados que podrían expresar afinidades filéticas; además el autor reconoce tres clases de estomas. En el otro, se evalúa la anatomía foliar de tres géneros de Pitcairnioideae: *Navia*, *Connellia* y *Cottendorfia* y en base a estos caracteres, elaboró claves para separar 102 especies de los géneros estudiados. Se ha señalado, que la estructura de los estomas es bastante uniforme en los taxa infragenéricos o en géneros

relacionados, por lo que dentro de cada subfamilia tienden a tener características comunes, pero es necesario verificar esta tendencia incluyendo la mayoría de las especies (7). Gracias al aporte extraordinario hecho por la Sociedad Venezolana de Bromeliología al IBE, desde hace varios años contamos con una colección de especies de Bromelias, las cuales, sumadas a las que crecen de manera natural en nuestro Arboretum constituyen el objetivo principal de esta investigación. Es nuestro interés, realizar un estudio detallado de la hoja de los diferentes taxa de Bromeliaceae, para determinar caracteres de valor diagnóstico que permitan su mejor identificación y evaluar aquellos caracteres que puedan tener valor adaptativo, para su mejor comprensión y mantenimiento.

Materiales y métodos

El área conocida como “Estación Experimental Arboretum IBE”, corresponde a un remanente de bosque seco premontano, deciduo, secundario, que cubre un área aproximada de 2 ha, situado en Colinas de Bello Monte, aprox. A 1200 msnm, al sureste de Caracas (municipio Baruta). El clima del Arboretum puede considerarse biestacional, con un periodo seco muy marcado, desde diciembre hasta mayo y otro húmedo, desde abril hasta noviembre; la precipitación anual promedio varía entre 550-1110 mm³ y la temperatura media entre 18-24°C (5). Se recolectaron hojas maduras de las especies de bromelias del Arboretum del IBE. El análisis anatómico se realizó en la zona media de la hoja y la preparación del material se hizo mediante el método convencional para estudios morfoanatómicos. La morfología externa de la hoja, fue observada en un microscopio estereoscópico marca Zeiss KL1500, mientras que los cortes anatómicos fueron observados a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2 y un microscopio óptico con luz polarizada marca Nikon OPTIPHOT; se tomaron fotografías en cada caso con una cámara digital.

Resultados y Discusión:

Bromelias registradas hasta el momento en el Arboretum-IBE:

Aechmea aquilega, *Aechmea fendleri*, *Aechmea blanchetiana*, *Aechmea ramosa*, *Aechmea orlandiana*, *Billbergia rosea*, *Bromelia pinguin*, *Canistrum sp.*, *Neoregelia sp.*, *Portea petropolitana*, *Quesnelia arvensis*, *Tillandsia anceps*, *Tillandsia balbisiana*, *Tillandsia flexuosa*, *Tillandsia recurvata*, *Tillandsia tenuifolia*, *Tillandsia usneoides*, *Tillandsia utriculata*, *Tillandsia variabilis*, *Vriesea alata*, *Wittrockia sp.*

Las 21 especies que hasta el momento hemos estudiado pertenecen principalmente a las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae. En estudios previos hemos caracterizado los frutos y semillas de éstas y destacado tanto su valor diagnóstico como su importancia en la estrategia de diseminación y establecimiento de las mismas (2). Las especies en estudio se distinguen por los siguientes caracteres morfológicos foliares: grosor, consistencia, coloración y presencia de espinas. El patrón anatómico foliar es el típico de la familia Bromeliaceae, aunque se observan diferencias entre ellas a nivel de subfamilia, género y en algunos casos entre especies. Se establecen patrones de tipificación y comparación, entre los géneros y especies estudiados. El mesófilo, con hipodermis mecánica en ambas caras, hipodermis acuífera, parénquima acuífero variable, en la cara adaxial y clorénquima en la abaxial. Algunas muestran un patrón estructural más homogéneo y no se observa, ni hipodermis mecánica ni parénquima acuífero (*Tillandsia recurvata*). Los paquetes de fibras extravasculares y los canales de aerénquima, varían en número y ubicación en Bromelioideae. En las hojas del género *Tillandsia*, los paquetes de fibras están ausentes (8). Se reportan idioblastos que contienen cristales de oxalato de calcio, tipo rafidido, los cuales pueden encontrarse en la hipodermis acuífera de algunas de las especies (Bromelioideae) o en otras zonas del mesófilo (Tillandsioideae), dichos cristales pueden tener carácter diagnóstico para la familia Bromeliaceae (5,6,8).



Quesnelia arvensis



Wittrockia sp.



Tillandsia recurvata



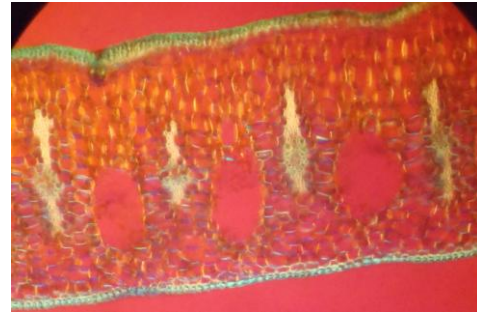
Aechmea orlandiana



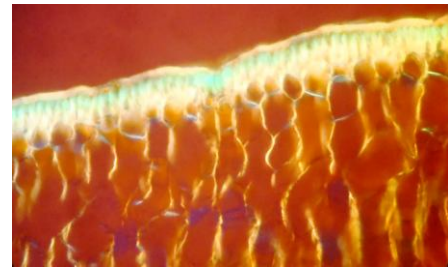
Billbergia rosea

Esta tipificación, coincide con estudios previos reportados por nosotros, en variedades y ecotipos de *Ananas comosus* del Amazonas y con lo reportado por otros investigadores (6,8).

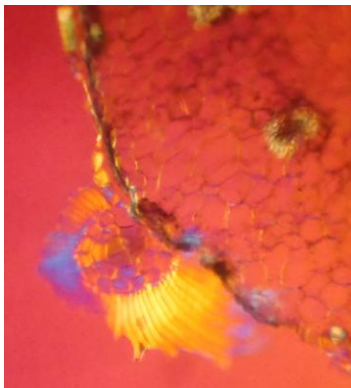
Es interesante destacar, el valor diagnóstico de las escamas presentes en la familia Bromeliaceae, en las Bromelioideae se ubican en hileras y las células del disco y el ala no se diferencian fácilmente entre sí. En las Tillandsioideae, las escamas son más diferenciadas, presentando una asimetría en el ala que favorece la función de absorber agua del ambiente, se ubican cubriendo toda la superficie de la hoja.



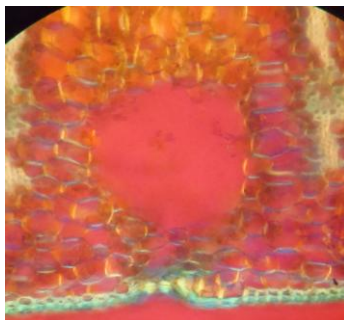
Aspecto general del corte transversal de la hoja de *Canistrum sp.* Se observa epidermis superior con base de escama, hipodermis mecánica, parénquima acuífero, parénquima clorofiliano, canales de aireación, haces vasculares y epidermis inferior. CT. Luz polarizada 200x.



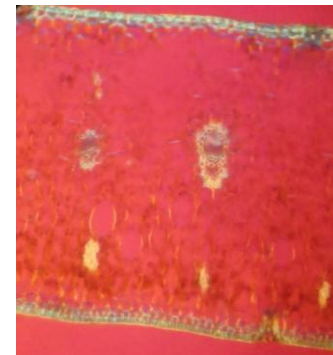
Epidermis superior con engrosamientos en forma de U, hipodermis mecánica, hipodermis acuífera y parénquima acuífero con células alargadas de *Aechmea variegata*. CT. Luz polarizada 200x.



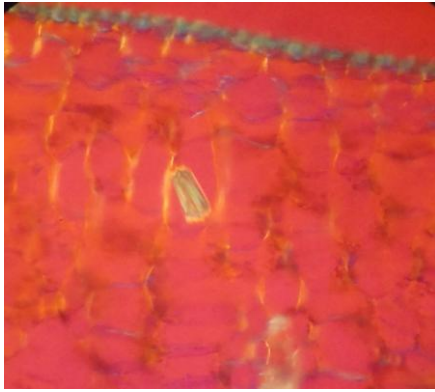
Escama asimétrica de *Tillandsia recurvata*, se observan los haces vasculares y el mesófilo homogéneo. CT. Luz polarizada 100x.



Canal aerífero y aerénquima, con comunicación a la cámara subestomática en la epidermis abaxial de la hoja de *Canistrum sp.* CT. Luz polarizada. 200x.



Aspecto general en corte transversal de la hoja de *Aechmea orlandiana*. Se observa epidermis superior, hipodermis mecánica superior e inferior, haces vasculares, paquetes de fibras y canales en el mesófilo clorofiliano, base de escama en la epidermis abaxial. CT. Luz polarizada 200x.



Parénquima acuífero e idioblasto con paquete de rafidios en CT de hoja de *Neoregelia sp.* Luz polarizada 200x.

Consideraciones finales

- Las 21 especies que hasta el momento hemos estudiado pertenecen principalmente a las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae.
- El patrón anatómico foliar es el típico de la familia Bromeliaceae, aunque se observan diferencias entre ellas a nivel de subfamilia, género y en algunos casos entre especies.
- Se establecen patrones de tipificación y comparación, entre los géneros y especies estudiados.
- Bromelioideae presenta mesófilo, hipodermis mecánica en ambas caras, hipodermis acuífera, parénquima acuífero variable en la cara adaxial y clorénquima en la abaxial.
- Tillandsioideae muestra un patrón estructural más homogéneo y no se observa, ni hipodermis mecánica ni parénquima acuífero.
- Los paquetes de fibras extravasculares y los canales de aerénquima, varían en número y ubicación en Bromelioideae. En las hojas del género *Tillandsia*, los paquetes de fibras están ausentes.
- El patrón de tipificación es notablemente diferente entre *Tillandsia recurvata* y *Tillandsia flexuosa*
- Los cristales de oxalato de calcio son de carácter diagnóstico para la familia Bromeliaceae.

Referencias

1. **Benzing D.H.** (2000). Bromeliaceae profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge. 708 pp.
2. **Escala, M y Hermoso, L.** (2014). Morfología y Anatomía de frutos y semillas. Aplicación e Importancia en Taxonomía y Biología de Dispersión. **Memorias del Instituto de Biología Experimental 7:** 113-116.
3. **Holst, B. y Vivas, Y.** (2008). Bromeliaceae. En: (Hokche, Huber y Berry eds.). **Nuevo catálogo de la flora de Venezuela.** pp 859.
4. **Metcalf, C. y Chalk, L.** (1950). Anatomy of the Dicotyledons. Vol II. 2nd. edition. Clarendon Press, Oxford.
5. **Pineda, A., Vargas, T., Escala, M. y García, E. de.** (2012). Organogénesis in vitro en piña “Española Roja” y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. **Bioagro 24(3):** 175-186.
6. **Proença, S. y Sajo, M.** (2007). Anatomia Foliar de Bromélias Ocorrentes em Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Bot. Bras. 21:** 657-673.
7. **Smit, L.B. y Downs, R.J.** (1974). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop. Monogr. 14(1):** 1-658.
8. **Tomlinson P.B y Metcalfe, E.** (1969). **Anatomy of the Monocotyledons.** 446 pp.

Estudios morfoanatómicos de la hoja y los frutos en especies de Lauraceae con interés biosistemático

HERNÁN FERRER PEREIRA^{1,2}, MARÍA B. RAYMÚNDEZ² Y MARCIA ESCALA¹

¹Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.

Correo-e: hernan.ferrer@ciens.ucv.ve; mescala2006@gmail.com

²Laboratorio de Biosistemática y Citogenética Vegetal, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela,
Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela.

Correo-e: maria.raymundez@ciens.ucv.ve

Los estudios morfoanatómicos han resultado claramente efectivos para la diagnosis de especies de angiospermas silvestres y cultivadas. Venezuela cuenta con una flora vascular de más 200 familias y 16.000 especies. Entre éstas, se han identificado diversos complejos de especies dentro de la familia Lauraceae que requieren ser aclarados. Hasta la fecha, se han logrado descifrar caracteres diagnósticos entre los géneros *Beilschmiedia* y *Persea* para el Neotrópico. En este contexto, se condujo un estudio de la morfoanatomía foliar de las especies del subgénero *Persea*, a fin de identificar el entorno biosistemático del aguacate en virtud de su aprovechamiento comercial. Se caracterizaron nuevos atributos de potencial interés informativo a nivel taxonómico a partir de la morfoanatomía foliar, especialmente de valor diagnóstico entre especies. Con este nuevo conjunto de caracteres, se reconoció a *P. schiedeana*, *P. steyermarkii*, *P. pallescens* y *P. americana* como especies dentro del subgénero *Persea*. Consecuentemente, este estudio se amplió para incorporar todas las especies de *Persea* descritas para Venezuela (24 spp.) y abordar progresivamente la morfotaxonomía de *Ocotea* (84 spp.), ya que ambos géneros resulta un gran reto por la diversidad y número de especies reportadas para Venezuela, conjuntamente con sus endemismos.

Introducción

La información de los caracteres anatómicos foliares en Lauraceae (1,7,8) ha resultado muy útil en la implementación de esta herramienta con fines taxonómicos. Nishida (7) caracterizó especies de *Beilschmiedia* para el Neotrópico a partir de atributos de la epidermis, así como de la anatomía del nervio medio y los patrones de venación. Otros autores han explorado más datos sobre la diversidad de caracteres epidérmicos y del nervio medio foliar en otros géneros de Lauraceae (3,10). Para la familia Lauraceae se han descrito casi 2.500 especies en todo el mundo, siendo el género *Ocotea* uno de los más grandes con más de 300 especies, seguido de *Persea*, con 85 (4).

Enfoque morfotaxonómico de las especies de *Persea* subgénero *Persea*

Kopp (5) describió las diferencias entre dos subgéneros de *Persea*, denominados *Persea* y *Eriodaphne*. El aguacate (*Persea americana* Mill) constituye la especie de mayor relevancia dentro del género y se empleó para caracterizar el subgénero *Persea*. Así mismo, se han descrito seis especies más dentro del subgénero y tres variedades para *P. americana*: *drymifolia*, *nubigena* y *americana*, con interés de adjudicar una entidad taxonómica válida a

los grupos hortícolas de aguacate: Mexicana, Guatemalteca y Antillana, respectivamente.

A partir de una revisión de herbarios nacionales y extranjeros (VEN, TEFH, EAP, HUH, NY y F) y de salidas de campo, se recolectó un conjunto de muestras para el análisis morfoanatómico siguiendo las técnicas tradicionales de herborización. La información morfológica se obtuvo por observación directa de la muestras a simple vista y con ayuda de microscopio estereoscópico, utilizando Delta System para la recolección y procesamiento de datos (2). Se seleccionó un conjunto de hojas para ser rehidratadas y realizar los estudios anatómicos, principalmente de la epidermis, mesofilo y nervio medio. Las epidermis fueron aclaradas utilizando una dilución de ácido nítrico, mientras que las preparaciones de nervio medio se realizaron con la metodología de doble tinción (6).

