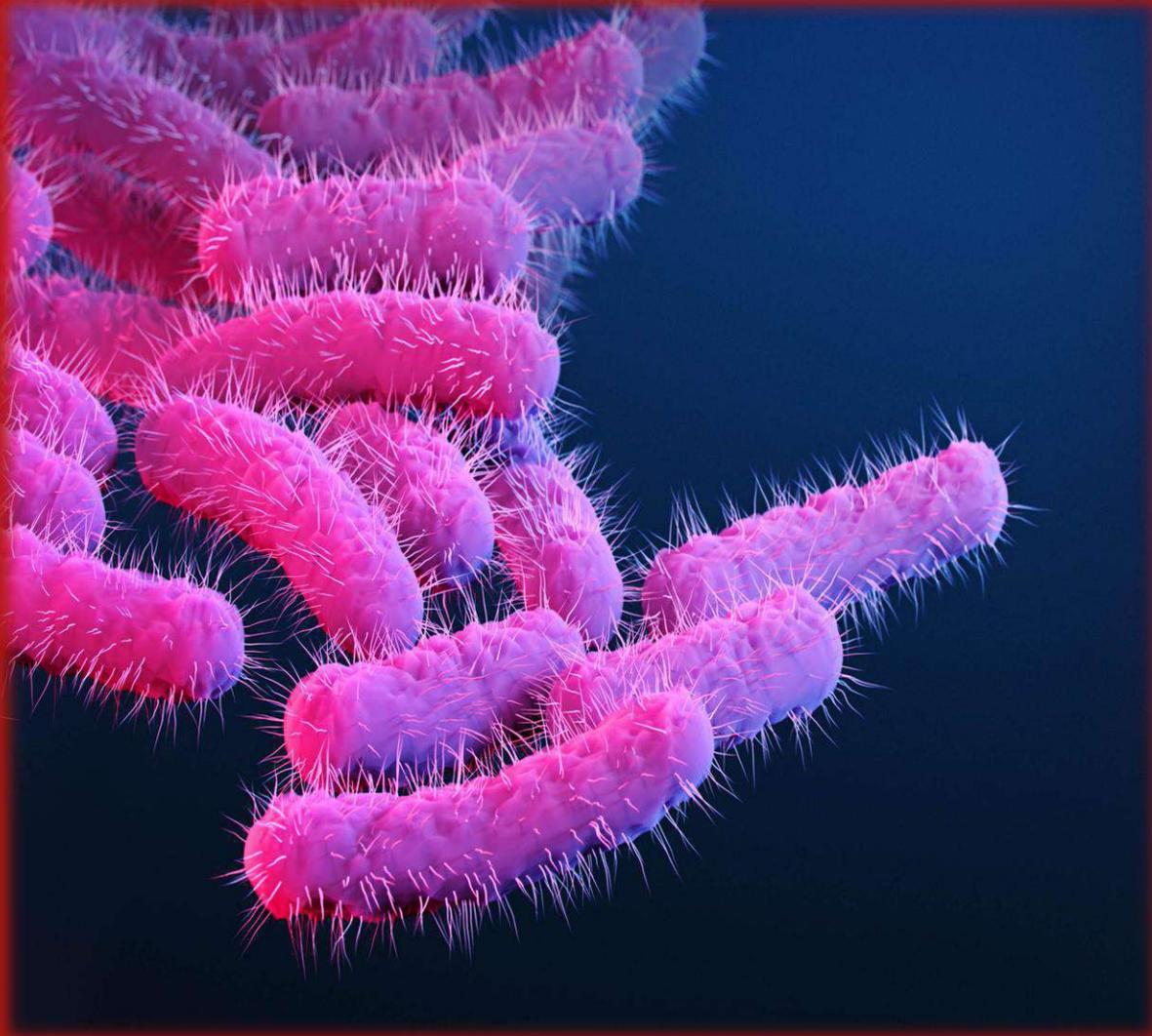


Anales de Medicina

PUCMM



Órgano oficial de expresión de la
Escuela de Medicina

Volumen 9, Número 1, Año 2019

epub ISSN 2074-7039

Anales de Medicina

PUCMM

Órgano oficial de expresión de la Escuela de Medicina

Director General

Nelson Martínez, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra

Editor

Patxis Taveras, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra

Comité Editorial

Isi Ortiz, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra

José Javier Sánchez, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra

Descargo de responsabilidad sobre los fármacos: La mención de las marcas, productos u organizaciones comerciales en la revista no implica aprobación por Anales de Medicina PUCMM, sus editores, la junta de editores, la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra o la organización a la que los autores se encuentren afiliados. Los editores han tomado todas las precauciones razonables para verificar los nombres de los fármacos y sus dosis, los resultados de trabajo experimental y hallazgos clínicos publicados en la revista. La última responsabilidad por el uso y las dosis de las drogas mencionadas en la revista, en base a la interpretación de la literatura actual, recae en el médico practicante y los editores no pueden aceptar responsabilidad por daños producidos por errores u omisiones en la revista. Por favor, informe a los editores cualquier error que encuentre.

Descargo de responsabilidad sobre contenido: Las opiniones expresadas en Anales de Medicina PUCMM son las de los autores y contribuyentes, no reflejan, por necesidad, la de los editores, la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra o la organización a la que los autores se encuentren afiliados.

Imagen de portada: Imagen de libre acceso de Public Health Image Library (PHIL).

Anales de Medicina PUCMM es el medio oficial de difusión que utiliza la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, para dar a conocer los trabajos de investigación realizados por sus estudiantes y/o personal docente, así como también las investigaciones llevadas a cabo en otras universidades o instituciones nacionales e internacionales. Esta revista es electrónica, publicada de forma bianual y se encuentra indexada en Latindex. Además, es arbitrada por el sistema de revisión por pares.

Escuela de Medicina
Facultad de Ciencias de la Salud
Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra
Autopista Duarte Km. 1 ½, Santiago,
República Dominicana.
Tel: 809-580-1962. Ext. 4231

Los conceptos expresados en esta revista son de la exclusiva responsabilidad de los autores.