La matriz elaborada en el Editor DELTA contó con 165 caracteres cualitativos y 20 caracteres cuantitativos, para un total de 185 caracteres (125 morfológicos y 60 anatómicos). La muestra estuvo representada por 106 unidades taxonómicas operativas (UTO).

Se identificaron caracteres novedosos a partir de la morfología foliar e inflorescencias para la identificación taxonómica: la orientación, cobertura y dirección de los tricomas, características de la

venación foliar secundaria y terciaria, presencia y forma de las areolas, forma de las yemas florales y posición de las inflorescencias respecto al brote apical del tallo. Se encontraron diferencias en la dirección de los tricomas (lisos, ondulados y fuertemente ondulados), en la orientación de los mismos (adpresos, ascendentes y erectos) y en la cobertura de la superficie foliar, generalmente en la cara abaxial. El crecimiento de las inflorescencias va desde axilares a subterminales; y en este último estado, las nuevas inflorescencias pueden emerger en la punta de las ramas (en posición terminal) o por debajo de los nuevos brotes en crecimiento. Se identificaron tres contornos diferentes para las yemas florales: turbinado (ovoide con el extremo basal truncado), ovoide y subsférico.

Los caracteres morfológicos potencialmente taxonómicos, identificados son: contorno de las láminas foliares, curso y unión de las ramificaciones secundarias, patrón de la venación terciaria, posición de las inflorescencias respecto a la yema apical, forma de las yemas florales, presencia, dirección, orientación y cobertura del indumento en ramas, yemas, pecíolos, láminas foliares y tépalos.

En corte transversal de la lámina foliar adyacente al nervio medio se observó una capa cuticular de grosor variable, desde menos de un cuarto hasta la mitad de la altura de las células epidérmicas; la epidermis resultó uniestratificada, formada por células rectangulares (con el eje mayor orientado periclinalmente) o cuadrangulares, hipodermis ausente. El parénquima en empalizada presentó 1 a 2 hileras de células compactas, tabulares, donde generalmente las células de la hilera subepidérmica son más elongadas que la hilera siguiente, presentando con frecuencia células oleíferas incluidas. El parénquima esponjoso es laxo, compuesto por 3 a 6 hileras de células lobuladas. Se observó que los haces vasculares dispuestos en el mesófilo están rodeados de una vaina esclerenquimática transcurrente de epidermis a epidermis (Fig. 1a, b).

La cara adaxial del nervio medio presentó atributos novedosos de carácter taxonómicamente informativo por sus diferencias en corte transversal, desde cóncava hasta convexa, formada comúnmente por colénquima subepidérmico o esclerenquima. Las diferencias entre especies, para este atributo, tienen aplicación taxonómica dentro del subgénero *Persea*, describiéndose *P. schiedeana* con superficie convexa, mientras que en *P. floccosa*, *P. steyermarkii* y *P. pallescens* resultó cóncava (Fig. 1).

El haz vascular central es típicamente colateral y puede tener un contorno cóncavo-convexo en forma

de media luna o en forma de V (porción central de la cara abaxial en ángulo, no en arco), y está generalmente rodeado por una vaina de esclerenquima de grosor variable, abaxialmente ondulado a sinuoso (Fig. 1 c, d y 2).

El parénquima abaxial del nervio medio está conformado por células de tamaño regular, a veces con inclusiones de células oleíferas en la región abaxial. En la cara abaxial se observaron hasta 11 hileras de colénquima lagunar subepidérmico (Fig. 1), llegando a encontrarse en algunos casos (*P. americana* var. *drymifolia*, *P. pallescens*) al menos una hilera de esclerenquima en posición subepidérmica (Fig. 1e).

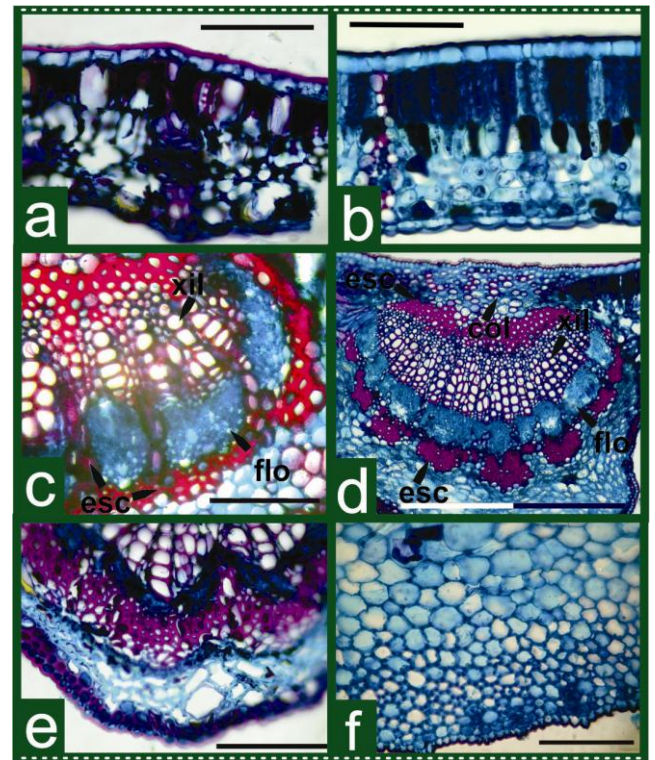


Fig. 1. Detalles del mesófilo y nervio medio de especies de *Persea*: mesófilo en *P. steyermarkii* (a) y *P. americana* (b) mostrando los haces vasculares transcurrentes; detalles del nervio medio en *P. americana* (c y d) mostrando el desarrollo de la vaina esclerenquimática alrededor de la vena media; zona abaxial del nervio medio en *P. steyermarkii* (e) y *P. schiedeana* mostrando esclerenquima y colénquima subepidérmicos. Leyenda: colénquima (col), epidermis (epi), floema (flo), esclerenquima (esc), parénquima (par) y xilema (xil). Barra = 500 μ m (a y b), barra = 100 μ m (c y d).

En vista paradérmica, las epidermis abaxiales tienen paredes periclinales lisas en su mayoría, pudiendo

ser granuladas en *P. schiedeana* y *P. floccosa*, y con proyecciones papilosas en *P. steyermarkii* y *P. schiedeana*. Las paredes anticlinales pueden ser gruesas o delgadas, generalmente de contorno variable (recto, ondulado o sinuoso), pero en *P. schiedeana*; *P. floccosa* y *P. pallescens* se observan siempre onduladas. Sólo los ejemplares del complejo *Persea americana* y *P. schiedeana* presentaron tricomas.

En la Fig. 2 se ilustran algunos nuevos atributos descritos para su implementación taxonómica y biosistemática en *Persea*.

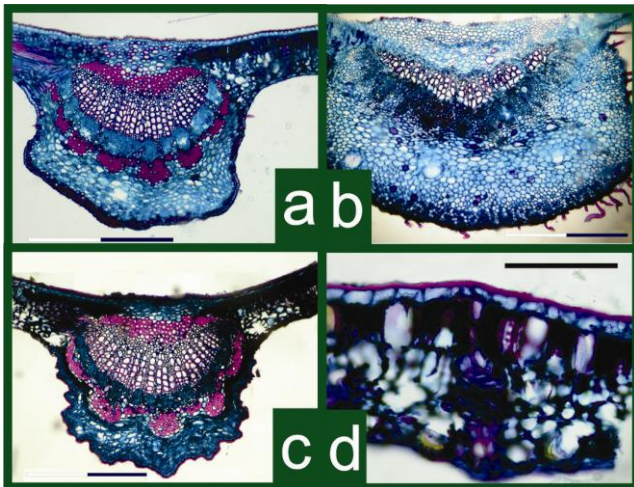


Fig. 2. Nuevos atributos identificados relativos al haz vascular del nervio medio: a.- haz vascular segmentado por hileras de esclerenquima y rodeado de una vaina esclerenquimática de contorno ligeramente ondulado en la cara abaxial, b.- haz vascular compacto rodeado de una vaina esclerenquimática de contorno ondulado, c.- haz vascular segmentado con contorno sinuoso, d.- detalle de las ondulaciones y segmentación del nervio medio. Leyenda: colénquima (col), floema (flo), esclerenquima (esc) y xilema (xil). Barra = 100 μm (en a, b y d); 500 μm (en c).

La deposición de la cutícula en el cuerno posterior de las células oclusivas del aparato estomático tiene forma de labio grueso en *Persea americana* y en *P. schiedeana*, mientras que en *P. steyermarkii* y *P. pallescens* tiene forma de labio delgado. Sólo en *P. schiedeana* se observaron arrugas en la pared exterior de las células oclusivas.

Se reconoció a *P. schiedeana*, *P. steyermarkii*, *P. pallescens* y *P. americana* como especies dentro del subgénero *Persea*. No se encontraron caracteres claramente definidos para diferenciar entre las tres variedades de *P. americana* a partir de la morfoanatomía foliar.

Estudio de la anatomía foliar de las especies endémicas de Ocotea Aubl. para Venezuela.

El género *Ocotea* ha sido poco estudiado debido al gran número de especies que agrupa y la diversidad morfológica de las mismas, resultando difícil un análisis completo y detallado del conglomerado de lo que hoy en día conocemos como el Complejo *Ocotea*. En Venezuela, el género tiene una representación de 84 especies descritas, las cuales han sido colectadas en diversos ambientes como bosques nublados, bosques pluviales, bosques caducifolios, arbustales tepuyanos, cumbres de tepuyes, sabanas de arena blanca, entre otros. La mayor diversidad de especies se presenta al sur del Orinoco con 41 taxones, siendo 20 de éstas endémicas de la Guayana Venezolana, principalmente distribuidas en las tierras altas del Pantepui.

En vista de la cantidad de especies del género se hace difícil ajustar todos los caracteres dentro de una clasificación que resulte fácil de trabajar tanto directamente en campo como en herbario y/o laboratorio. La identificación de materiales vegetativos depositados en los herbarios se vuelve un reto para los taxónomos clásicos y la implementación de herramientas moleculares resulta costosa sólo para identificar los taxones y actualizar las colecciones de herbario.

Actualmente, se ha encontrado que la aplicación de caracteres morfológicos y anatómicos foliares aportan información valiosa para la taxonomía de las Lauraceae (1,7,9). Los estudios morfológicos dirigidos al análisis de los patrones de venación, y los anatómicos, enfocados sobre la variación de los atributos epidérmicos y de nervio medio, podrían resultar potencialmente informativos de manera taxonómica. Dentro de este proyecto se pretende 1) elaborar una base de datos morfoanatómicos de las especies del género *Ocotea* como aporte al conocimiento taxonómico y florístico de la familia Lauraceae en Venezuela, 2) determinar caracteres morfológicos y anatómicos de relevancia taxonómica para la distinción de grupos de especies y/o de afinidades ecológicas, a fin de 3) generar una clave diagnóstica para las especies venezolanas estudiadas; 4) identificar los patrones biogeográficos de *Ocotea* en Venezuela, en función de los datos de herbario; y 5) contribuir con la curaduría de la familia Lauraceae en el Herbario Nacional de Venezuela (VEN).

Hasta la fecha se han realizado preparaciones anatómicas del nervio medio y epidermis foliar de 20 especies de *Ocotea* reconocidas como endémicas para Venezuela. Los patrones anatómicos muestran atributos variables e informativos como en el caso de las especies de *Persea*. Se han registrado diferentes estados/caracteres para la epidermis foliar,

tales como: paredes anticlinales delgadas, gruesas y muy gruesas, de contorno recto u ondulado, con deposiciones de cutícula en el cuerno posterior del aparato estomático en forma de labio grueso o de murciélago (Fig. 3). Así mismo, el nervio medio puede ser descrito con forma de media luna (cóncavo-cóncavo) o aplanado (ampliamente cóncavo-recto o ligeramente convexo).

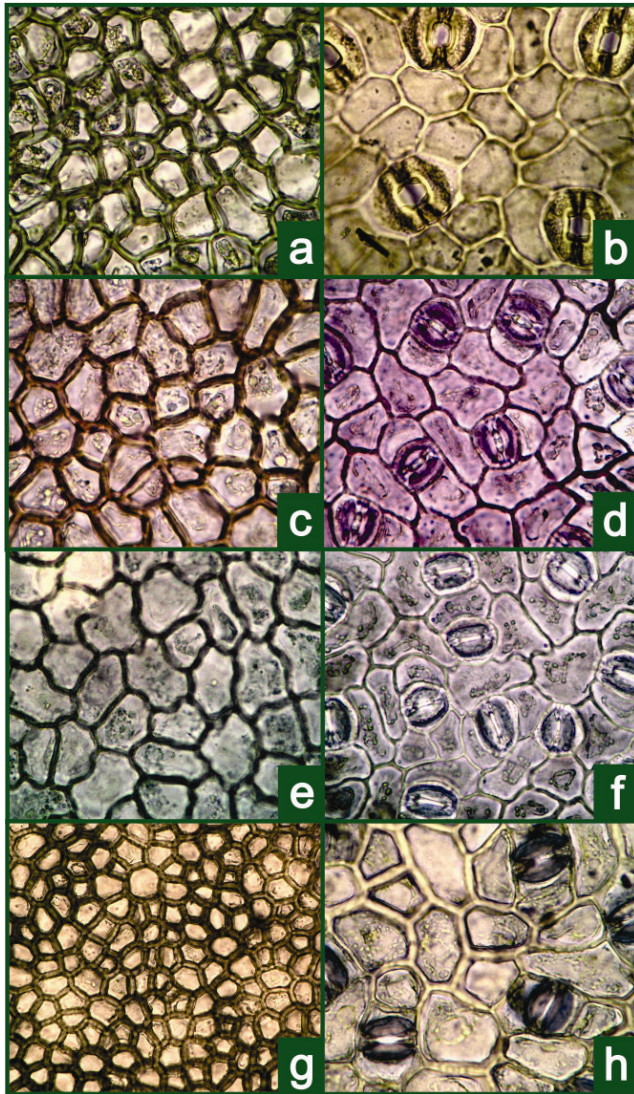


Fig. 3. Epidermis adaxiales y abaxiales en *Ocotea basirecurva* (a, b), *O. glaucophylla* (c, d), *O. duidensis* (e, f) y *O. glabra* (g, h) mostrando diferencias en el contorno y grosor de las paredes anticlinales así como en la forma de la deposición de la cutícula en el cuerno posterior del estoma.

El análisis de estas especies será complementado en adelante con el estudio de la morfología foliar (patrones de venación mayor y menor, características del indumento, entre otros) y del fruto (cúpulas con margen simple o doble, hemisféricas o discoides, lenticeladas o lisas) a fin de ampliar la

descripción original de las especies y plantear una clave de determinación.