Para información de contacto con fines de preguntas, publicaciones o publicidad, favor escribir a:

analesdemedicina@pucmm.edu.do

Índice

Editorial

El 80 de mi 20

Maureen Nicole Ventura. 4

Artículos Originales

1. Diferencia arterio-venosa del CO₂ comparada con el ácido láctico como marcador de perfusión tisular en shock séptico

Pichardo García BM, Moya Rodríguez ON, Jiménez Jiménez CA5

2. Relación entre colonización de la vía respiratoria superior y neumonía asociada al ventilador

Martínez E, García R, De Luna D17

3. Percepción de imagen corporal y su relación con el estado nutricional de los estudiantes que asisten a los centros educativos de la provincia Santiago

Rochits H, Rosa A, Marte P, Martínez-Rodríguez NL, Ortiz IY 25

Artículos de Revisión

4. Bases fisiológicas de la microbiota intestinal

Ferreira E, Fernández O, López Fañas R. 40

5. Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Gram Positivas

Fiallo Souffront PM, López Fañas R, Bisonó García B, Madera Durán OA 60

6. CRISPR: Modelos de Edición Génica

Gutiérrez A, Zorrilla C, López L.....80

Guía para Autores

Editorial

El 80 de mi 20

Maureen Nicole Ventura R, MD

Hace un tiempo atrás un destacado ingeniero, sociólogo, economista y filósofo, Vilfredo Pareto, desarrolló el principio del 80/20 o la ley de Pareto. Si bien nos habla de un principio aplicado a economía, puede ser aplicado a otras áreas de nuestra vida. La ley en su forma más sencilla nos habla que hay un 20% esencial y un 80% trivial, en otras palabras, si quisieras desarrollar un plan a cabo dependería posiblemente de solo el 20% de tus esfuerzos.

Aplicado a otras áreas como la investigación, se vislumbra lo mismo cuando se adquiere una muestra o proporción para extrapolar los datos a una población mayor. Y es que el principio puede ser modificado en las proporciones que más se nos ajusten 80/20, 90/10 o incluso 70/30.

Con este principio de proporciones, se puede ejemplificar cómo también influyen ciertos aspectos en el área de la salud. Teniendo en cuenta el desarrollo de enfermedades crónicas (hipertensión arterial, diabetes mellitus, cáncer, entre otras) y los factores de riesgo que las acompañan; podemos recurrir a explicar que con lograr un 10% de disminución en alguno de los factores, de manera global reduciríamos también las muertes asociadas.

Actualmente el principio de Pareto, nos ayuda a comprender que paradójicamente los números importantes son el porcentaje menor. Si bien no puede ser usado para explicar un sin número de situaciones, especialmente no podemos usarlo para predecir los brotes en enfermedades infectocontagiosas que crecen exponencialmente.

Podemos usarlo para explicar: cómo cerca del 80% de nuestras emociones dependen del 20% de las cosas que nos pasan, que el 70% de nuestros ingresos depende del 30% de nuestras actividades

laborales o que el 90% de nuestra felicidad depende aproximadamente del 10% de las cosas que hacemos.

Es el caso que, a conveniencia, les exhorto a explorar este 10, 20 o 30% de posibilidad. De manera que no malgastemos, tiempo ni energía innecesarios, sino, en lograr enfocarnos en esa proporción. Finalmente, como idea descabellada les propongo pensar ¿Si están en su 20% o en el 80% de donde quieren estar?

Artículo Original

Diferencia arterio-venosa del CO₂ comparada con el ácido láctico como marcador de perfusión tisular en shock séptico

Pichardo García BM¹, Moya Rodríguez ON¹, Jiménez Jiménez CA¹

¹Médico Intensivista, Departamento de Cuidado Crítico del Hospital Metropolitano de Santiago, Santiago, República Dominicana. Contacto: cesar.jimenez00@icloud.com

RESUMEN

Introducción: No está claro si la diferencia arterio-venosa del CO₂ es comparable con el ácido láctico como parámetro de perfusión tisular durante la reanimación hídrica en pacientes con shock séptico, siendo la recuperación de la perfusión tisular en las primeras 24 horas un factor determinante mayor en el pronóstico de los mismos. En una cohorte de 30 pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos medimos los niveles séricos de dichos marcadores durante la reanimación hídrica y comparamos los diagnósticos al ingreso con las tasas de mortalidad establecidas por SOFA y APACHE II.

Métodos: Se realizó un estudio de un solo centro, observacional, descriptivo, prospectivo y fuente primaria. El muestreo fue no probabilístico por conveniencia. El análisis estadístico fue a través de la prueba Chi cuadrado, con un nivel de confianza del 95%.

Resultados: El foco infeccioso más frecuente fue del tracto gastrointestinal con un 30%. El 40% de los pacientes fallecieron y se corroboró con el puntaje alto de APACHE II.

Conclusión: El 63% de los pacientes presentaban el lactato y diferencial del CO₂ alterado en el tiempo 0 horas. A mayor porcentaje de APACHE II se predice una alta probabilidad de muerte. Puede haber una relación clínica entre los niveles alterados del lactato y el diferencial del CO₂

Palabras claves: lactato, diferencial del CO₂, SOFA, APACHE II, sepsis grave, perfusión tisular, unidad de cuidados intensivos.

ABSTRACT

Background: It is unclear whether arteriovenous difference of CO₂ is comparable to lactic acid as tissue perfusion parameter during fluid resuscitation in patients with septic shock, being the tissue perfusion's recovery in the first 24 hours a major determinant of prognosis in these patients. In a cohort of 30 patients admitted at the critical care unit we measured the levels of these markers during fluid resuscitation phase and compare them with the diagnosis at admittance and mortality rates established by SOFA and APACHE II scores.

Methods: This study was observational, descriptive, prospective and from primary source. Sampling was non-probabilistic for convenience. Statistical analysis was performed using the Chi square test, with a confidence level of 95%.

Results: The most frequent focus of infectious was of the gastrointestinal tract with 30%. 40% of the patients died and were corroborated with the APACHE II high score.

Conclusion: 63% of patients presented lactate and CO₂ differential altered at time 0 hours. A higher percentage of APACHE II predicts a high probability of death. There may be a clinical relationship between the lactate alteration levels and the CO₂ differential.

Key words: lactate, CO₂ differential, SOFA, APACHE II, severe sepsis, tissue perfusion, intensive care unit.

INTRODUCCIÓN

La sepsis es una disfunción orgánica que pone en peligro la vida, secundaria a una respuesta inmunológica desregulada por el huésped a la infección y el shock séptico es el conjunto de disfunción circulatoria, celular/metabólica de la sepsis asociada con un elevado riesgo de muerte.

La sepsis y el shock séptico son condiciones delicadas de salud, que provocan la muerte de uno de cada cuatro personas a nivel mundial y que progresivamente va aumentando su incidencia¹⁻⁵. Al igual que el politraumatismo, el accidente cerebrovascular o el infarto agudo de miocardio, la rapidez y la adecuación

del tratamiento empleado son en las primeras horas posteriores a la aparición de una sepsis los factores que tienden a influir en el resultado.

Las variables hemodinámicas sistémicas como la frecuencia cardíaca, presión arterial, el gasto cardíaco y las presiones de llenado cardíaco son nuestros factores favoritos para guiar los esfuerzos de reanimación en pacientes que sufren shock. Las actuales directrices de la campaña de supervivencia de la sepsis sugieren la reanimación protocolizada y estructurada temprana de las variables hemodinámicas sistémicas en los pacientes cuando se asume la

hipoperfusión¹. Sin embargo, se sabe que las mediciones globales de las variables hemodinámicas sistémicas o de las variables sistémicas de transporte de oxígeno no reflejan necesariamente la adecuación del suministro de oxígeno a nivel microcirculatorio. Además, nuestro conocimiento acerca de la orientación de la microcirculación para la resucitación de shock es aún escaso, a pesar de la evidencia de la alteración del flujo sanguíneo microcirculatorio y el suministro de oxígeno en los tejidos en el choque circulatorio ⁶⁻⁹.