Referencias

1. **Christophel, D.C., Kerrigan, R. y Rowett, A.I.** (1996). The use of cuticular features in the taxonomy of the Lauraceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **83**(3): 419-432.
2. **Ferrer-Pereira, H., Vivas-Arroyo, Y., Nozawa, S., Hokche, O., Pérez-Cortéz, S., Rodríguez, L., Mostacero, J. y Estrada, J.** (2010). Aplicación de herramientas computacionales en el estudio morfotaxonomico del género *Merremia*. *Rodriguesia* **61**(4): 661-668.
3. **Ferrer-Pereira, H., Raymúndez, M.B. y Pérez-Almeida, I.** (2011). Caracterización anatómica del nervio medio de los aguacates mexicanos depositados en el INIA-CENIAP. XIX Cong. Venez. Bot., Maracay, Estado Aragua.
4. **Ferrer-Pereira, H.** (2012). Aportes al conocimiento taxonómico del género *Persea* Mill. (Lauraceae) en Venezuela. *Hoehnea* **39**(3): 435-478.
5. **Kopp, L.** (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (Perseeae-Lauraceae). *Mem. New York Bot. Gard.* **14**: 1-117.
6. **Kraus, J.E., de Sousa, H.C., Rezende, M.H., Castro, N.M., Vecchi, C. y Luque, R.** (1998). Astra Blue and Basic Fuchsin Double Staining of Plant Materials. *Biotechnic and Histochemistry* **73**(5): 235-243.
7. **Nishida, S.** (1999). Revision of *Beilschmiedia* (Lauraceae) in the Neotropics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **86**: 657-701.
8. **Nishida, S. y Christophel, D.C.** (1999). Leaf anatomy of *Beilschmiedia* (Lauraceae) in Neotropics. *Nature and Human Activities* **4**: 9-43.
9. **Nishida, S. y Van der Werff, H.** (2011). An evaluation of the classification by cuticular characters of the Lauraceae: a comparison to molecular phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **98**: 348-357.
10. **Parra, J.** (2007). Anatomía del leño y foliar en especies del Orden Laurales de la selva San Eusebio del estado Mérida, Venezuela. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado en Botánica Agrícola. Maracay, Venezuela. 98 pp.

Biosistemática y citogenética vegetal como fuente de apoyo al fitomejoramiento y la biotecnología vegetal

HERNÁN FERRER PEREIRA¹, MARÍA B. RAYMÚNDEZ¹ E IRIS PÉREZ ALMEIDA²

¹Laboratorio de Biosistemática y Citogenética Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela. Correo-e: hernan.ferrer@ciens.ucv.ve;

maria.raymundez@ciens.ucv.ve

²Unidad de Biotecnología Vegetal, INIA-CENIAP-Maracay, Venezuela. Correo-e: ibperez@gmail.com

El aguacate (*Persea americana* Mill.) ha sido uno de los cultivos más importantes en América Tropical debido a su evolución en conjunto con civilizaciones prehispanicas. Debido a la relevancia de sus frutos comestibles en la producción nacional y mundial, diferentes instituciones han caracterizado sus colecciones de germoplasma mediante microsatélites, a fin de identificar huellas genéticas que revelen la estabilidad de los cultivares y sus vías de cruzamiento. Con una muestra de 96 individuos (49 cultivares) depositados en el banco de germoplasma del INIA-CENIAP, se ejecutó un análisis con 40 iniciadores SSR y 185 atributos morfoanatómicos. Los genotipos de aguacates evaluados resultaron distintos entre sí y pudieron ordenarse en grupos afines. Se identificaron 13 marcadores informativos. Los genotipos Mexicana y Guatemalteca fueron reconocidos con los iniciadores AVAG25, AVD017 y AVD022; mientras que los cultivares venezolanos de Guatemalteca×Antillana pueden separarse de los híbridos introducidos por diferencias en los loci AVD006, AVD022, AVAG22 y AVAG25. Se estableció un sistema de identificación de cultivares tomando los alelos y marcadores más influyentes en el análisis, con una eficiencia de resolución del 85%. Con ello, se podrá iniciar la certificación de plantas para cultivadores asistida con microsatélites, dentro de los planes de mejoramiento genético del cultivo.

Introducción

El conocimiento de la diversidad vegetal está vinculado al aprovechamiento de estos recursos con fines antrópicos. Cada forma silvestre adaptada progresivamente a la domesticación trascendió paso a paso las reglas de la evolución para incorporar los cambios fundamentales que el ser humano produjo con su interferencia a través del mejoramiento genético (10).

Como parte de la planificación de un proyecto de mejoramiento, se analizaron e investigaron las especies emparentadas con el objeto de estudio junto con su entorno evolutivo y filogenético (10). En este contexto, se condujo un proyecto de investigación dirigido a esclarecer las relaciones y afinidades entre diferentes grupos hortícolas de aguacates (*Persea americana* Mill.) teniendo en cuenta cultivares nativos y extranjeros.

Las implicaciones biosistemáticas de *Persea americana* y sus variedades, abordadas con herramientas moleculares (microsatélites, RFLP, entre otros), conllevan una visión agronómica dirigida al mejoramiento vegetal (10,13) con el objeto de identificar las relaciones entre especies silvestres y cultivadas, genealogías y otras características que aporten mayor rendimiento y/o

resistencia a plagas y enfermedades (3,13). Por esto, resulta de gran interés aplicar estas herramientas, específicamente los microsatélites, al mayor número de taxones posible para alcanzar una perspectiva taxonómica amplia que permita determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Persea*, los subgéneros descritos por Kopp (12) y el posible origen de cada una de las variedades descritas de *P. americana*.

Caracterización molecular de cultivares de aguacate (Persea americana Mill.) con fines biosistemáticos y biotecnológicos.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) ha sido uno de los cultivos más importantes en América Tropical debido a su evolución en conjunto con civilizaciones prehispanicas. El posible origen y domesticación del mismo se remonta a 10.000 años atrás. Se han descrito tres variedades de aguacates: *P. americana* var. *americana*, *P. americana* var. *drymifolia* y *P. americana* var. *nubigena*, las cuales coinciden con los grupos hortícolas reconocidos como Antillana (A), Mexicana (M) y Guatemalteca (G), respectivamente (12).

La aplicación de herramientas moleculares como RFLP (5,6) y microsátelites (1,3,8) ha apoyado la circunscripción de las tres entidades infraespecíficas y permiten identificar los procesos de hibridación y/o retrocruce que se han dirigido para mejoramiento del cultivo.

La determinación de la hibridación e introgresión de genes a lo largo de estudios genealógicos en *P. americana* y sus variedades botánicas ha sido compleja, y conlleva una larga historia firmemente asociada al desarrollo de las civilizaciones mesoamericanas (5,6,9).

Debido a la relevancia que representa el cultivo de aguacate (*Persea americana* s.l.) en la producción nacional y mundial de frutos comestibles, diferentes investigadores han caracterizado colecciones de germoplasma de aguacates a partir de microsátelites (SSR) a fin de identificar huellas genéticas propias que revelen la estabilidad de los cultivares y sus vías de cruzamiento. Se han realizado evaluaciones de diferentes cultivares de *P. americana* depositados en bancos de germoplasma de Florida (16), La Habana (14) y Málaga (2), respectivamente, utilizando microsátelites (SSR) para caracterizar todas las accesiones evaluadas y determinar diversas relaciones ecológicas y/o botánicas entre las mismas. Al menos 14 iniciadores (16) son altamente eficaces y útiles para identificar entre 224 accesiones y agruparlas en conjuntos representativos de los conocidos grupos hortícolas (2,5,14,16).

De manera similar, Acheampong *et al.* (1) evaluaron 172 genotipos de aguacate depositados en la colección de germoplasma de la Universidad de Ghana, utilizando 12 loci SSR. Los genotipos estuvieron representados por materiales de los tres grupos hortícolas y colecciones autóctonas realizadas en el campo. El promedio de alelos por locus encontrados fue de 4,42 y los valores de heterocigosidad esperada (0,51) fueron 47% más altos que los de heterocigosidad observada (0,36). El análisis de distancia genética fue bajo (0,00 a 0,07) dentro de los materiales autóctonos pero disímil respecto a los cultivares introducidos, de acuerdo con los criterios de los autores. Además de ello, los autores expresaron que el pool genético de las colecciones de aguacates de Ghana tiene mayor afinidad con los cultivares de Antillana que los otros grupos hortícolas incluidos (1).

En Venezuela, la mayor colección de aguacates se encuentra depositada en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP. A diferencia de las colecciones de Florida (16), Málaga (2) y La Habana (14), las cuales tienen un amplio registro de cultivares puros e híbridos del grupo Mexicana, la colección de

aguacates del INIA-CENIAP está enriquecida con cultivares del grupo Guatemalteca e híbridos de Guatemalteca x Antillana introducidos y nativos. Esto se debe a la facilidad de cultivo de estos grupos en el clima tropical y la preferencia de los consumidores por el tipo de fruto que producen.

Esta investigación generó nuevos datos obtenidos de 40 iniciadores SSR y 185 atributos morfoanatómicos tomados directamente de los ejemplares de la colección del INIA-CENIAP. A partir de ambas fuentes de información se obtuvo la caracterización genotípica de los ejemplares venezolanos y extranjeros.

Con una muestra de 96 individuos (49 cultivares) depositados en el banco de germoplasma del INIA-CENIAP se ejecutó un análisis con 40 microsátelites (SSR) específicos para *Persea americana*. Las amplificaciones se visualizaron a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y se identificó el número y tamaño de alelos para la caracterización de individuos y cultivares. Los parámetros genéticos (Na, Ne, Fis, Ho, He y frecuencias alélicas) se obtuvieron con POPGENE v.1.32. Todos los genotipos evaluados resultaron distintos entre sí y pudieron ordenarse en grupos afines. Se identificaron 13 marcadores informativos: AVA12, AVAG05, AVAG13, AVAG21, AVAG22, AVAG25, AVD006, AVD013, AVD017, AVD022, AVT143, AVT386 y AVT448. Na y Ne variaron de 4 a 11 y de 2,46 a 8,18, respectivamente, mientras que los tamaños de alelos se ubicaron entre 73 y 376 pb. La Ho osciló entre 0,1023 y 0,6105, y para la He se alcanzaron valores de 0,7227 a 0,8817. Se registraron 26 alelos raros, mientras que no se encontró ningún alelo fijo. Sólo el marcador AVT106 resultó monomórfico (8).

Los resultados obtenidos a partir de los atributos de presencia/ausencia de bandas fueron analizados a través de análisis multivariante y nuevos programas de análisis filogenético, a fin de identificar los marcadores más influyentes en el estudio y las relaciones entre los cultivares puros e híbridos. Se demostró que existen diferentes linajes para un mismo grupo hortícola dentro de la colección y relaciones de parentesco entre cultivares nativos y extranjeros (8).

La implementación de dendrogramas reticulados, aplicados en estudios filogenéticos, resultó efectiva para identificar patrones de parentesco genético entre cultivares, identificando linajes diferentes para un mismo grupo dentro de la colección y relacionando cultivares híbridos nativos e introducidos a través de un parental presumible. Estos dendrogramas permiten recuperar información

perdida luego del patrón heurístico del análisis, reintegrando nueva información dentro del árbol final.

Habiendo reconocido los alelos y marcadores más influyentes en el análisis, se estableció un sistema de identificación de cultivares, utilizando 9 de los 18 marcadores SSR que resultaron diagnósticos, con una eficiencia de resolución del 85%. Con ello, se podrá iniciar la certificación de plantas para cultivadores, asistida con microsatélites, dentro de los planes de mejoramiento genético del cultivo.

Los genotipos Mexicana y Guatemalteca pudieron ser reconocidos con tres iniciadores específicos, mientras que los cultivares nativos de Guatemalteca x Antillana pueden separarse de los híbridos introducidos por diferencias en cuatro loci (AVD006, AVD022, AVAG22 y AVAG25). Esto puede ser explicado por razones ecológicas y por selección antrópica dirigida por las características de preferencia del fruto en el mercado local (8).

Respecto a la información morfoanatómica, 71 caracteres morfológicos y 30 caracteres de la anatomía foliar resultaron potencialmente informativos para la discriminación de grupos; así mismo se identificaron caracteres novedosos para el estudio biosistemático de aguacates cultivados relativos al indumento y la anatomía del nervio medio foliar. Los cultivares de Mexicana y Antillana pueden ser diferenciados entre sí por varios atributos morfológicos y anatómicos foliares, mientras que en los ejemplares de Guatemalteca no se encontraron caracteres diagnósticos, sino que los estados registrados en este caso se solaparon con Antillana. Mexicana resultó el grupo hortícola con mayor cantidad de caracteres diagnósticos (15).

Se identificó que la presencia de olor anisado en los tallos, la sección transversal y pubescencia de las ramas, el contorno foliar, la presencia de bases cordadas o cuneadas y la ramificación de las venas secundarias pueden emplearse con fines taxonómicos, principalmente para separar entre los cultivares de Mexicana y de Antillana. Aunado a estos atributos, el indumento resultó variable y potencialmente informativo. Los tricomas siempre son simples y unicelulares, pueden variar sobre las ramas, pecíolos, láminas foliares y tépalos en su dirección (de lisos a ondulados), orientación (adpresos hasta erectos) y cobertura (desde muy laxa a medianamente densa) (15).

Se confirmó la variabilidad en formas y tamaños de los frutos descritos por Avilán y Rodríguez (4) (Fig. 1); sin embargo no se encontraron diferencias en la morfología de las inflorescencias propuestas por

Ferrer Pereira en especies silvestres de *Persea* (7) (Fig. 2).

Al comparar los caracteres potencialmente descriptivos y taxonómicos entre grupos hortícolas junto con los atributos empleados en los descriptores de aguacate (4,11), se encontraron diferencias notorias por la importancia relativa de la inclusión de nuevos atributos morfológicos y anatómicos para la identificación de los materiales, además de la implementación de los caracteres moleculares de las secuencias SSR como una herramienta multifuncional de identificación y certificación de plantas dentro del Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP resulta como novedad derivada de esta investigación. Toda esta certificación puede influir sobre la versatilidad de los programas de mejoramiento genético conducidos en la colección a mediano y largo plazo.

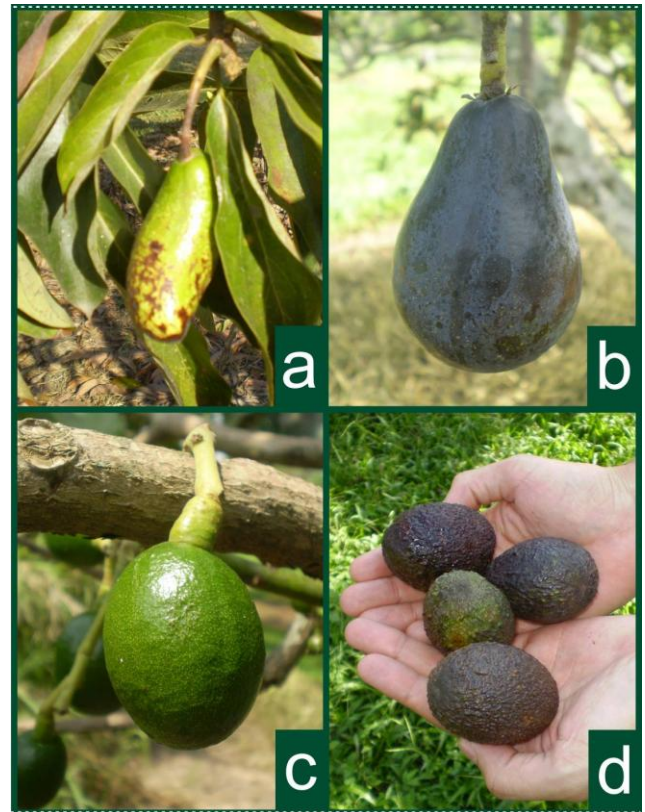


Fig. 1. Variación en la forma de los frutos observados en campo: a.- oblonga en Esparta (Guatemalteca x Antillana nativo), b.- obovada-piriforme en Mexicola (Mexicana), c.- oblata en Winslowson (Guatemalteca x Antillana introducido) y d.- obovada en Hass (Guatemalteca x Antillana introducido).