MÉTODOS

Se recopilaron datos de los valores de dióxido de carbono (CO₂) a nivel arterial y venoso, así como de lactato sérico para luego determinar la diferencia entre ambos a las 0, 6, 24 horas del ingreso en aquellos pacientes diagnosticados de shock séptico en la unidad de cuidados intensivos. El instrumento validado de recolección de datos permitió establecer las características demográficas y dimensión de la población en estudio.

Los datos en las bases de datos fueron analizados en el programa de SPSS versión. Su facilidad es que se obtendrán los resultados de la prueba estadística aplicada y las tablas. Además se empleó el programa M. Word para elaborar el informe final y reeditar las tablas. Mientras que M.

Excel, se usó para crear a base de datos y elaborar las gráficas.

El plan de análisis a ejecutar es la elaboración de una curva para la diferencia de CO₂ y otra curva para la determinación de lactato. Para comparar los resultados se hizo la prueba estadística de Chi cuadrado. Se trabajó con un nivel de confianza del 95 %, el error permitido es del 5%, es decir, $p < 0.05$.

Se utilizó la escala de evaluación de salud crónica y fisiología aguda "Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II" (APACHE II) como escala probabilística de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos (UCI), para comparar con los resultados obtenidos en el estudio.

El estudio fue revisado por los comités de COBE-FACS evaluado por la PUCMM y el comité de bioética del HOMS. Se mantuvieron los principios del informe Belmont y los datos se emplearon para fines científicos que colaborarán con la mejoría en el manejo de los pacientes.

RESULTADOS

De las características generales de la población se observa que predominaba el sexo masculino en un 53%, y la edad media fue de 62 ± 17.87 años. El foco infeccioso más frecuente fue del tracto gastrointestinal con un 30%, seguido

por las vías respiratorias/ pulmón con un 27% y luego piel y tejido celular subcutáneo con un 23%. Las infecciones del tracto urinario se presentaron en el 13% de los casos y en la herida o cirugía en el 7% (ver Tabla 1).

El lactato a las 0 horas se encontró elevado en el 90% de las muestras, descendiendo a las 6 horas a un 70% y a las 24 horas a un 63%, en cambio para la diferencia arterio-venosa del CO₂ estuvo alterado a las 0 horas en el 67% ($X^2= 1.667$; $p= 0.197$), luego a las 6 horas descendió a un 37% ($X^2= 3.616$; $p= 0.057$) y a las 24 horas aumentó a un 40% ($X^2= 3.445$; $p= 0.063$) en relación al lactato sérico (ver Tabla 2). Para el grupo en general, la probabilidad de muerte por la escala de APACHE II era de $50.7 \pm 17.57\%$ al momento del ingreso (tiempo hora 0) y cambio a un 39.54 ± 25.89 a las 24 horas. Cuando se comparan los resultados en el tiempo 0 horas para aquellos pacientes con diferencia CO₂ y lactato alterado el APACHE II era mayor con un valor de $53.79 \pm 12.37\%$.

Para la misma característica pero a las 24 horas se establecía una probabilidad de muerte de $57.4 \pm 27.60\%$ (ver tabla 1). Estos resultados se correlacionan con el porcentaje de defunciones obtenidas en el estudio con relación al pronóstico establecido a su llegada por dicha escala.

Los resultados entre la diferencia de CO₂, en los diferentes tiempos, con el sexo y la edad, mostraban que el 43% de la diferencia del CO₂ en el sexo femenino se encontró elevada mientras que el sexo masculino solo en un 23% ($p= 0.070$). Al transcurrir las 6 horas siguientes, los valores disminuyeron, observándose un 20% en el grupo femenino y un 17% en el sexo masculino, con un nuevo incremento a las 24 horas a 57% ($p= 0.072$) en el sexo femenino, un comportamiento no observado en el género opuesto quienes mantuvieron un mismo porcentaje. Para el rango de edad, el 37% presentaban una diferencia del CO₂ alterado entre los que tenían 60 años o más, seguido por el rango de 36-59 años con un 20%. Dichos valores disminuyeron a las 6 horas con un 33% para el rango de 60 años o más y un 10% el rango de 36-59 años. A las 24 horas los valores permanecieron iguales que en el tiempo anterior ($p= 0.518$) (ver Tabla 3).

DISCUSIÓN

Es conocido que la diferencia de gases sirve como índice global para conocer la perfusión de los tejidos en pacientes con shock séptico.¹⁰ Por lo que una diferencia mayor a 6 mmHg es una herramienta útil para identificar a los pacientes complicados con una inadecuada estabilidad general. Se ha descrito que cuando los pacientes sufren

infecciones cerebrovasculares presentan una mayor concentración de CO₂ en comparación con pacientes sanos. Este aumento se correlacionaba a un incremento del ácido láctico en los mismos.¹¹

Los pacientes con sepsis grave o shock séptico, tienen afectado el aporte tisular del oxígeno (O₂), con lo cual las células generan el ATP por una vía anaeróbica en el ciclo de Krebs. Es decir, que como metabolito de desecho se genera ácido láctico y se produce un incremento en la producción del CO₂, lo cual conlleva a un estado de acidosis metabólica que compromete aún más la perfusión tisular. Esto se debe a que los organismos aeróbicos dependen de un suministro adecuado de O₂ en los tejidos para producir la fuente de energía tipo ATP, para todas las funciones celulares que requieran gasto de energía. Por lo que la fosforilación oxidativa es fundamental en el desenvolvimiento celular y de estar afectada, se activan mecanismos para generar ATP, sin embargo la vía empleada va en detrimento de la propia célula si este persiste en el tiempo. Por esto se establece que la extensión de la deuda del O₂ se relaciona directamente con el nivel de acidosis metabólica, la disfunción orgánica y la mortalidad de dichos pacientes. Braun et al¹², argumentan que los órganos tienen

una mejor perfusión cuando se aporta suficiente oxígeno a los tejidos.