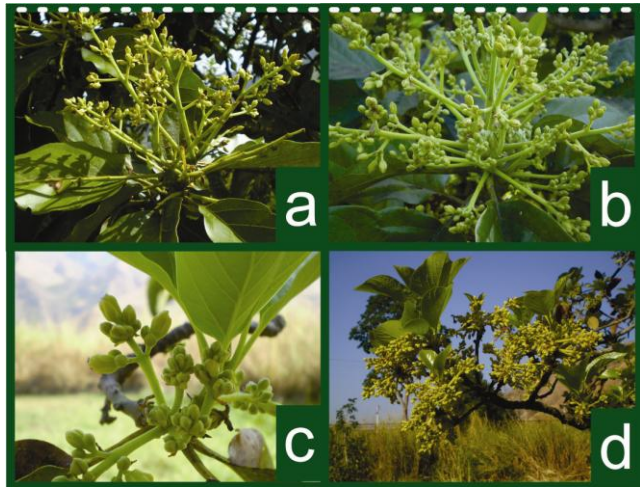


Fig. 2. Ramas e inflorescencias de cuatro cultivares de aguacates depositados en la colección del INIA-CENIAP: (a).- Simmonds (Antillana), (b).- Lozada (Guatemalteca x Antillana nativo), (c).- Figueroa (Guatemalteca x Antillana nativo), (d).- Secundino (Guatemalteca).

Referencias

1. **Acheampong, A.K., Akromah, R. y Ofori, F.A.** (2008). Genetic characterization of Ghanaian avocados using microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **133**(6): 801–809.
2. **Alcaraz, M.L. y Hormaza, J.I.** (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas* **144**(6): 244–253.
3. **Ashworth, V.E.T.M. y Clegg, M.T.** (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J. Hered.* **94**(5): 407–415.
4. **Avilán, L. y Rodríguez, M.** (1997). Descripción y Evaluación de la colección de aguacates (*Persea* spp.) del CENIAP (Serie A N° 12). Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, IICA/ CReA/ PROCANDINO/ FRUTEX.
5. **Clegg, M.T., Gaut, B.S., Duvall, M.R. y Davis, J.** (1993). Inferring plant evolutionary history from molecular data. *New Zeal. J. Bot.* **31**: 307–316.
6. **Clegg, M.T., Kobayashi, M. y Lin, J.-Z.** (1999). The use of molecular markers in the management

- and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Hort.* **5**: 227–331.
7. **Ferrer Pereira, H.** (2012). Aportes al conocimiento taxonómico del género *Persea* Mill. (Lauraceae) en Venezuela. *Hoehnea* **39**(3): 435–478.
 8. **Ferrer Pereira, H., Pérez Almeida, I. y Raymúndez U., M.B.** (2015). Parámetros de diversidad genética y caracterización de cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.) depositados en el INIA-CENIAP, Venezuela. XXI Cong. Venez. Bot. UCV, Caracas.
 9. **Furnier, G.R., Cummings, M.P. y Clegg, M.T.** (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *J. Hered.* **81**: 183–188.
 10. **Hettterscheid, W.L.A., van den Berg, R.G. y Brandenburg, W.A.** (1996). An annotated history of the principles of cultivated plant classification. *Acta Bot. Neerl.* **45**(2): 123–134.
 11. **International Plant Genetic Resources Institute IPGRI** (1995). Descriptors for Avocado (*Persea* spp.). IPGRI. Roma, Italia. 106 pp.
 12. **Kopp, L.** (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (Perseeae-Lauraceae). *Mem. New York Bot. Gard.* **14**: 1–117.
 13. **Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. y Lavi, U.** (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 279–286.
 14. **Ramírez, I.M., Fuentes, J.L., Rodríguez, N.N., Coto, O., Cueto, J., Becker, D. y Rohde, W.** (2005). Diversity analysis of Cuban avocado varieties based on agro-morphological traits and DNA polymorphisms. *J. Genet. & Breed.* **59**: 1–12.
 15. **Raymúndez U., M.B., Ferrer Pereira, H. y Pérez Almeida, I.** (2015). Caracterización morfoanatómica de accesiones selectas de aguacate (*Persea americana* Mill.) depositados en el INIA-CENIAP, Venezuela. XXI Cong. Venez. Bot. UCV, Caracas.
 16. **Schnell, R.J., Brown, J.S., Otano, C.T., Power, E.J. y Krol, C.A.** (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **128**(6): 881–889.

Biosistemática vegetal en la caracterización y preservación de la biodiversidad

MARÍA B. RAYMÚNDEZ^{1,3,4}, ANGIE SILVA^{1,3,4}, ALCIDES MONDRAGÓN^{1,2,4} Y REINA GONTO^{1,3}

¹Laboratorio de Biosistemática y Citogenética Vegetal, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela.

Correo-e: maria.raymundez@ciens.ucv.ve; angie.silva@ciens.ucv.ve

²Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía.

Correo-e: alcidesmondragon@ucla.edu.ve

³Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV. Correo-e: rgonto@gmail.com

⁴Postgrado en Ciencias, mención Botánica, Facultad de Ciencias, UCV.

La Biosistemática se vale de la integración de diferentes fuentes de evidencia a fin de interpretar procesos evolutivos que resultan de utilidad para caracterizar grupos vegetales, y sobre todo, como fuente de información básica para ayudar en el desarrollo de planes de preservación y manejo adecuado de nuestra biodiversidad. En este sentido, se presenta el estado de avance de cuatro proyectos de investigación relacionados directamente con la caracterización de la flora venezolana en distintas regiones del país; bien sea con fines ulteriores de conservación, como son los estudios en poblaciones simpátricas de las especies de mangle rojo presentes en el oriente de país, el estudio florístico y ecoanatómico en la sierra de Baragua, al noroccidente del edo. Lara, y la revisión del género *Carex* para Venezuela; o bien, como aporte en la caracterización de almidones procedentes de cereales, leguminosas, frutos y tubérculos que crecen en nuestro país, a fin de abrir puertas a su utilización en su forma nativa o modificada en la industria de los alimentos, del papel, petrolera, textil, cosmética, etc.

Introducción

La Biosistemática se vale de la integración de diferentes fuentes de evidencia que van desde el nivel macro a lo micro, partiendo de la fuente mas tradicional que es la morfológica, pasando por la anatomía, hacia la citogenética, bioquímica y biología molecular, pudiendo integrar también a ellas evidencias biogeográficas y ecológicas a fin de interpretar procesos evolutivos que son de utilidad para caracterizar grupos vegetales, y sobre todo, como fuente de información básica de apoyo en el desarrollo de planes de preservación y manejo adecuado de nuestra biodiversidad. En este sentido, se presenta a continuación el estado de avance de cuatro proyectos de investigación relacionados directamente con la caracterización de la flora venezolana presente en distintas regiones del país.

Caracterización anatómica foliar, citogenética y molecular del complejo mangle rojo (Rhizophora L.) en el oriente de Venezuela, con fines biosistemáticos:

En Venezuela, los bosques de manglar cubren una extensión que alcanza los 2.500 km², ubicados tanto en la línea de la costa continental como en muchas islas costa afuera (8). De las seis especies de mangle reportadas en Venezuela, el género *Rhizophora* contribuye con tres de ellas. Debido a que estas tres especies son morfológicamente similares y se distribuyen frecuentemente de forma simpátrica, su

taxonomía ha sido problemática (9). Los trabajos de Breteler (1,2) argumentan que *R. x harrisonii* es un híbrido entre *R. racemosa* y *R. mangle*, cuya ecología y morfología es intermedia y su distribución geográfica vinculada con la de ambos parentales. Sin embargo, otros autores han reconocido a estas tres entidades como tres especies distintas (2,5,7).

Con el propósito de ampliar el conocimiento que existe acerca del complejo mangle rojo (*R. mangle*, *R. x harrisonii* y *R. racemosa*) en Venezuela, y aportar evidencias que faciliten su caracterización y delimitación biosistemática, se realizó una revisión de las *exsiccatae* depositadas en herbarios nacionales y las colecciones en línea de los herbarios BM, COL, K, NY, y MO, también un estudio embriológico y citogenético gametofítico para contribuir con el conocimiento reproductivo del grupo y sus posibles implicaciones biosistemáticas, información inexistente hasta el momento, así como un estudio anatómico foliar con el objeto de verificar aquellas características con valor sistemático y contribuir con la caracterización anatómica del género en Venezuela y el Neotrópico.

Con respecto al estudio embriológico, las tres especies presentan flores completas, actinomorfas, tetrámeras, perfectas, con 8 anteras apiculadas, subsésiles, monotecas, con el conectivo muy grueso, masivo. Se observa en las tres especies un fenómeno de proliferación de tabiques internos que genera

anteras multiesporangiadas. Este fenómeno ya ha sido reportado en otras especies asiáticas como *R. mucronata* (16) y *R. lamarkii* (6), así como para *R. racemosa* (3), siendo la primera vez que se describen para *R. mangle* y *R. x harrisonii*. Se observa que el desarrollo de la antera es asincrónico, tanto entre anteras de la misma flor como dentro de una misma antera en sección longitudinal; por lo tanto, hay desfase en la microsporogénesis entre flores de una misma inflorescencia, anteras de una misma flor y entre el ápice y la base de una misma antera, comenzando antes el proceso en la porción basal que en la porción apical de la misma, vista en sección longitudinal. La microsporogénesis es de tipo sucesiva para las tres especies, y el tapete es de tipo secretor. Tal como lo esperado, no se encontraron diferencias en el desarrollo de la microsporogénesis entre las tres especies, produciéndose cuatro microsporas morfológicamente normales. Se sugiere profundizar el estudio a fin de observar mayores detalles morfológicos y citogenéticos, sobre todo en *R. x harrisonii*, así como sus implicaciones reproductivas y evolutivas.

Con respecto al estudio anatómico, se reportan diferencias cuantitativas entre especies y poblaciones de cada una de las especie en relación al número de haces vasculares y número de capas de la hipodermis, número de capas de aerénquima y colénquima. Con respecto a *R. x harrisonii* se reportan valores anatómicos cuantitativos intermedios entre *R. mangle* y *R. racemosa*. Los resultados de este estudio indican que hay adaptaciones en los caracteres anatómicos del nervio medio y el peciolo asociados con la cercanía a la costa. En la actualidad, se evalúan otros caracteres anatómicos foliares, se describe el comportamiento meiótico de las tres especies y se combinan estas herramientas con marcadores moleculares (ADN cloroplástico, nuclear y SSRs) que permitan aportar evidencias para lograr una mejor comprensión del género *Rhizophora* en Venezuela.

Composición florística, estructura, ecoanatomía e influencia de la herbivoría en dos bosques secos premontanos de la sierra de Baragua, edo. Lara, Venezuela:

Esta investigación se lleva a cabo con la finalidad de comparar la composición, estructura y diversidad florística de las localidades El Ralo y Villa Rosa de la sierra de Baragua (mcpio. Urdaneta del edo. Lara), así como realizar un aporte en la interpretación ecológica de la anatomía de la madera y la hoja de algunas especies arbóreas de estas comunidades vegetales, en relación al ambiente en que se desarrollan y con la herbivoría caprina tradicional en

la zona. El objetivo final es generar propuestas que permitan la posible recuperación de las zonas perturbadas por la herbivoría.

A través del método de parcelas en diferentes pisos altitudinales se determinó la composición de familias botánicas presentes: Se realizaron 11 parcelas de 200 m² en la localidad de El Ralo, con un total de 2200 m² (0,22 ha), y nueve parcelas de 200 m² en Villa Rosa, dando un total de 1800 m² (0,18 ha). Al incluir solamente los individuos con DAP \geq 2,5 cm se encontraron 29 familias, 78 géneros (5 indeterminados) y 100 especies (5 indeterminadas), donde Capparaceae (13), Fabaceae (10), Myrtaceae (10), Mimosaceae (9), Malvaceae (7), Bignoniaceae y Euphorbiaceae (6), Cactaceae, Caesalpiniaceae, Malpighiaceae y Sapindaceae (5) y Verbenaceae (4) son las familias con el mayor número de especies. Dentro de los géneros mejor representados en especies se destacan *Casearia* (7), *Machaerium* (5) y *Cynophalla* (4).

Las localidades estudiadas presentan una estructura vertical conformada por tres estratos: el primero de 1-5m de alto, el segundo 5,1-10m y el tercero de individuos entre 10,1-15m, encontrándose algunos individuos emergentes entre 18-20m de alto. Éstos últimos se encuentran por lo general entre 12 y 20m en ambas localidades. Se observa una distribución diamétrica del área basal en forma de "J" invertida en todas las especies, característica de los bosques tropicales, lo cual indica que la mayoría de los individuos en las parcelas inventariadas estuvieron en las clases I, II y III, superando en cada uno de los niveles altitudinales para cada localidad el 70% de los individuos con estos diámetros, disminuyendo la cantidad a medida que van aumentando los diámetros del área basal de las plantas evaluadas en ambas localidades. La mayor parte de los elementos registrados presentan alturas inferiores a 5m, encontrándose en El Ralo el 66,36% y en Villa Rosa el 67,05% de los individuos en intervalos entre 1-5 m; los elementos emergentes, corresponden a *Bulnesia arborea*, *Guapira ferruginea*, *Helietta plaeana*, *Koanophyllum celtidifolium* y *Ruagea glabra* en El Ralo, y a *Clusia rosea*, *Abarema jupunba* y *Senegalia polyphylla* en Villa Rosa.

En relación a la abundancia relativa con respecto a los rangos altitudinales, las especies dominantes en El Ralo son las siguientes: *Platymiscium diadelphum* (33,51%) entre los 940-990 msnm, *Prosopis juliflora* (30,84%) entre los 820-920 msnm y también *Tetrapterys anisoptera* (24,70%) entre 940-990 msnm. En la localidad de Villa Rosa, *Clusia rosea* es la de mayor dominancia relativa (58,27%), ubicada en el intervalo superior (1070-1100 msnm); le sigue *Tabebuia* sp. (18,51%), que se presenta en el

intervalo inferior (970-1015 msnm), mientras que *Myrciaria floribunda*, ubicada en el intervalo intermedio (970-1015 msnm), presenta el tercer valor de dominancia relativa (15,27%).