Dada la severidad que representa el cuadro de shock séptico y buscando alternativas que ayuden a identificar el comportamiento de los pacientes durante la terapia de recuperación de perfusión tisular, y buscando mejorar pronóstico del grupo de los pacientes afectados, comparamos el diferencial arteriovenoso de CO₂ con el nivel ácido láctico como principal marcador de hipoperfusión tisular como consecuencia del desbalance hídrico-químico y de oferta y demanda de oxígeno. El aumento en la relación de la diferencia arterio-venoso central del CO₂ y del O₂ se asocia con un mal aclaramiento del lactato luego de la resucitación del paciente.¹³ Se observó que los pacientes de nuestro estudio, ingresados a UCI con shock séptico, presentaban estos parámetros alterados en un 63%. Cuando el paciente fue manejado en la unidad, brindándole el soporte necesario apegado a las guías de la campaña sobreviviendo a la sepsis (surviving sepsis campaign), es decir, corrigiendo el desequilibrio ácido base y controlando la sepsis o el shock séptico, los parámetros fueron mejorando a las 6 horas y 24 horas.

Gutierrez et al.¹⁴ al medir la saturación de oxígeno en sangre y el gradiente de concentración del ácido láctico en la vena cava superior y en

la arteria pulmonar, observaron un gradiente positivo en los pacientes que sobrevivieron, mientras que el gradiente era negativo en los pacientes que fallecieron. Demostraron estadísticamente que existe una asociación fuerte entre la diferencia del oxígeno y lactato con relación a la supervivencia del paciente críticamente enfermo. Corroborando lo antes descrito, Cuschieri et al¹⁵ comprobaron que la diferencia de la presión del CO₂ en la arteria pulmonar y en el acceso central venoso se correlaciona inversamente con el índice cardíaco, lo que resulta en una alteración de la perfusión.

En nuestro estudio se observó que el lactato alterado a las 0 horas fue del 90%, descendiendo a las 6 horas a un 70% y a las 24 horas a un 63%. Para la diferencia arterio-venosa del CO₂ a las 0 horas fue del 67%, luego a las 6 horas descendió a un 37% y a las 24 horas aumentó a un 40%. En este sentido Herranz et al¹⁶ observaron que en los pacientes con un aclaramiento del lactato en las primeras horas, que sea \geq al 10% presentaba una mayor supervivencia, mientras que aquellos con resultados menores tenía un 28% probabilidad más de fallecer.

Sin embargo, Van Beest et al¹⁷ encontraron una asociación débil entre la diferencia de la pCO₂ y el

índice cardíaco. Es decir que no está clara la afirmación sobre la diferencia del CO₂ y los niveles de lactato. Igual es el caso de Armendáriz et al¹⁸, en que sus resultados no demostraron una diferencia significativa de la diferencia del CO₂ cuando se relacionaba como a la supervivencia del paciente con shock séptico, aunque el pH y el lactato si se han demostrado ser útiles. Empero, Robin et al¹⁹ encontraron que la diferencia alta del CO₂ se asoció con el incremento de las complicaciones y con menor perfusión a los tejidos. También encontraron que los pacientes con una diferencia del CO₂ \geq 6 mmHg se asociaba con fallo multiorgánico, incremento en la duración de la ventilación mecánica y estancia hospitalaria.

Para nuestro estudio se observaron que en el tiempo 0 horas, aquellos pacientes con diferencia CO₂ y lactato alterado tenían un APACHE II de $53.79 \pm 12.37\%$. Para la misma característica pero a las 24 horas se observó que aumentó a un $57.4 \pm 27.60\%$, es decir que la probabilidad de fallecer era alta. En el estudio de Ospina-Tascón¹³ la mortalidad fue del 71.4% asociada a lactato alterado y el diferencial del CO₂. Para este mismo grupo la escala de APACHE estaba alta y presentaron mayor acidosis en los tiempos 0 horas y 6 horas. En este sentido la diferencia del CO₂ puede ser útil como marcador para observar

la evolución del shock, además de predecir mortalidad en los pacientes al igual que el lactato.

CONCLUSIONES

A pesar de las intervenciones terapéuticas la tasa de mortalidad en nuestro centro fue del 40% de los casos, con una predicción de la escala APACHE II estimada de $50.7 \pm 17.57\%$ al momento del ingreso y un 39.54 ± 25.89 a las 24 horas.

No podemos afirmar que el diferencial del CO_2 sea la herramienta óptima para considerar la recuperación de la perfusión tisular del paciente con sepsis o shock séptico. Se deben realizar más estudios que valoren la perfusión tisular cuando se compara la diferencia del CO_2 con el lactato para definir mejor la sensibilidad y especificidad del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303–1310
3. Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31:946–955
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546–1554
5. Linde-Zwirble WT, Angus DC: Severe sepsis epidemiology: Sampling, selection, and society. *Crit Care* 2004; 8:222–226
6. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35:1414–1415
7. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41:580–637
8. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 (Suppl 4):S13–S19
9. Den Uil CA, Lagrand WK, van der Ent M, et al. Impaired

- microcirculation predicts poor outcome of patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *Eur Heart J*. 2010;31:3032–3039
10. Vallée F, Vallet B, Mathe O, Parraguette J, Mari A, Silva S, Samii K, Fourcade O, Genestal M. Central venous-to-arterial carbon dioxide difference: an additional target for goal-directed therapy in septic shock?. *Intensive Care Med* (2008) 34:2218–2225.
 11. Moller G, Strauss G, Thomsen F, Larsen S, Holm S, Sperling B, Skinhoj P, Knudsen G. Cerebral blood flow, oxidative metabolism and cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with acute bacterial meningitis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 567–578
 12. Braun J, Jakob S, Volk T, Doepfmer U, Moshirzadeh M, Stegmann S, Dohmen P, Spies C. Arterio-venous gradients of free energy change for assessment of systemic and splanchnic perfusion in cardiac surgery patients. *Perfusion* 2006; 21: 353-360
 13. Huai-wu He, MD, Da-wei Liu, MD, Yun Long, MD, Xiao-ting Wang, MD. High central venous-to-arterial CO₂ difference/arterial-central venous O₂ difference ratio is associated with poor lactate clearance in septic patients after resuscitation. *Journal of Critical Care* 31 (2016) 76–81
 14. Gutierrez G et al. Central venous to mixed venous blood oxygen and lactate gradients are associated with outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med* (2008) 34:1662–1668
 15. Cuschieri J, et al. Central venous-arterial carbon dioxide difference as an indicator of cardiac index. *Intensive Care Med* (2005) 31:818–822
 16. Herranz S, Mancebo J, Sirvent J. Marcadores biológicos y aclaramiento de lactato como factores pronósticos de mortalidad en la sepsis. Trabajo de investigación del programa de Doctorado de Medicina Interna de la Universidad Autónoma de Barcelona. Año 2009-2010, convocatoria de septiembre.
 17. VanBeest P, et al. Central venous-arterial pCO₂ difference as a tool in resuscitation of septic patients. *Intensive Care Med* (2013) 39:1034–1039.
 18. Armendáriz C, Belzunegui T, Estudio sobre la utilidad de la determinación de la diferencia arterio-venosa de CO₂ en la predicción de la evolución del

shock séptico en la unidad de cuidados intensivos. Máster Universitario en Investigación en Ciencias de la Salud Universidad Pública De Navarra. Escuela Universitaria De Estudios Sanitarios.