En cuanto al índice de valor de importancia de las especies (IVI), en la localidad de El Ralo los resultados mantienen la tendencia a mostrar la relevancia ecológica que representan *Pilocarpus goudotianus*, *Prosopis juliflora*, *Tetrapterys anisoptera* y *Casearia sylvestris*, así como *Platymiscium diadelphum*, que sobresale en dos de los tres intervalos altitudinales considerados. En Villa Rosa, las especies que mantienen la tendencia a mostrar la relevancia ecológica son *Pilocarpus goudotianus*, en dos de los tres intervalos altitudinales, y *Clusia rosea*, *Phyllanthus botryanthus*, *Platymiscium diadelphum* y *Machaerium latialatum* en los diferentes intervalos altitudinales considerados. De los tres parámetros que conforman el IVI, *Pilocarpus goudotianus* (AbR= 72,15%, DoR= 24,40% y FrR= 22,72%), *Platymiscium diadelphum* (AbR= 48,20%, DoR= 33,51% y FrR= 18,08%), y *Prosopis juliflora* (AbR= 5,69%, DoR= 30,84% y FrR= 11,36%) prevalecen como las especie más representativas del bosque entre los 820 - 990 msnm, en la localidad de El Ralo. En Villa Rosa ninguna especie presenta los tres parámetros con máximo valor.

Al evaluar los resultados de diversidad y riqueza, la zona alta de El Ralo presenta el valor más alto con respecto a la riqueza (65/0,1ha). En Villa Rosa, el índice más alto lo presentan la zona media y alta, en vista que muestran el mismo valor (53/0,1 ha). Las zonas altas en ambas localidades presentan el mayor índice de diversidad de Shannon-Weiner con respecto a las zonas medias y bajas, siendo el valor de El Ralo de 3,08 y en Villa Rosa de 2,84. Tomando un tercer índice de evaluación, como es el índice de Simpson, que muestra la probabilidad de que dos individuos de la misma especie sean tomados al azar, se obtiene que para el caso de El Ralo la diversidad se incrementa a medida que se va de la zona baja a la media y de la media a la alta; con respecto a Villa Rosa, los valores son similares en la zona baja y media, mientras que en la zona alta la diversidad es mayor, lo que revela que la probabilidad de que dos individuos de la misma especie sean tomados al azar en ambas localidades es baja. Comparando los valores de riqueza específica de acuerdo al índice de Margalef, la zona alta de El Ralo es la que presenta mayor riqueza de especies, con un valor de 9,34, mientras que la de menor riqueza específica es la zona baja de la localidad de Villa Rosa, con un valor de 3,52. Sin embargo, realizando el análisis de riqueza específica de las zonas medias y altas, se muestra un elevado

índice de riqueza específica, mientras que las zonas bajas también muestran una diversidad considerable, ya que los valores obtenidos están muy por encima de los valores de referencia por el índice de Margalef, según el cual valores inferiores a 2 son considerados como zonas de baja riqueza específica y por encima de 5 como de alta riqueza. Por otro lado, los valores obtenidos en la determinación de la equidad entre las especies pueden considerarse como altos en ambas localidades, indicando que la distribución de las abundancias es más equitativa en las zonas altas que en aquellos intervalos de las zonas intermedia y baja.

Revisión taxonómica del género Carex L. en Venezuela:

La revisión del género está basada en el análisis de la literatura y en el estudio de los caracteres morfológicos de las *exsiccatae* depositadas en los herbarios nacionales: IVIC, MER, MERC, MERF, MY, MYF, PORT, UCOB, UOJ y VEN, además de los taxa venezolanos depositados en el herbario COL y de las colecciones propias. Paralelamente se consultaron las colecciones venezolanas del género en las páginas web de los principales herbarios extranjeros. También se identificaron muestras de las distintas colecciones revisadas que permanecían sin identidad o ésta estaba errada. Hasta el momento existen nueve secciones de *Carex* representadas en nuestro país, indicándose entre paréntesis el número de especies en Venezuela: Abditispicae (1), Fecundae (2), Ovaeles (6), Paniceae (1), Polystachyae (4), Porocystis (2), Stellulatae (1), Vesicariae (2), Vigneastrae (1), quedando por evaluar 28 especies ubicadas en secciones aun por determinar. Las referencias originales, la data de las *exsiccatae*, el número de pliegos por especie en cada herbario y la categoría nomenclatural se hallan depositados en una base de datos que consta de 23 ítems: Sección, Especie, Autor, Taxones infraespecíficos, Sinonimia, Referencias, Problema, Colector, Número de colección, Fecha de colección, Fenología, Estado, Localidad, Coordenadas, Altitud, Distribución global, Hábitat, Comentarios, Determinación, Categoría nomenclatural (Holótipo, Isótipo, Parátipo) y Herbario depositario.

Caracterización física de almidones nativos y modificados utilizando microscopía de luz polarizada:

El almidón es uno de los polímeros de origen biológico que como carbohidrato de cadena larga posee mas versatilidad de uso en sus estados nativo y modificado, pudiendo ser explotadas sus cualidades no solo desde el punto de vista nutricional, debido a sus propiedades funcionales, sino en muy diversas

industrias de manufactura como la del papel, los plásticos, la petrolera, la cosmética, etc. Para ello, es necesario conocer el potencial de dichos almidones, otorgado por sus características físicas y químicas, que en el primer caso pueden ser descritas en detalle analizando los granos de almidón bajo un microscopio de luz polarizada, sacando partido de la birrefringencia que les otorga la cualidad cristalina de los mismos. Esta propiedad se refleja en la formación de zonas opacas y traslúcidas características de cada tipo de grano de almidón, siendo este patrón dependiente de las proporciones de las zonas amorfas y cristalinas según la disposición de las cadenas de amilasa-amilopectina propias de cada especie y de la difracción de la luz que produce el fenómeno conocido como Cruz de Malta.

En colaboración con la Dra. Elevina Pérez (ICTA-UCV), se vienen evaluando los almidones procedentes de muy diversas fuentes botánicas, que crecen como cultivos extensivos o en conucos en las mas alejadas zonas rurales del país. Las fuentes botánicas evaluadas hasta el momento son tubérculos como la yuca (14,15), el ñame (10,11), el ocumata (12) y el plátano (4).

Las cualidades físicas de los granos de almidón les otorgan además una belleza que puede ser explotada desde el punto de vista artístico (13), haciéndolos acreedores de premios en concursos de fotografía científica.

Referencias

1. **Breteler, F.** (1969). The Atlantic species of *Rhizophora*. **Acta. Bot. Neerl.** **18**: 434-441.
2. **Breteler, F.** (1977). America's Pacific species of *Rhizophora*. **Acta. Bot. Neerl.** **26**: 225-230.
3. **Cornejo, X. y Bonifaz, J.** (2006). *Rhizophora racemosa* G. Mey (Rhizophoraceae) en Ecuador y Perú, y el color de los óvulos: un nuevo carácter en *Rhizophora*. **Brenesia** **65**: 11-17.
4. **Gibert, O., Alemán, S., Guzmán, R., Raymúndez, M.B., Laurentín, A., Manzanilla, E., Ricci, J. y Pérez, E.** (2014). Morphometric Variations of Banana Starches Issued from Various Genomic Groups and *In vitro* Starch Digestibility. **Journal of Dietetics Research and Nutrition** **1**(1): 003.
5. **Keay, R.** (1953). *Rhizophora* in West Africa. **Kew Bull.** **8**(1): 121-127.
6. **Lakshmanan, K. y Poornima, S.** (1988). Microsporogenesis in *Rhizophora lamarckii* Montr. **Current Science (Bangalore)** **57**: 1084-1085.
7. **Leechman, A.** (1918). The genus *Rhizophora* in British Guiana. **Kew Bull.** **1918**(1): 4-8.

8. **MARNR.** (1986). Conservación y Manejo de los Manglares Costeros en Venezuela y Trinidad-Tobago. **Serie de Informes Técnicos DGIIA/IT/259**. Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales Renovables. Caracas, Venezuela. 123 pp.
9. **Neyland, R. y Lowenfeld, R.** (2000). Large ribosomal subunit 26S rRNA gene sequences suggest that *Rhizophora harrisonii*, *R. mangle*, and *R. racemosa* (Rhizophoraceae) are distinct species. **Louisiana Acad. Sci.** **1**: 1-5.
10. **Pérez, E., Rolland-Sabaté, A., Dufour, D., Guzmán, R., Tapia, M., Raymúndez, M., Ricci, J., Guilois, S., Pontoire, B., Reynes, M. y Gibert, O.** (2013). Isolated starches from yams (*Dioscorea* sp) grown at the Venezuelan Amazons: Structure and functional properties. **Carbohydrate Polymers** **98**(1): 650-658.
11. **Pérez, E., Ciarfella, A. y Raymúndez, M.B.** (2015). Identification by optical and electronic microscopy and laser diffraction of the starch isolated from ñame congo (*Dioscorea bulbifera*). XIII Interamerican Microscopy Congress, Isla de Margarita, Venezuela.
12. **Pérez, E., Ciarfella, A. y Raymúndez, M.B.** (2015). Morphometry and distribution of particle sizes of giant taro (*Alocasia macrorrhiza*) starch using optical and electronic microscopy (SEM), and laser diffraction. XIII Interamerican Microscopy Congress, Isla de Margarita, Venezuela.
13. **Pérez, E., Guzmán, R., Lares, M. y Raymúndez, M.B.** (2015). Microscopy and art. XIII Interamerican Microscopy Congress, Isla de Margarita, Venezuela.
14. **Sívoli, L., Pérez, E., Rodríguez, P., De Abrisqueta, A. y Raymúndez, M.B.** (2005). Cambios en la estructura granular durante el proceso de modificación química (fosfatado-acetilado) del almidón de yuca analizados por microscopía óptica y electrónica. **Acta Microscópica** **14**(1-2): 5-9.
15. **Sívoli, L.; Pérez, E.; Rodríguez, P.; Raymúndez, M.B. y Ayesta, C.** (2009). Técnicas microscópicas y de dispersión de luz empleadas en la evaluación de la estructura del almidón de yuca (*Manihot esculenta* C.). **Acta Microscópica** **18**(3): 195-203.
16. **Sudhakaran, S., Vaidyanathan, R. y Ganapathi, A.** (1995). Microsporogenesis in a mangrove plant *Rhizophora mucronata* Lam. **Thaiszia-Journal Bot. Kos.** **5**: 27-30.

Estudio dendrológico de los bosques secos del área Kempis-Santa Lucía, Municipio Paz Castillo y Zamora (Estado Miranda)

ANIBAL CASTILLO¹, ALFONZO CARDOZO², MIGUEL PIETRANGELI³, REINA BELANDRIA¹, ELIO MAYZ⁴ Y VERÓNICA ARISMENDI⁴

¹Laboratorio de Atracheophyta y Traqueophyta, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo-e: anibalcastillo.ibe@gmail.com

²Instituto de Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

³Departamento de Biología, Facultad de ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

⁴CORPOVAEM, Charallave, Venezuela.

El presente trabajo forma parte del proyecto ecológico y reforestación del eje de integración vial de los Valles del Tuy. El propósito de esta investigación fue realizar el inventario dendrológico de las especies localizadas en los bosques secos del área Kempis-Santa Lucía, zona donde se ejecuta la construcción de una autopista para mejorar la comunicación entre el occidente y el oriente del país. Se realizaron 95 salidas de campo y se registraron todos los individuos y especies arbóreas presentes en un área de 21 km de longitud y 214 Ha. Se inventariaron 4.327 individuos arbóreos, pertenecientes a 38 familias, 93 géneros y 117 especies de angiospermas dicotiledóneas. Las familias con mayor número de especies resultaron las siguientes: Fabaceae, Mimosaceae, Bignoniaceae, Caesalpinaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae, Anacardiaceae, Boraginaceae, Moraceae y Sapindaceae. Por otra parte, se determinaron las novedades botánicas para el estado Miranda, las especies más comunes y las especies con mayor volumen de madera.

Introducción

Se estima que la extensión global de las comunidades forestales en las áreas tropicales y subtropicales es cercana al 60% del total de esas áreas. De ellas, 25% corresponden a bosques húmedos y 35% a bosques secos (4,5,9,18). Los bosques húmedos tropicales han sido mejor descritos y cuantificados que los bosques secos, factor que le agrega importancia al estudio realizado, debido a que la zona en la cual se realizó el proyecto, presenta comunidades forestales principalmente del tipo bosque seco tropical. El bosque seco tropical es uno de los más extendidos del país. En Venezuela se reportan en distintos paisajes geomorfológicos: montañas bajas, colinas y altiplanicies. Son también conocidos como: deciduos, caducifolios, tropófilos y alisios. Este tipo de comunidad forestal alcanza su mayor área en regiones cuyo régimen de lluvias anuales varía entre 700 a 1200 mm, con un periodo de sequía de 3 a 6 meses, localizándose en altitudes de 0-1000 msnm (1,8,10,11). A pesar de ser uno de los bosques mayor estudiados en el país, para el estado Bolivariano de Miranda se tiene poca información botánica y ecológica de los bosques secos; solamente durante los años 80-90 se realizaron en los Valles del Tuy cercanos a Cua y

Charallave una serie de investigaciones sobre la composición florística fisionómica y ecológica de esta región Mirandina (7,19,20,21,22,23). El propósito de esta investigación fue realizar el inventario dendrológico de las especies localizadas en el área Kempis-Santa Lucía, zona donde se está ejecutando la construcción de una autopista para mejorar la comunicación entre occidente y el oriente del país. Para iniciar estos trabajos, las autoridades ambientales exigen un censo detallado de las comunidades forestales a ser intervenidas; por consiguiente, se hizo necesario el inventario forestal y determinar cuáles son las especies arbóreas y tipos de bosques o comunidades vegetales que serán afectadas por la intervención (6,16,17).

Metodología

Área de estudio

Ubicación geográfica

Los bosques secos del tramo Santa Lucía-Kempis están ubicadas en los Municipios Paz Castillo y Zamora del estado Bolivariano de Miranda, con una longitud de 21,40 km y un área de 214 Ha (Fig. 1).

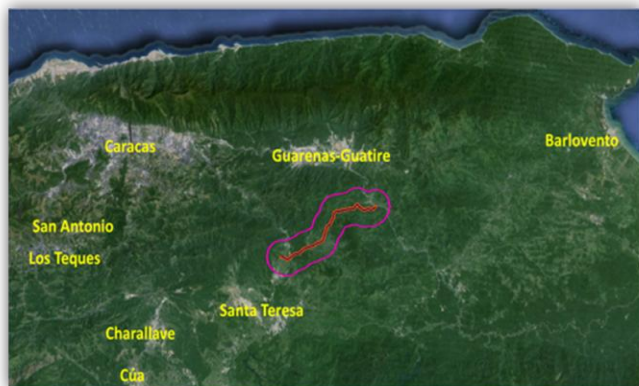


Fig. 1. Tramo carretera Kempis-Santa Lucía.