19. Robin E, et al. Central venous-to-arterial CO₂ difference as a prognostic tool in high-risk surgical patients. *Critical Care* 2015, 19:227

Tabla 1. Características de los pacientes ingresados con sepsis en la UCI

Distribución de frecuencia de las variables del estudio y sus características generales					
Sexo	No	%	Foco infeccioso	No	%
Masculino	16	53%	Vías respiratorias/ pulmón	8	27%
Femenino	14	47%	Tracto Urinario	4	13%
			Piel y Tejido celular subcutáneo	7	23%
Edad (años)			Herida o cirugía	2	7%
18-35	3	10%	Tracto Gastrointestinal	9	30%
36-59	10	33%			
60 o más	17	57%	Mortalidad		
Edad promedio	62 ± 17.87		Defunción	12	40%
			No defunción	18	60%
Lactato			Diferencia arterio-venosa del CO₂		
Lactato alterado 0hrs	27	90%	Diferencia arterio-venosa del CO₂ 0hrs (alterado)	20	67%
Lactato alterado 6hrs	21	70%	Diferencia arterio-venosa del CO₂ 6hrs (alterado)	11	37%
Lactato alterado 24hrs	19	63%	Diferencia arterio-venosa del CO₂ 24hrs (alterado)	12	40%
Fuente: Determinación en la diferencia arterio/venosa del CO ₂ en comparación con el ácido láctico como marcador de perfusión tisular en pacientes con sepsis grave ingresados en la unidad de cuidados intensivos					

	Promedio	Desv. Estándar	Valor mínimo	Valor máximo	Rango
Lactato 0 h	4.11	2.17	1.2	8.9	7.7
Lactato 6 h	3.74	2.40	1	11	10
Lactato 24 h	3.53	3.36	0.8	14.7	13.9
Dif CO ₂ 0 h	7.34	4.45	0	18	18
Dif CO ₂ 6 h	5.46	3.77	0.9	15	14.1
Dif CO ₂ 24 h	7.60	10.07	0	54.3	54.3
APACHE II 0 h %	50.37	17.57	12.7	80.7	68
APACHE II 24 h %	39.54	25.89	6.6	89.7	83.1
Dif. CO ₂ 0h Alterado- Lactato 0h Alterado (n=19)/ APACHE II 0h	53.79	12.37	31.9	80.7	48.8
Dif. CO ₂ 24h Alterado- Lactato 24h Alterado (n=10)/ APACHE II 24h	57.4	27.60	18.4	89.7	71.3
Fuente: Determinación en la diferencia arterio/venosa del CO ₂ en comparación con el ácido láctico como marcador de perfusión tisular en pacientes con sepsis ingresados en la unidad de cuidados intensivos					

Tabla 2. Diferencia arterio-venosa del CO₂ en comparación con el ácido láctico como marcador de perfusión tisular luego de reanimación hídrica en pacientes con sepsis grave o shock séptico ingresados en la unidad de cuidados intensivos

Diferencia arterio-venosa del CO ₂ (0 horas)	Lactato 0horas				Total	
	Alterado		Normal		No	%
	No	%	No	%		
<i>Alterado</i>	19	63%	1	3%	20	67%
<i>Normal</i>	8	27%	2	7%	10	33%
<i>Total</i>	27	90%	3	10%	30	100%
$X^2= 1.667; p= 0.197$						
Diferencia arterio-venosa del CO ₂ (6horas)	Lactato 6horas				Total	
	Alterado		Normal		No	%
	No	%	No	%		
<i>Alterado</i>	10	33%	1	3%	19	67%
<i>Normal</i>	11	37%	8	27%	11	33%
<i>Total</i>	21	70%	9	30%	30	100%
$X^2= 3.616; p= 0.057$						
Diferencia arterio-venosa del CO ₂ (24horas)	Lactato 24horas				Total	
	Alterado		Normal		No	%
	No	%	No	%		
<i>Alterado</i>	10	33%	2	7%	18	67%
<i>Normal</i>	9	30%	9	30%	12	33%
<i>Total</i>	19	63%	11	37%	30	100%
$X^2= 3.445; p= 0.063$						
Fuente: Determinación en la diferencia arterio/venosa del CO ₂ en comparación con el ácido láctico como marcador de perfusion tisular en pacientes con sepsis grave ingresados en la unidad de cuidados intensivos						

Tabla 3. Sexo y edad relacionada con la diferencia arterio-venosa de CO₂ a las 0, 6, 24 horas

	Diferencia arterio-venosa del CO ₂ 0horas 0horas				Diferencia arterio-venosa del CO ₂ 0horas 6horas				Diferencia arterio-venosa del CO ₂ 0horas 24horas			
	<i>Alterado</i>		<i>Normal</i>		<i>Alterado</i>		<i>Normal</i>		<i>Alterado</i>		<i>Normal</i>	
Sexo	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
Femenino	13	43%	3	10%	6	20%	10	33%	17	57%	9	30%
Masculino	7	23%	7	23%	5	17%	9	30%	5	17%	9	30%
	$p= 0.070$				$p= 0.920$				$p= 0.072$			
Edad (años)												
18-35	3	10%	0	0%	1	3%	2	7%	2	7%	1	3%
36-59	6	20%	4	13%	3	10%	7	23%	3	10%	7	23%
60 o más	11	37%	6	20%	7	23%	10	33%	7	23%	10	33%
	$p= 0.421$				$p= 0.837$				$p= 0.518$			
Fuente: Determinación en la diferencia arterio/venosa del CO ₂ en comparación con el ácido láctico como marcador de perfusion tisular en pacientes con sepsis grave ingresados en la unidad de cuidados intensivos												

Artículo Original

Relación entre colonización de la vía respiratoria superior y neumonía asociada al ventilador

Martínez E^{1,2}, García R³, De Luna D^{1,4}

¹Docente, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana.

²Médico Intensivista, Hospital Metropolitano de Santiago, Santiago, República Dominicana.

³Médico Intensivista, Instituto de Especialidades Médicas, Moca, República Dominicana.

⁴Médico Infectólogo, Hospital Metropolitano de Santiago, Santiago, República Dominicana.

Contacto: d.deluna@ce.pucmm.edu.do

RESUMEN

Introducción: La neumonía asociada al ventilador (NAV) es una enfermedad relacionada al sistema de salud en el cual inciden varios factores, entre estos tenemos la colonización de las vías áreas superiores.

Métodos: Realizamos un estudio prospectivo observacional en los pacientes admitidos en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Metropolitano de Santiago durante el periodo agosto - diciembre del 2016.

Resultados: Obtuvimos 32 casos de los cuales 53% tenía colonización nasal y 50% colonización orogáringea. Los gérmenes mas frecuentes fueron *Tatumella spp.*, *E. aerogenes* y *E. Coli*. El 40.6% de los pacientes estudiados desarrollo NAV lo que representó el 54.1% de los pacientes colonizados.

Conclusión: La colonización de las vías áreas es un factor muy importante en el desarrollo de un primer episodio de NAV.

Palabras claves: Neumonía asociada al ventilador, ventilación mecánica, bacterias Gram negativas, Unidad de cuidados intensivos.

ABSTRACT

Background: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a disease related to the health system in which several factors affect; among these we have the colonization of the upper airways.

Methods: We carried out a prospective observational study in patients admitted to the intensive care unit of Hospital Metropolitano de Santiago during the period August - December 2016.

Results: We obtained 32 cases of which 53% had nasal colonization and 50% oropharyngeal colonization. The most frequent germs were *Tatumella spp.*, *E. aerogenes* and *E. Coli*. 40.6% of the patients studied developed VAP, which represents 54.1% of colonized patients.

Conclusion: The colonization of the road areas is a very important factor in the development of a first episode of VAP.

Key words: Ventilator-associated pneumonia, mechanical ventilation, Gram-negative bacteria, intensive care unit.

INTRODUCCIÓN

La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) es una infección relacionada al sistema de salud que se desarrolla en los pacientes con más de 48 horas de estar colocados en ventilación mecánica (VM). La colonización por agentes patógenos de las vías respiratorias altas, principalmente de la orofaringe, es un factor importante para el desarrollo de NAV ya que éstos accesan al parenquima pulmonar por las constantes microaspiraciones(1).

El tubo endotraqueal (TE) tiene un rol en el desarrollo de NAV debido a que causa trauma a la mucosa durante el proceso de la intubación, afecta la función ciliar de las vías aérea superior y reduce reflejo de tusígeno. El TE también puede servir como sitio de colonización y provoca el aumento de secreción mucosa. Con todo esto,

la intubación permite la fuga de microorganismos de la orofaringe alrededor del tubo hacia las vías aéreas inferiores provocando el proceso neumónico (2).

Existen evidencia que demuestra la asociación entre la colonización de vías respiratorias altas, y la inadecuada higiene, con el riesgo de desarrollar neumonía nosocomial; pero las tasas de incidencia y mortalidad de la NAV varían debido a varios factores, como son la población en estudio, el tiempo de aparición del evento de NAV, los organismos causantes y el tratamiento antibiótico apropiado y oportuno (3). Este estudio se planteó investigar la correlación entre la colonización de la vía aérea superior y el desarrollo de la NAV en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI)

del Hospital Metropolitano de Santiago (HOMS).

MÉTODOS

Realizamos un estudio prospectivo observacional en los pacientes admitidos en la UCI del HOMS durante el periodo de agosto - diciembre del año 2015. Los criterios de inclusión que establecimos fueron dos: Edad mayor de 18 años e indicación de VM por causas no infecciosas; los criterios de exclusión fueron: Pacientes trasladados desde otro centro o admitidos en los últimos 30 días en una UCI, individuos con limitaciones para la toma de muestra y negativa de tutor para que el paciente fuera incluido en el estudio.

A los 32 pacientes seleccionados se le tomaron muestras de cultivo nasal, orofaríngeo y endotraqueal al momento de la intubación y fueron enviadas al laboratorio de microbiología del HOMS y procesadas en el MicroScan® cumpliendo los protocolos de cultivo automatizado especificados por el fabricante (Beackman Coulter, EEUU) (4), en los pacientes que le fue diagnosticado NAV se le tomó muestras de cultivo del tuboendotraqueal cumpliendo los estándares antes establecidos y una muestra de hemocultivo que primero fue procesada en BactAlert® (bioMérieux, francia) para seleccionar solo las muestras que dieran alerta de

la presencia de algún germen para posteriormente ser procesadas en MicroScan® (6).

La toma de muestra nasal y orofaríngeo se realizó introduciendo un hisopo de algodón estéril colocado en 1 ml de caldo de Soja Trypticasa (BD Diagnostics) con cloruro de sodio al 6,5%, para la toma de muestra endotraqueal se realizó introduciendo sonda estéril hasta el punto de resistencia y luego aplicando succión (6).

El diagnóstico de NAV se hizo utilizando criterios de la CDC en los pacientes que tenían 48 horas o más de haber sido colocados al sistema. Los criterios utilizados fueron: Temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$, leucocitosis o leucopenia, aparición de nuevo infiltrado radiográfico o progresión de infiltrado ya existente y cultivo de aspirado endotraqueal positivo; con lo que dividimos los pacientes con NAV y sin NAV (7).

Recolectamos las variables demográficas (sexo y edad), aislamiento de germen colonizador de vías respiratorias altas, primer episodio de NAV y tiempo en VM; estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud (COBE FACS) de la PUCMM.

El procesamiento de los datos fue redactado en Microsoft Word 2010 y de igual forma se redactó en este, lo concerniente al reporte final. Luego de completada la fase de recolección de la información se procedió al proceso de tabulación para el desarrollo de una base de datos en Microsoft Excel 2010 y posteriormente analizados en el paquete estadístico SPSS versión 19.0. Los gráficos que representan los resultados se realizaron mediante SPSS V19.0

RESULTADOS

Obtuvimos un total de 32 casos que cumplieron con los criterios de inclusión durante el tiempo de estudio de los cuales 17 (53.1%) tuvieron cultivos de nasales fueron negativos; de los casos con cultivos con crecimiento bacteriano, tres (9.4%) reportaron crecimiento de *Tatumella spp.* y tres (9.4%) con crecimiento de *E. aerogenes*, solo dos casos reportaron crecimiento de Estafilococo coagulasa negativo (3.1%). En los cultivos de orofaringe 16 reportaron negativos (50%), tres (9.4%) con crecimiento de *E. aerogenes* y tres (9.4%) con crecimiento de *E. coli*, en esta zona no se identificó ninguna bacteria Gram positiva (Ver Tabla I y II)

El 40.6% (13) de los casos estudiados presentaron un primer episodio de NAV, de los cuales todos estos casos fueron positivo para los cultivos de

colonización, en el análisis estadístico de Chi-cuadrado se obtuvo un valor de 7.28 con un valor de P de 0.007 por lo que representa un factor estadísticamente significativa en nuestra población.

El total de pacientes colonizados fue de 24 (75%), por lo que los 13 casos que presentaron NAV correspondía al 54.1%. En la valoración del tiempo de duración de la VM el 23% (3 casos) presentaron NAV en los primeros 4 días versus el 76% (10 casos) que presentó un primer episodio de NAV a partir de quinto día de VM (Valor de P 0.005), por lo que el tiempo en VM evidentemente representó una variable significativa en los pacientes analizados. (Ver Tabla III).