Inventario dendrológico

Colección de datos de campo e identificación taxonómica

Se realizaron 95 salidas de campo a la zona de estudio, durante un año (noviembre 2014-septiembre 2015) abarcando los periodos secos y lluviosos del año. Se hicieron observaciones de campo y con la ayuda de una planilla anexa, se obtuvo información relacionada a la ubicación geográfica: progresiva, coordenadas; fecha y número de la salida de campo; también datos relativos al árbol: número de individuo, nombre común y científico, tamaño, diámetro (DAP), altura de la cruz, diámetro de la copa, volumen de madera, usos y estado fitosanitario. Todas las especies referidas al inventario fueron colectadas siguiendo la metodología tradicional de prensado y secado. Para su identificación taxonómica, fueron determinadas a nivel de especie con la ayuda de la bibliografía (2,3,12,13,14,15) y por comparación directa con especímenes botánicos, depositados en el Herbario Nacional de Venezuela (VEN).

Resultados

Flora Dendrológica

Se inventariaron 4.327 individuos arbóreos pertenecientes a 38 familias, 93 géneros y 117 especies de angiospermas dicotiledóneas. Las familias dominantes con mayor número de especies (cinco o más especies), resultaron las siguientes: Fabaceae (15 especies), Mimosaceae (13 especies), Bignoniaceae (7 especies), Caesalpiniaceae, Euphorbiaceae y Myrtaceae (6 especies), Anacardiaceae, Boraginaceae, Moraceae y Sapindaceae (5 especies). Estas 10 familias suman un total de 54 géneros y 73 especies, representando el 62% del total de las especies registradas (Tabla 1).

Novedades botánicas: Nuevos registros para el estado Miranda.

El estudio de la distribución geográfica en Venezuela de las especies inventariadas mediante la revisión del nuevo catálogo de la flora de Venezuela y de las exsiccatas depositadas en el Herbario Nacional de Venezuela, reportamos 11 nuevas adiciones para la flora del estado Miranda (Tabla 2).

Tabla 1. Familias con mayor número de especies (5 ó más).

Familia	Nº de géneros	Nº de especies
Fabaceae	9	15
Mimosaceae	12	13
Bignoniaceae	3	7
Caesalpiniaceae	6	6
Myrtaceae	3	6
Euphorbiaceae	5	6
Anacardiaceae	4	5
Boraginaceae	2	5
Moraceae	5	5
Sapindaceae	5	5
	54	73(62%)

Tabla 2. Novedades botánicas: Nuevos registros para el estado Bolivariano de Miranda.

Familia	Especie	Nombre común
Araliaceae	<i>Schefflera morototoni</i>	Sun Sun
Bignoniaceae	<i>Tabebuia capitata</i>	Araguaney
Bignoniaceae	<i>Tabebuia guayacan</i>	Araguaney
Bignoniaceae	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Araguaney
Caesalpiniaceae	<i>Hymenaea courbaril</i>	Algarrobo
Fabaceae	<i>Machaerium acutifolium</i>	Ñaure
Fabaceae	<i>Machaerium arboreum</i>	Ñaure
Fabaceae	<i>Platymiscium pinnatum</i>	Roble
Fabaceae	<i>Platypodium elegans</i>	Lomo de caimán
Moraceae	<i>Brosimum alicastrum</i>	Guaimaro
Tiliaceae	<i>Luehea alternifolia</i>	Guácimo cimarrón

Especies más comunes

De los 4.327 individuos censados, se reportaron 10 especies con una frecuencia mayor de 70 individuos, resultando como especies más comunes las siguientes: *Senegalia polyphylla* (Grifo) con 500 individuos, *Spondias mombin* (Jobo) con 463 individuos, *Hura crepitans* (Jabillo) con 321 individuos, *Erythrina poeppigiana* (Bucare) con 191 individuos, *Mangifera indica* (Mango) con 169 individuos, *Guazuma ulmifolia* (Guácimo) con 121 individuos, *Lonchocarpus dipteroneurus* (Grifo blanco) con 86 individuos, *Vachellia macracantha* (Cují hediondo) con 83 individuos y *Tabebuia*

impetiginosa (Araguanaey) con 72 individuos. Estas 10 especies suman un total de 2.165 individuos representando el 50% total de las especies registradas (Tabla 3).

Tabla 3. Especies más comunes.

Familia	Especie	Nº de individuos
Senegalia polyphylla	Mimosaceae	500
Spondias mombin	Anacardiaceae	463
Hura crepitans	Euphorbiaceae	321
Erythrina poeppigiana	Fabaceae	191
Mangifera indica	Anacardiaceae	169
Samanea saman	Mimosaceae	159
Guazuma ulmifolia	Sterculiaceae	121
Lonchocarpus dipteroneurus	Fabaceae	86
Vachellia macracantha	Mimosaceae	83
Tabebuia impetiginosa	Bignoniaceae	72
		2.165 (50%)

Volumen de madera

El volumen total de madera de los 4.327 individuos fue de 5.186 m³. Las especies que aportaron el mayor volumen de madera con más de 65 m³ fueron las siguientes: *Spondias mombin* (Jobo), con 914,11 m³, *Hura crepitans* (Jabillo) con 710,40 m³, *Erythrina poeppigiana* (Bucare) con 579,20 m³, *Senegalia polyphylla* (Grifo) con 536,23 m³, *Samanea saman* (Samán) con 187,08 m³, *Ceiba pentandra* (Ceiba) con 150,62 m³, *Cordia collococca* (Cuajaro) con 104,27 m³, *Platymiscium pinnatum* (Roble) con 83,56 m³, *Tabebuia impetiginosa* (Araguaney) con 72,08 m³ y *Ficus pertusa* (Matapalo) con 67,76 m³. Estas especies sumaron un total de 3.405,31 m³, representando el 65,6% del total de las especies inventariadas (Tabla 4).

Tabla 4. Especies con mayor volumen de madera.

Especie	Familia	Volumen (m ³)
Spondias mombin	Anacardiaceae	914,11
Hura crepitans	Euphorbiaceae	710,40
Erythrina poeppigiana	Fabaceae	579,20
Senegalia polyphylla	Mimosaceae	536,23
Samanea saman	Mimosaceae	187,02
Ceiba pentandra	Bombacaceae	150,62
Cordi collococca	Boraginaceae	104,27
Platymiscium pinnatum	Fabaceae	83,56
Tabebuia impetiginosa	Bignoniaceae	72,08
Ficus pertusa	Moraceae	67,76
		3.405,31 (65,65%)

Referencias

1. **Aristeguieta, L.** (1968). *El bosque caducifolio seco de los llanos Altos centrales*. Bol. Soc. Venez. Ciencias Nat. 27(113-114): 395-438.
2. **Aristeguieta, L.** (2003). **Estudios dendrológicos de la flora de Venezuela**. Academias de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. **Volumen 38**. 571 pp.
3. **Badillo, V., Schnee, L. y Benitez, C.E.** (1985). **Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela**. Espande, S.R.L. (edit). 270 pp.
4. **Beard, J.S.** (1944). Clima vegetation in Tropical American. **Ecology 25**: 127-158.
5. **Beard, J.S.** (1955). The classification of Tropical American vegetation types. **Ecology 36**: 89-100.
6. **Castillo, A., Cardozo, A., Pietrangeli, M., Blandria, R., Mayz, E. y Arismendi, V.** (2015). Estudio dendrológico de los bosques deciduos del área Kempis-Santa Lucia. Municipio Paz Castillo y Zamora (Estado Miranda). XXI Congreso Venezolano de Botánica. Caracas Distrito Capital.
7. **Cauz, C.** (1983). Un análisis mediante técnicas de ordenación de las distintas comunidades serales asociadas a fuertes perturbaciones antrópicas del bosque deciduo por la sequía de un sector de los Valles del Tuy Medio. Estado Miranda. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 110 pp.
8. **Fajardo, L., González, V., Nasser, M. y Lacabana, P.** (2005). Tropical Dry Forest of Venezuela: Characterization and current conservation status. **Biotropica 36**: 531-546.
9. **Gentry, A.H.** (1995). Diversity and floristic composition of Neotropical dry forest. In: **Seasonally Dry Tropical Forest** (Bullock, S.H; H.A. Mooney y E. Medina, eds.). Pp 146-194. Cambridge University Press, Cambridge.
10. **Gonzalez, V.** (2003). Los Bosques secos de Venezuela en: Aguilera, M; Azocar, A; Gonzalez Jimenez, E. (Edit.) **Biodiversidad en Venezuela**. Tomo 2. Pp: 735-744. Fundación Polar, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fonacit. Caracas.
11. **Gonzalez, V.** (2013). La vegetación de Venezuela al norte del Río Orinoco. Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobias Lasser". Caracas. 196 pp.
12. **Hokche, O., Berry, P. y Huber, O.** (2008). **Nuevo Catálogo de la flora vascular de Venezuela**. Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobias Lasser". Caracas, 859 pp.
13. **Hoyos, J.** (1992). **Árboles Tropicales Ornamentales**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. **Monografía N° 38**, Caracas. 272 pp.

- 14.Hoyos, J.** (2009). **Guía de árboles de Venezuela.** Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 32, Caracas. 350 pp.
- 15.Lasser, T.** (1965). **Las familias de Traqueofitas de Venezuela.** Editorial Universitaria de Oriente, Cumaná. 186 pp.
- 16. Mayz, E., Castillo, A., Cardozo, A., Pietrangeli, M., Belandria, R. y Arismendi, V.** (2015). Proyecto ecológico y reforestación del eje de integración vial de los Valles del Tuy (Estado Miranda). XI Congreso Venezolano de Ecología. Porlamar. Estado Nueva Esparta.
- 17. Mayz, E., Castillo, A., Pietrangeli, M., Cardozo, A., Belandria, R. y Arismendi, V.** (2016). Estudios dendrológicos, ecológicos y reforestación de los bosques deciduos del eje vial Kempis-Santa Lucía. Municipios Paz Castillo y Zamora (Estado Miranda). Jornadas IBE y de Investigación y Extensión. Facultad de Ciencias Universidad Central de Venezuela. Caracas. Distrito Capital.
- 18.Mooney, H.A., Bullock, S.H. y Medina, E.** (1995). Introduction. In: **Seasonally Dry Tropical Forest** (Bullock, S.H; H.A.Mooney y E. Medina, eds.). pp 139-154. W. Junk, la Haya, Holanda.
- 19.Pacheco, A.** (1978). Cambios en la vegetación de a cuenca de la Quebrada de Charallave, Edo. Miranda a consecuencia de la actividad humana. Trabajo Especial de Grado, Licenciatura. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 150 pp.
- 20. Parra, N.J.** (1981). Contribución al estudio del funcionamiento y descripción del bosque deciduo tropical de la región de Cúa. Edo. Miranda. Trabajo Especial de Grado, Licenciatura. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 108 pp.
- 21.Pietrangeli, M. y Brandin, J.** (1984). Análisis de gradientes e interrelaciones edáficas de la vegetación forestal Sacua, Cúa. Estado Miranda. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 147 pp.
- 22.Suniaga, T.** (1988). Características estructurales y florísticas de diferentes etapas serales del bosque deciduo por la sequía en las colinas metamórficas de la región de Charallave. Estado Miranda. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología Universidad Central de Venezuela. 108 pp.
- 23.Tugues, J.L.** (1983). Fenología de un bosque deciduo tropical situado en la región de Charallave. Estado Miranda. Trabajo de ascenso. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.

Estatus actual de los estudios ficoflorísticos de la región Centro Occidental, en el marco de la ficoflora de Venezuela

SANTIAGO GÓMEZ¹, MAYRA GARCÍA², YUSNEYI CARBALLO BARRERA³ Y NELSON GIL⁴

¹Laboratorio de Traqueophyta y Atraqueophyta, Centro de Botánica Tropical,

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela;

²Instituto Experimental Jardín Botánico "Dr. Tobías Laser", Universidad Central de Venezuela;

³Centro de Enseñanza Asistida por Computador, Escuela de Computación, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela;

⁴Instituto Pedagógico "Siso Martínez", Universidad Pedagógica Experimental Libertador.

Correo-e: santiago.gomez@ciens.ucv.ve

Los estudios ficoflorísticos la Región Centro Occidental de Venezuela se han venido realizando durante las últimas dos (2) décadas. Esta región abarca los estados Falcón, Carabobo, Aragua, Vargas, Miranda y el Parque Nacional Archipiélago Los Roques. En esta oportunidad, presentamos los avances en la región mencionada durante los últimos dos años (2014-2015) y su inserción en la ficoflora de Venezuela. Estos estudios se organizan en dos aspectos: 1. Reportes que han contribuido a enriquecer el conocimiento de la ficoflora, 2. Incorporación de herramientas informáticas en el almacenamiento y divulgación de los datos asociados a los estudios ficoflorísticos. Como una contribución importante a la divulgación de información asociada a la ficoflora, se puede consultar un sitio web que registra información del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, y se dispondrá muy próximamente de otro sitio web que registrará toda la información publicada referente a la ficoflora venezolana desde el año 1822 hasta el presente. Los aportes al conocimiento de la ficoflora venezolana a los cuales se tendrá acceso mediante estas herramientas son de gran interés, desde el punto de vista científico y divulgativo.

Introducción

Los estudios ficoflorísticos la Región Centro Occidental de Venezuela se han venido realizando durante las últimas dos (2) décadas. Esta región abarca los estados Falcón, Carabobo, Aragua, Vargas, Miranda y el Parque Nacional Archipiélago Los Roques (Fig. 1). A partir de la publicación de W. Taylor, en 1960, de su monumental obra: *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas* (19), se han realizado numerosos aportes de muchos investigadores e instituciones venezolanas, entre otras el Instituto Oceanográfico de la Universidad de Oriente (Cumaná, estado Sucre), los Laboratorios Marinos de la Fundación La Salle y la Universidad de Oriente en la Isla de Margarita (estado Nueva Esparta), los grupos de investigación de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda en Coro (estado Falcón), de la Universidad de Carabobo en Valencia (estado Carabobo), el Instituto Experimental Jardín Botánico "Dr. Tobías Laser" y el Laboratorio de Atraqueophyta y Traqueophyta del Instituto de Biología Experimental en Caracas (Distrito Capital). Todas estas contribuciones se han venido reseñando en las distintas ediciones de las Memorias del Instituto de Biología Experimental de la UCV publicadas desde el año 1998 hasta el presente (9,16,17,18,20,21). En esta oportunidad, presentamos los avances en la región mencionada durante los últimos dos años (2014-2015) y su inserción en la ficoflora de Venezuela. Estos estudios se organizan en dos aspectos: 1. Reportes que han contribuido a enriquecer el conocimiento de la

ficoflora, 2. Incorporación de herramientas informáticas para el almacenamiento, consulta y divulgación de los datos asociados a los estudios ficoflorísticos. Los productos obtenidos se han reseñado en las mini revisiones ya mencionadas, distintas publicaciones en revistas arbitradas y presentaciones en eventos científicos nacionales e internacionales.



Fig. 1. Mapa mostrando la Región Centro Occidental.