DISCUSIÓN

Un estudio de cohorte publicado en la Internacional Journal of Infectious Desasease buscó el rol de la colonización de las vías respiratorias superiores en el desarrollo de la NAV, esta investigación se llevó a cabo por un periodo de 15 meses con 200 pacientes que tenía > 48 horas en VM. Los resultados obtenidos demostraron que el 60 % de los colonizados desarrollaron NAV y que las bacterias más frecuentes fueron el *Acinetobacter spp* (33.7%) y la *Pseudomona spp* (29.8%). Si hacemos el contraste con nuestra investigación, coincidimos con que las bacterias más frecuentes correspondían a las Gram

negativas, aunque en nuestro caso predominaron la *Tatumella spp.*, *E. aerogenes* y la *E. coli*; el porcentaje de nuestros pacientes que estuvieron colonizados y que desarrollaron NAV fue del 40.6%, lo que representa una proporción alta, por lo que, coinciden en ser porcentajes elevados en este grupo de pacientes (8).

Durante el periodo 2007 - 2011 Lee MS et al., llevaron a cabo un estudio observacional en 30 hospitales comunitarios de los EEUU para determinar la epidemiología de la NAV en dichos hospitales; se obtuvieron un total de 247 casos donde la media de edad fue de 64 años con una distribución de 55.1% femeninas. Debido a la pequeña muestra de nuestro estudio, no pudimos observar relación estadísticamente significativa en la edad, pero esto no descarta en lo absoluto su importancia (9).

Raymond Khan et al., desarrollaron una investigación llamada "The Impact of once time on the isolated pathogens and outcomes in ventilator associated pneumonia" buscando la incidencia de NAV dependiendo del tiempo en VM y del tiempo de hospitalización del paciente; encontraron que de los 394 episodios de NAV evaluados en un centro de tercer nivel el 16% desarrollo NAV en los primeros 4 días de su VM en contraste con el 84% que presentó la

entidad con mas de 4 días de tener la VM, sin embargo ni el inicio tardío de la NAV o la estadía prologando demostró tener un impacto en la mortalidad (10).

En este estudio la duración de ≥ 5 días de VM tuvo una relación estadísticamente significativa con la aparición de NAV, lo que corrobora con la revisión antes mencionada y con las publicaciones de carácter epidemiológico, por lo que es un factor a tener en cuenta para las medidas de control de infección.

La gran limitación de nuestro estudio fue la pequeña población que estudiamos, sin embargo, pudimos tener significancia estadística en dos de las tres principales variables que estudiamos, que fueron la colonización de la vías aéreas y tiempo de duración de la VM.

Otra limitante que entramos estuvo en los reportes de cultivos; en un primer sentido relacionado a que no pudimos tener reportes cuantitativos o semi-cuantitativos para hacer una mejor definición de colonización de las vías aéreas superiores y por otro lado obtuvimos un alto número de *Tatumella spp.*, lo que no pudimos confirmar en algún laboratorio de referencia. De todas maneras, lo que si podemos concluir es que las bacterias Gram negativas, en especial las Enterobacteriaceas, juega un gran

papel en la colonización de las vías áreas superiores y en el posterior desarrollo de la NAV.

Por lo tanto, recomendamos llevar a cabo otros estudios que cubran aspectos como la tasa de mortalidad, la incidencia general de NAV, otros factores de riesgos asociados y la relación de NAV con el tiempo de internamiento del paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Torres A, El-Ebiary M, Soler N, Monton C, Fabregas N, Hernández C. Stomach as a source of colonization of the respiratory tract during mechanical ventilation: association with ventilator-associated pneumonía. *EurRespir J*. 1996. 9:8, 1729-1735.
2. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo J, Gonzalez E, Calleja I et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonía response: a state of concept. *Critical Care*. 2012;16(3):R93.
3. Koeman M, Van der Ven J, Hak E, Joore H, Kaasjager K, Smet, Graham A, et al. Oral Decontamination with Chlorhexidine Reduces the Incidence of Ventilator-associated Pneumonía. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. [Internet]. 2006. 173:12, 1348-1355.
4. Beckman Coulter, Inc. - Beckman Coulter, Inc. [Internet]. Beckmancoulter.com. 2017.
5. BacT/ALERT® 3D: Healthcare [Internet]. bioMérieux. 2017.
6. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2016; 63:e61.
7. Klompas M. Complications of mechanical ventilation—the CDC's new surveillance paradigm. *N Engl J Med* 2013; 368:1472.
8. Joseph N, Sistla S, Dutta T, Badhe A, Parija S. Ventilator-associated pneumonía: role of colonizers and value of routine endotracheal aspirate cultures. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(8):e723-e729.
9. Lee M, Walker V, Chen L, Sexton D, Anderson D. The Epidemiology of Ventilator-Associated Pneumonia in a Network of Community Hospitals: A Prospective Multicenter Study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2013;34(07):657-662.
10. Khan R, Al-Dorzi H, Tamim H, Rishu A, Balkhy H, El-Saed A et al. The impact of onset time on the isolated pathogens and outcomes in ventilator associated pneumonia.

Journal of Infection and Public
Health. 2016;9(2):161-171.

Tabla I. Agentes causales Cultivo Nasal

Agente causal cultivo nasal		
	Frecuencia	Porcentaje
Ninguno	17	53.1
A. Baumannii	2	6.3
Cedecea Neteri	1	3.1
E. Aerogenes	3	9.4
M. Morganii	1	3.1
P. Aeruginosa	1	3.1
S. Liquefaciens	1	3.1
S. Lugdunensis	1	3.1
S. Marcesnens	1	3.1
Tatumella	3	9.4
Y. Ruckeri	1	3.1
Total	32	100.0

Tabla II. Agentes causales Cultivo Orofaringeo

Agente causal cultivo orofaringeo		
	Frecuencia	Porcentaje
Ninguno	16	50.0
E. Aerogenes	3	9.4
E. Coli	3	9.4
E. Gergoviae	1	3.1
K. Oxytoca	1	3.1
P. Aeruginosa	1	3.1
Shigella Sp.	1	3.1
Tatumella	5	15.6
Y. Pseudotb	1	3.1
Total	32	100.0

Tabla III. Resumen de relaciones estadísticas de edad, colonización y días de VM con o sin un primer episodio de NAV

Característica	Con NAV	Sin NAV	Chi-cuadrada	Valor de P
Edad			0.277	0.9464
< 66a	11	16		
≥ 66a	2	3		
Colonizados			7.298	0.007
Si	13	11		
No	0	8		
Días de VM			3.802	0.005
< 4 días	3	11		
≥ 5 días	10	8		

Artículo Original
**Percepción de imagen corporal y su relación con el estado
nutricional de los estudiantes que asisten a los centros
educativos de la provincia Santiago**

Rochits H¹, Rosa A², Marte P², Martínez-Rodríguez NL¹, Ortiz IY¹

¹*Docente, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud,
Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana. Contacto:
h.rochits@ce.pucmm.edu.do*

²*Egresado, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud,
Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana.*

RESUMEN

Objetivo. Describir la relación entre la percepción de imagen corporal y el estado nutricional antropométrico de los estudiantes que asisten a centros educativos.