1. Reportes ficoflorísticos

Desde comienzos del año 2006 se han venido desarrollando cuatro grandes proyectos, tres de los cuales ya fueron concluidos (5,10,14); el primero (5) tuvo como objetivo principal el estudio florístico de las localidades de Puerto Maya (estado Aragua) y Puerto Cruz (estado Vargas). Un segundo proyecto (14) tuvo entre sus objetivos, el inventario de la ficoflora del Parque Nacional Henri Pittier (estado Aragua) y sus áreas aledañas. El tercer proyecto denominado "Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques (PNALR) (10), representa un estudio ficoflorístico completo de este parque (Fig. 2) y



Fig. 5. Ficha especie del sitio web Ficoflora PNLAR.

Usando también tecnologías web y árboles de decisión, se presentó FICLAV (2), una clave taxonómica digital que representa una aplicación educativa escalable, programada con software libre y accesible a través de Internet, de apoyo al usuario en la identificación de géneros del Phylum Ochrophyta. Adicionalmente, dentro de los objetivos del proyecto PNLAR, está la elaboración de un manual con láminas a color e información de identificación, clasificación y distribución de las especies del PNLAR (11), el cual se encuentra culminado y en proceso de registro para ser publicado en físico y en versión digital en Internet (Fig. 6).

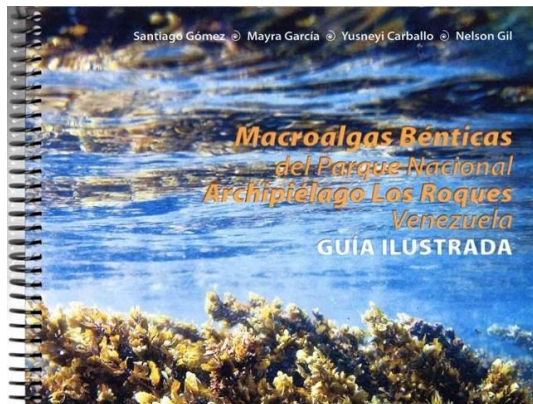


Fig. 6. Manual PNLAR.

El cuarto proyecto, “Creación del Catálogo Taxonómico Nacional de las Macroalgas Bénticas Marinas de Venezuela”, aún en ejecución, plantea dentro de sus objetivos: 1. Validar el mayor número posible de especies de macroalgas bénticas venezolanas, con énfasis en aquellas poco conocidas; 2. Diseñar una base de datos a partir de información bibliográfica y una aplicación informática sobre plataforma web que incluya funcionalidades para la consulta de información asociada a especies, localidades, ubicación geográfica y referencias bibliográficas. En el marco de eventos nacionales se han presentado avances sobre el desarrollo de este catálogo taxonómico digital (1), cuyo sitio web, denominado Ficoflora Venezuela, (Fig. 7) será presentado y quedará a disposición para

la consulta durante las Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias 2016 en la dirección <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/>.

Los aportes al conocimiento de la ficoflora venezolana que se generen con este proyecto serán de gran interés, no sólo científico sino académico, en función de lo cual se establece un conjunto de metas esperadas, tales como: actualización del estatus de las distintas especies de macroalgas bénticas presentes en las distintas zonas costeras del país, y posibilidad de consulta de esta información aprovechando los beneficios que proveen las tecnologías web, entre otras, superar las limitaciones geográficas y temporales de acceso a la información (a diferencia de las bibliotecas y fuentes en físico), la posibilidad de utilizar múltiples dispositivos (computadores, tabletas, celulares), poder realizar consultas por diversos criterios (cualquier nivel de la categoría taxonómica, ubicación geográfica, fuente bibliográfica), obtener fichas asociadas a las especies que pueden descargarse en formato de documento portable (.pdf), guardarse para lectura posterior y compartirse con otros investigadores. Adicionalmente el sitio web Ficoflora Venezuela permitirá la consulta de galerías fotográficas y mapas dinámicos que indican la geo-referenciación de las localidades en donde se han reportado las especies.



Fig. 7. Página inicial sitio web Ficoflora Venezuela.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al CDCH de la UCV por su apoyo económico en la realización de los proyectos: PI-00-6422-2006, PI-03-7464-2009 y PG-03-8643-2013 y al FONACIT por su apoyo económico en la realización del proyecto: 2011001216.

Referencias

1. Carballo Barrera, Y., Gómez, S., García, M. y Gil, N. (2015). Desarrollo de las aplicaciones informáticas del Catálogo Taxonómico Digital de Macroalgas Bénticas de Venezuela. **Resúmenes de la LXV Convención Anual de la Asociación**

- Venezolana para el Avance de la Ciencia, Camurí Chico, estado Vargas.
2. Carballo Barrera, Y., García, M., Gómez, S. y Gil, N. (2014). FICLAV: Una Clave Taxonómica para la División Ochrophyta (Algas Pardas) utilizando Tecnologías Web y Árboles de Decisión. **Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias, 2014, Caracas, Dtto. Capital.**
 3. Carballo Barrera, Y., Gómez, S. y García, M. (2014). FICOWEB PNALR. Base de datos orientada a la catalogación y divulgación de las macroalgas bénticas marinas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. **Resúmenes de la LXIV Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Caracas, Dtto. Capital.**
 4. García, M., Gómez, S., Villamizar, E. y Narváez, M. (2013). Adiciones a la ficoflora marina de Venezuela. IV. Bryopsidales (Chlorophyta), Dictyotales (Heterokontophyta) y Ceramiales (Rhodophyta). **Acta Bot. Venez. 36(2):** 197-213.
 5. García, M. y Gómez, S. (2007). Estudio florístico de la macroalgas marinas de los sectores Puerto Cruz y Puerto Maya, estado Vargas, litoral central, Venezuela. **Informe Final Proyecto Individual. Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobías Laser".** 29 pp.
 6. Gómez, S., García, M., Carballo Barrera, Y. y Gil, N. (2015). Nuevos registros de Macroalgas Bénticas Rojas (Rhodophyta) para la Ficoflora Marina de Venezuela. **Resúmenes XXI Congreso Venezolano de Botánica. Caracas, Dtto. Capital.**
 7. Gómez, S., García, M., Villamizar, E. y Narváez, M. (2014). Macroalgas bénticas asociadas a arrecifes coralinos submareales en el Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. **Acta Biol. Venez. 34(2):** 245-255.
 8. Gómez, S., García, M., Carballo Barrera, Y. y Gil, N. (2014a). Avances en los estudios de la flora de algas bénticas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques. **Resúmenes de las Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias, 2014. Caracas, Dtto. Capital.**
 9. Gómez, S., García, M., Carballo Barrera, Y. y Gil, N. (2014b). Avances en los estudios de la ficoflora marina de la región Centro Occidental de Venezuela. **Mem. Inst. Biol. Exper. 7:** 189-192.
 10. Gómez, S., García, M., Carballo Barrera, Y. y Gil, N. (2014c). Flora de macroalgas bénticas marinas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques: Inventario, Georeferenciación y distribución geográfica. **Informe técnico final proyecto FONACIT N°. 2011001216.** 48 pp.
 11. Gómez, S., García, M., Carballo Barrera, Y. y Gil, N. (2014d). Macroalgas bénticas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. Guía Ilustrada. LOCTI-PEI N° 2011001216. **Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT).** 191 pp.
 12. Gómez, S., García, M. y Carballo Barrera, Y. (2014a). El género *Avrainvillea* Descaine (Dichotomosiphonaceae, Chlorophyta) en la costa de Venezuela. **Resúmenes de la LXIV Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Caracas, Distrito Capital.**
 13. Gómez, S., García, M. y Carballo Barrera, Y. (2014b). Nuevos registros de Bryopsidales (Chlorophyta) para la Ficoflora marina de Venezuela. **Resúmenes de la LXIV Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Caracas, Distrito Capital.**
 14. Gómez, S. y García, M. (2013). Inventario de la ficoflora marina del Parque Nacional "Henri Pittier" y áreas aledañas, estado Aragua, Venezuela. **Informe final proyecto CDCH PI-03-7464-2009/2,** 32 pp.
 15. Gómez, S., García, M. y Gil, N. (2013). Adiciones a la ficoflora marina de Venezuela. I. Rhodmelaceae (Rhodophyta). **Acta Bot. Venez. 36(2):** 183-195.
 16. Gómez, S. (2012). Estatus actual del conocimiento de la ficoflora marina de la Región Centro Occidental de Venezuela. **Mem. Inst. Biol. Exper. 6:** 205-208.
 17. Gómez, S. y Vera, B. (2008). Ficoflora marina de la Región Centro Occidental de la costa venezolana. **Mem. Inst. Biol. Exp. 5:** 265-268.
 18. Gómez, S. y Vera, B. (2001). Contribución al conocimiento de la ficoflora de la Región Centro Occidental de la costa venezolana. **Mem. Inst. Biol. Exper. 3:** 217-220.
 19. Taylor, W. R. (1960). Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. **The University of Michigan Press. Michigan, USA.** 825pp.
 20. Vera, B. y Gómez, S. (2005). Estudios ficoflorísticos de la región marino-costera Centro Occidental. **Mem. Inst. Biol. Exper. 4:** 217-220.
 21. Vera, B. y Gómez, S. (1998). Estudios ficoflorísticos del área Centro Occidental de la costa venezolana. **Mem. Inst. Biol. Exper. 1:** 221-224.
 22. Web Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. 2014. Publicación electrónica. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Editores: Yusneyi Carballo Barrera, Santiago Gómez, Mayra García y Nelson Gil. <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/pnalr>.

Ecología y Taxonomía de Macrofitas Marinas

BEATRIZ E. VERA^{1,2}, CELIA MORENO¹, SHEILA MARQUES-PAULS³, CESAR PAZ⁴, AIDÉ VELÁSQUEZ⁵ Y SONIA ARDITO⁶

¹ Laboratorio de Ecología y Taxonomía de Macrófitas Marinas, Centro de Botánica Tropical Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

² Postgrado en Botánica, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias UCV;

³ Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

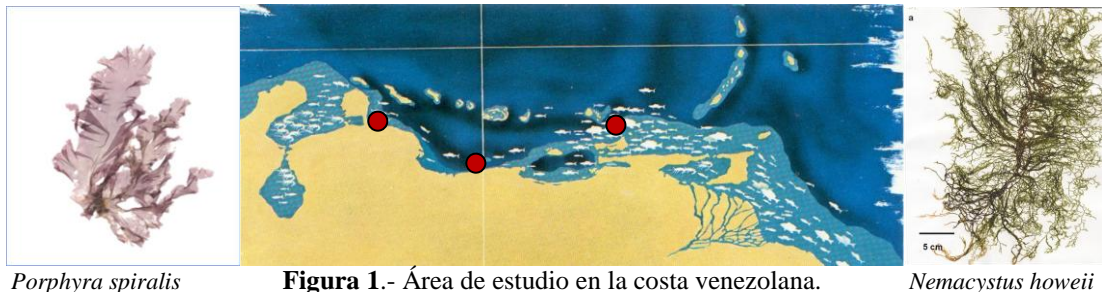
⁴ Laboratorio de invertebrados, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, UCV.

⁵ Escuela de Ciencias Aplicada del Mar (ECAM, Universidad de oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Isla de Margarita

⁶ Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias y Tecnología, Departamento de Biología, Laboratorio de Biología Marino-Costera (BIOMAC).

Correo-e: esverabe@gmail.com

Las investigaciones desarrolladas en colaboración con otros grupos de investigadores sobre las macrofitas marinas en la costa venezolana, han consolidado una línea de estudios ecológicos y de aplicabilidad de los recursos ficológicos, además de la taxonomía tradicional de estos grupos. Para ello hemos incrementado el conocimiento de los hábitats en los que se desarrollan, las macroalgas, fanerógamas marinas sumergidas y de borde costero. El potencial económico de estas macrofitas ha comenzado a dar resultados promisorios que se traducirán en un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del ambiente marino y la protección de los hábitats en que estas se desarrollan.



Porphyra spiralis

Figura 1.- Área de estudio en la costa venezolana.

Nemacystus howeii

Introducción

En años recientes hemos incrementado el estudio en la región centro-occidental de la costa venezolana, debido a que en este sector se presenta una variedad de áreas rocosas, playas arenosas, arrecifes coralinos, manglares y lagunas costeras (13), donde se favorece el desarrollo de las macrofitas marinas, las cuales representan un recurso natural invaluable (Fig. 1). En lo que respecta a las macroalgas, debido a la heterogeneidad de los sistemas y a la alta tasa de recambio en el ambiente marino, hemos venido incrementando el número de registros para nuestras costas y ubicando aquellas localidades en las cuales podemos encontrar bancos naturales de algunas especies con interés económico (1).

Estudios Taxonómicos

En la actualidad se han realizado inventarios de macroalgas en las costas del estado Vargas (18),

reconociendo nuevas especies del complejo *Laurencia*, así como en el área de Carenero-Los Totumos del estado Miranda (7,8,10). En la laguna de Tiraya del estado Falcón, se vienen estudiando las macroalgas asociadas al manglar (7,12) incrementando el conocimiento de nuestra ficoflora y ampliando la distribución geográfica en el mar Caribe (15).

Para el área de Paraguaná y costas aledañas del estado Falcón se han registrado más de un centenar de especies, incluyendo la presencia de *Halophila stipulacea*, una angiosperma marina que se ubicó por primera vez en el estado Vargas (15). El registro ficoflorístico de esta península se viene llevando a cabo en conjunto con la Dra. Sonia Ardito de la Universidad de Carabobo, quien inició este proyecto, como parte de su año sabático en nuestro laboratorio, durante enero-diciembre de 2011,

continuando activamente esta cooperación hasta el presente (2). En el área oriental, también hemos venido realizando estudios de las macroalgas presentes en el litoral rocoso de la zona noreste de la isla de Margarita. Todo esto ha contribuido al conocimiento de nuestra ficoflora, la cual parece más rica de lo que inicialmente se tenía pensado (9,14), ya que a través de los años de investigación, seguimos ubicando nuevas especies para nuestras costas, con potencial promisorio en la obtención de productos naturales para contribuir en la búsqueda de soluciones en la alimentación y salud pública (Fig. 2). (1,8,11,18).



Figura 2. *Laurencia dendroidea*. Nuevo registro para la costa venezolana.

Estudios Ecológicos.

Hasta el presente se han venido desarrollando estudios ecológicos sobre el fenómeno de surgencia el cual enriquece con aguas profundas, ricas en nutrientes la región costera de Venezuela y Colombia. Por ello hemos desarrollado algunos trabajos sobre las especies indicadoras de surgencia en la costa venezolana (3,5,6), obteniéndose datos interesantes sobre la presencia de estas especies, el cambio en su distribución y su cobertura en algunas áreas monitoreadas, particularmente en la isla de Margarita (19), en el oriente del país (Fig. 4).

También se sigue estudiando la contaminación y su influencia dentro de las comunidades marinas costeras. Tradicionalmente se ha establecido que las Ulvales son indicadoras de contaminación, sin embargo, durante los períodos de enriquecimiento natural, también se desarrollan amplias coberturas de este grupo de macroalgas. Para proponer algunos organismos como indicadores de contaminación, se hace necesaria la comprobación de factores que intervienen en el ambiente y pueden enriquecer las aguas con Nitrógeno y Fósforo, sin que se deba a procesos naturales, como es la surgencia. No obstante, el recambio de las especies en las

comunidades de macroalgas es uno de los factores indicativos de la calidad del ambiente.

Otra de las líneas de investigación en desarrollo es la de las angiospermas marinas y su papel dentro del ecosistema costero. Ésta se ha venido realizando mediante la incorporación de trabajos interdisciplinarios con otros investigadores dentro y fuera del país conllevando al registro de *Halophila stipulacea* para la costa venezolana (Fig. 3). En Venezuela, son escasos los estudios realizados en la evaluación de las comunidades de macroalgas y fanerógamas marinas sumergidas, las cuales representan una alternativa interesante, como refugio y criadero de diversas especies de fauna, tales como peces, moluscos, crustáceos y otros invertebrados, no menos importantes dentro del ecosistema marino-costero (15,16,17). El progreso de estos estudios es promisorio en el conocimiento de la biodiversidad y su importancia económica.

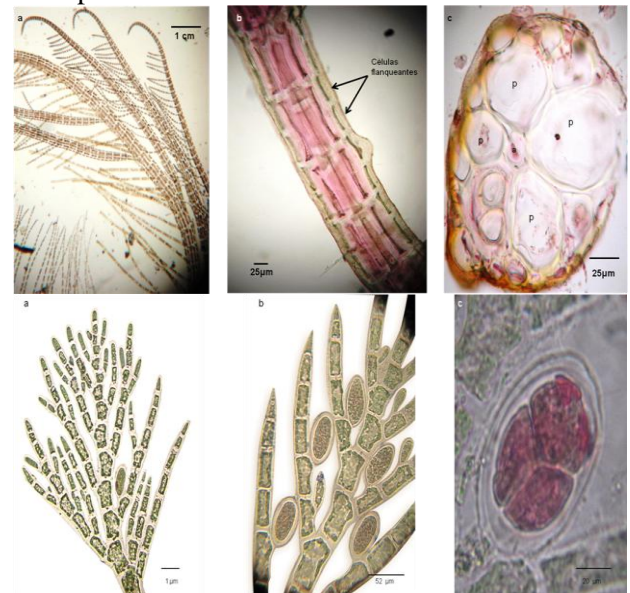


Figura 3. a) *Cottoniella filamentosa* con detalle de células flaqueantes y células del talo; b) *Callithamnion acutum* con detalle de tetrasporangios. Nuevos registros para la isla de Margarita, estado Nueva Esparta.



Figura 4. Registro por primera vez de flores masculinas de *Halophila stipulacea* en el Mar Caribe.



Fig. 5. Cultivo experimental de *Zea maíz* para la evaluación de los microelementos en arribazones de Los Totumos, estado Miranda. Germinación de un 95%.

Estudios aplicados

Después de la evaluación de las arribazones de macroalgas en la bahía de Los Totumos, en el estado Miranda, se ha venido realizando un trabajo experimental para evaluar la influencia que pueden tener los microelementos presentes en estas algas. Algunas plantas que vienen siendo evaluadas son exigentes en cuanto a microelementos, tales como el maíz (*Zea maíz*) (Fig. 5), los pimentones y el ají dulce, *Capsicum* sp., trabajo que se realiza en conjunto con la Dra. Ardito en la Universidad de Carabobo (20).

Las macroalgas de arribazón son ricas en microelementos y éstos se encuentran en cantidades que pueden utilizarse para cultivos de diferentes rubros. Sin embargo, hasta el presente, toda esta biomasa excedente que se deposita sobre las playas, no se ha aprovechado y por lo general son dispuestas en los alrededores de las mismas, o simplemente se dejan descomponer, ocasionando malos olores y afeando el ambiente. Si las arribazones son aprovechadas, se puede mantener limpio el ambiente y utilizarlas en la manufactura de un abono orgánico enriquecido con microelementos, pudiendo obtenerse mejoras en el crecimiento de las plantas (Fig. 6) y constituir una alternativa como actividad productiva para los pescadores y agricultores de las áreas costeras.

Investigaciones en desarrollo

En la actualidad se continúa el estudio de las macroalgas del complejo “*Laurencia*” en Venezuela, como parte de un macroproyecto para el área del Océano Atlántico, en cooperación con investigadores del Instituto Botánico y la Universidad de São Paulo, Brasil, bajo la dirección de la Dra. Valeria Cassano y la Dra. Mutue Toyota

Fujii. Este proyecto se ha comenzado a ampliar con otros investigadores del país, mediante cursos nacionales e internacionales para lograr un mejor conocimiento de este grupo, con un potencial farmacológico promisorio (4).



Fig. 6. La producción de maíz enriquecido es una de las ventajas de utilizar las macroalgas de arribazón.

Consideraciones finales

El desarrollo de líneas aplicadas de investigación, junto a las convencionales, nos permitirán asumir el reto de proporcionar soluciones a la sociedad en la que tenemos un papel protagónico, debido a nuestra vinculación con las Universidades en las que laboramos día a día, para formar el personal calificado que contribuya al progreso de nuestro país.

Agradecimientos

La autora desea agradecer al CDCH de la UCV por el financiamiento del proyecto: PI-03-7360-2008.A la Universidad de Carabobo y a la Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta, en especial al Centro Regional de investigaciones Ambientales (CRIA), y al Club Puerto Azul en Naiguatá, estado Vargas, por el apoyo logístico en las colecciones de macroalgas en las áreas en estudio. A FAPEST, Sao Paulo, Brasil por el apoyo y financiamiento del curso Internacional sobre Diversidad y filogenia del complejo “*Laurencia*” (Rhodophyta) en el Océano Atlántico, dictado por la Dra Valeria Cassano y la Dra. Mutue Toyota Fujii, USP e Instituto Botánico, Sao Paulo, Brasil respectivamente.

Referencias

1. **Arata P., Quintana, I., Canelón D., Vera, B., Compagnone, R. y Ciancia, M. (2015).** Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green seaweeds of the order Bryopsidales. **Carbohydrate Polymers 122:** 376-386.

2. **Ardito, S. y Vera, B.** (2014). Dos adiciones a la Familia Udoteaceae (Chlorophyta), para la costa venezolana: *Udotea dixonii* D.S. Littler et. M.M. Littler y *Udotea spinulosa* Howe. **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela** **53(2)**:19-25.
3. **Balladares, C., Castellanos, P. y Müller-Karger, F.** (1997). Upwelling streams in the Venezuelan coast observed by NOAA Satelites. Fourth International Conference on Remote Sensing for Marine and Coastal Enviroments, Orlando, Florida. U.S.A. Mimeografiado. 5 p.
4. **Canelón D., Ciancia, M., Suárez, A., Compagnone, R. y Matulewicz, M.** (2014). Structure of higly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtusa* y *Laurencia filiformis*. **Carbohydrates Polymers** **101**: 705-713.
5. **Castellanos, P., Varela, R. y Muller-Karger, F.** (2002). Descripción de las áreas de surgencia sur del Mar Caribe examinadas por el sensor infrarrojo AVHRR. **Mem. Fund. La Salle Cien. Nat.** **154**: 55-76.
6. **Díaz-Pulido, G. y Garzón-Ferreira, J.** (2002). Seasonality in algal assemblages on upwelling-influenced coral reef in the Colombian Caribbean. **Bot. Mar.** **45**: 284-292.
7. **Eizaguirre, M.** (2008). Estudio de las algas marinas bénticas asociadas a las raíces de *Rhizophora mangle* en las localidades de bahía de Los Piratas y bahía de Buche, estado Miranda, Venezuela. Tesis de M.Sc. en Ciencias, Mención Botánica. 154p.
8. **Eizaguirre, M. y Vera, B.** (2013). *Dictyopteris jolyana* Oliveira & Furtado (Dictyotales, Phaeophyceae). Nuevo registro para la costa venezolana. **Acta Bot. Venez.** **36(2)**: 81-87.
9. **Ganesan, E.K.** (1990). A catalog of benthic marine macroalgae and seagrasses of Venezuela. **Fondo Editorial CONICIT**, Caracas, Venezuela.
10. **Gómez, S., García, M., Carballo, Y. y Gil, N.** (2014). Avances en los estudios de la ficoflora marina de la Región Centro Occidental de Venezuela. **Mem. IBE** **7**: 189-192.
11. **Linares, J. y Vera, B.** (2011). *Pseudobryopsis blomquistii* (Bryopsidaceae, Chlorophyta), nuevo registro para la costa venezolana. **XIX Congreso Venezolano de Botánica**.
<http://127.0.01:4001/docu.php?pelo=167>
12. **López, B., Vera, B. y Conde, J.E.** (2009). Macroalgas asociadas a las raíces de *Rhizophora mangle* L. en la península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanog. de Venezuela** **48(1)**: 11-21.
13. **Miloslavich, P., Klein, E., Martín, A., Bastidas, C., Marín B. y Spiniello P.** (2005). Venezuela en: **Caribbean Marine Biodiversity the known and the unknown** (Miloslavich, P. & Klein, E., ed.): 109-136 p.
14. **Velásquez-Boadas, A., Vera, B., Villaroel, J. y Rodríguez, J.** (2014). Primer registro de *Nemalion caricariense* (Nemaliales, Rhodophyta) para la costa venezolana. **Ciencias** **22(2)**: 80-89.
15. **Vera, B., Collado-Vides, L., Moreno, C. y van Tussenbroek B.** (2014). *Halophila stipulacea* (Hydrocharitaceae): A recent introduction to the continental waters of Venezuela. **J. Caribb. Sci.** **48(1)**: 66-70.
16. **Vera, B.** (2008). Contributions of Seagrass Ecosystem to the Venezuelan coastline vegetation. Cap. 7. En: **Mangroves and Halophytes: Restauration and utilization**. (Proceedings of the Venezuelan European Seminars. (M. García Sucre, H. Lieth & B. Herzog, Ed.). Springer-Verlag, Osbabrueck, Alemania: 123-135.
17. **Vera, B. y Ardito, S.** (2014). Las macrófitas marinas de la costa venezolana, borde sur del Mar Caribe. **X Congreso Latinoamericano de Ficología, Metepec, México**.
18. **Vera, B. y Linares, J.** (2011). Nuevos registros de macroalgas (Rhodophyta) para la costa del estado Vargas. **XIX Congreso Venezolano de Botánica**.
<http://127.0.01:4001/docu.php?pelo=166>
19. **Vera, B. y Velásquez, A.** (2011). Macroalgas indicadoras de surgencia dentro del cambio ambiental. **Resúmenes del XIX Congreso Venezolano de Ecología**: 522.
20. **Vera, B.** (2015). Evaluación del uso del alga Marina *Ulva lactuca* L. como abono orgánico y su aprovechamiento en el cultivo de *Capsicum annuum* L. Crop. (Solanaceae, Magnoliophyta). **Tesis de Grado. Univ. de Carabobo**. 128 p.

ÍNDICE

- Agudelo, A. 77
Aguilar, C. 41
Alvarado, I. 65
Álvez, B. 137
Ardito, S. 169
Arismendi, V. 161
Arvelo, F. 29, 49, 53
Barrios, R. 133
Barrios, Y. 109
Belandria, R. 161
Benaim, G. 13, 17, 21, 25, 29
Betancourt, A. 97
Blanco, H.A. 89, 93
Bolaños, M. 121, 125
Briceño, H. 113, 117
Brito, A. 89
Cabrita, R. 129
Cáceres, A. 141
Cáceres–Mago, K. 141
Calderón, C. 53
Camejo, M.V. 45
Carballo Barrera, Y. 165
Cardozo, A. 161
Casotto, M. 41
Castillo, A. 161
Cervino, V. 21, 25, 29, 61
Coppola, F. 133
Da Silva, A. 77
Dagger Boyer, F. 33
De Almeida, J. 121, 125
De Gouveia, Y. 17
Dorta, B. 65
Durango, E. 129
El Ayoubi, B. 101
Escala, M. 145, 149
Fernandes, M.C. 133
Ferrer Pereira, H. 149, 153
Fonseca, I. 41, 137
Gajardo, R. 65
García, E. De 89, 93, 97
García, M. 29
García, M. 165
García, V. 13
García-Alzate, R. 69
Gil, N. 165
Gómez, S. 165
Gonto, R. 157
González, E.J. 81
González, F. 53
González-Sanabria, N. 61
Graterol, M. 73
Guevara Trejo, P. 77
Gutiérrez, A. 53
Hermoso, L. 97, 101, 145
Hernández, V. 13, 17
Hernández-Chinea, C. 1, 5, 9
Herrera, A. 121
Herrera, L. 69
Hokche, O. 105
Hugle-Misle, H. 101
Junco, M. 133
Kouznetsov, V. 29
Lander, O. 69
Landi-Conde, D. 61
López, D. 81
Lozano-Arias, D. 69
Maiquetía, M. 97
Marcano, A.K. 133
Marques-Pauls, S. 169
Márquez, M. 141
Márquez, M.L. 45
Marval, R. 97
Mata Daboin, A.D. 57, 61
Mayz, E. 161
Medina, V. 97
Mejía, J. 37
Méndez, M. 9
Méndez, M.A. 37
Mendoza, M. 25
Mendoza-León, A. 69, 73
Menéndez-Yuffá, A. 97, 101
Merchan Arenas, D. 29
Merentes, E. 45
Mijares, A. 77
Mondragón, A. 157
Moreno, C. 169
Moreno, M. 129
Morocoima, A. 69
Navarro, E. 45
Oropeza, M. 129, 133, 137
Ortiz, S. 49
Parra, N. 77
Paz, C. 169
Pérez Almeida, I. 153
Pérez-Gordones, M.C. 9, 21, 25
Pietrangeli, M. 161
Pincay, M. 125
Pinto, A. 13
Portillo, Y. 61
Ramírez, N. 105, 109, 113, 117
Ramírez-Iglesia, J.R. 25
Raymúndez, M.B. 149, 153, 157
Reina, Y. 129
Reyes-Lugo, R.M. 69
Reynel, V. 121, 125
Rivas, P. 61
Rodríguez, J. 13, 17
Rodríguez, L. 81
Rodríguez, L.M. 5
Romero, J.G. 57, 61
Romero, P.J. 1, 5, 9
Romero-Landi., O. 61
Sabino, M. 49
Salas, V. 37
Serrano, M.L. 73
Silva, A. 157
Sojo, F. 29, 49, 53
Suárez, A. 17
Sulbarán, A. 141
Tárano Miranda, Z. 85
Tezara, W. 121, 125
Toro, M. 97
Torres, F. 89
Uzcanga, G. 25
Vargas, T.E. 89, 93, 97, 101
Velásquez, A. 169
Vera, B.E. 169
Villarroel, A. 29
Vonasek, E. 9
Zambrano-Arnone, A.R. 61

Este libro se editó en el
Instituto de Biología Experimental,
Universidad Central de Venezuela
Caracas, enero de 2018