Métodos. Se realizó un estudio transversal y de fuente primaria, en el periodo septiembre-noviembre del año 2017, en la provincia Santiago. Se aplicó la Encuesta Mundial de Salud a Escolares (GSHS, por sus siglas en inglés) a 620 adolescentes de 13 a 17 años, que asistieron a centros educativos. Se excluyeron 18 adolescentes. Los datos fueron presentados en porcentajes y la significancia estadística fue valorada con un valor de $p \leq 0.05$.

Resultados. El 61.1% se encontraba con peso normal, mientras que un 11.6 % en sobrepeso. El sexo femenino obtuvo el mayor porcentaje en la percepción errónea de su IMC, considerándolo muy bajo en un 77.8% y un 64.7% en sobrepeso.

Conclusión. Hubo predominio de una inadecuada percepción de imagen corporal. En ambos sexos se percibieron con un IMC menor al que tenían. La distorsión fue mayor en el sexo femenino y en el IMC con exceso de peso.

Palabras claves. Estado nutricional, imagen corporal, adolescentes, índice de masa corporal.

ABSTRACT

Objective. To describe the relationship between body image perception and anthropometric nutritional status of adolescents attending to educational centers.

Methods. A cross-sectional and primary source study was carried out in the period September-November 2017, in Santiago. The Global School Health Survey (GSHS) was applied to 620 adolescents between the ages of 13 and 17, who attended schools. 18 participants were excluded. Data were presented in percentages and statistical significance was assessed with a value of $p \leq 0.05$.

Results. 61.1% met normal weight, while 11.6% was overweight. The female sex obtained the highest percentage in the wrong perception of their BMI, very low in 77.8% and 64.7% in overweight.

Conclusion. There was a predominance of inadequate perception of body image. In both sexes they were perceived with lower BMI who had. The distortion was higher in females and BMI overweight.

Keywords. Nutritional status, body image perceived, adolescents, body mass index.

INTRODUCCIÓN

La adolescencia es una de las etapas cruciales durante el desarrollo del ser humano, tanto por las transformaciones biológicas como las psicológicas en las que incurre el individuo. La adolescencia es uno de los periodos de evolución más importante durante la vida del ser humano. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la adolescencia es el período de desarrollo y crecimiento del ser humano comprendido entre la niñez y la edad adulta. Esta abarca entre los 10 y 19 años e inicia con la pubertad ⁽¹⁾.

La Organización Panamericana de la Salud ha definido la adolescencia de manera amplia como un grupo de la población con edades s entre los 10 y

24 años ⁽²⁾. Se ha registrado cerca 232 millones de personas se encuentra en este rango de edad, representando alrededor del 25% de la población total del Continente Americano ⁽³⁾. Según datos de la Organización Nacional de Estadísticas (ONE) 2016, la población comprendida entre los 10-24 años corresponde al 28% del total de la población dominicana ⁽⁴⁾.

La adolescencia es una fase de conocimiento y descubrimiento de la identidad propia, así como también de autonomía individual ⁽⁵⁾. Durante esta etapa los individuos se enfrentan a cambios físicos que generan crisis y permutaciones en su comportamiento que contribuye a su desarrollo mental y social para su crecimiento ⁽⁶⁾. Esta serie de cambios llevan a la persona a la necesidad de obtener su integridad

psicológica y en coherencia al entorno social en el que se desenvuelve ⁽⁷⁾. De manera que el adolescente no solo busca conocerse y comprenderse a sí mismo, sino que también valora sus atributos. Esto le ayuda a conformar su autoestima y autoconcepto ⁽⁸⁾.

El autoconcepto en esta etapa se manifiesta por el uso de etiquetas que categorizan la imagen del propio individuo de manera interna, los cuales influyen en el desarrollo de trastornos psicosociales suscritos en gran medida con él índice de masa corporal ⁽⁹⁾.

De acuerdo con la revisión de la literatura, existen distintos factores que incurren en el estado nutricional de los individuos. Dentro de ellos se encuentran los hábitos alimenticios, que son una causa importante de la malnutrición y por ende pueden ocasionar trastornos como el sobrepeso, la obesidad y el bajo peso. Estos trastornos adquiridos durante la adolescencia pueden persistir en la vida adulta, e incrementar futuros riesgos de padecer enfermedades como la diabetes, hipertensión arterial, entre otras ⁽¹⁰⁾.

Siguiendo las líneas de la OMS, se realizó la encuesta mundial de salud a escolares (GSHS) en varios países del mundo. De los países encuestados en Latinoamérica, el que presentó mayor prevalencia en sobrepeso y obesidad

fue El Salvador con un 28.8% y 9.6% respectivamente ⁽¹¹⁾. Se encontró que tanto en Argentina, Bolivia y Perú tuvieron un índice de sobrepeso entre 19-22.5% y entre 2.6%-4.7% de obesidad ^(12, 13, 14). Se presentó mayor prevalencia de sobrepeso en el sexo femenino en Bolivia, por el contrario, Argentina que tenía mayor prevalencia en el sexo masculino (24% vs 14.1%) ^(13,14).

De acuerdo con los resultados arrojados por la Encuesta Demográfica y de Salud (ENDESA) 2013 en República Dominicana el sexo que posee un mayor porcentaje de sobrepeso y obesidad es el femenino con un 20%, mientras que en el masculino es de 13% ⁽¹⁵⁾.

Dicha información demuestra la probable insatisfacción que presenta este grupo etario con relación a su imagen corporal y por tanto un alto riesgo de padecer trastornos alimenticios, debido a la presión a la que se ven incurridos ciertos grupos de la población, como lo son las mujeres, debido a la imposición estética de vivir en extrema delgadez. Haciendo que la inquietud por la imagen corporal vaya más allá y afecte la salud, tanto física como mental del individuo ⁽¹⁶⁾.

La imagen corporal es la manera en cómo cada uno se imagina, percibe, siente y actúa referente a su cuerpo ⁽⁸⁾.

Esta genera preocupación dentro de las sociedades con estructuras consumistas de la actualidad. La insatisfacción de la imagen corporal es el desagrado de la persona ya sea con la forma global de su cuerpo o con solo algunas partes de éste ⁽¹⁷⁾. Esta se considera una conducta socialmente aprendida, tanto por fines estéticos como para adaptarse a un entorno o pertenecer a cierto grupo determinado. La valoración del cuerpo tiene gran importancia, en especial porque se han ido estableciendo parámetros estrictos de belleza, característicos de un cuerpo cada vez más inclinado hacia la delgadez, estos son aprobados y reforzados por la sociedad y los medios de comunicación ⁽⁸⁾.

Todo individuo que al estimar sus dimensiones corporales expresan valoraciones que no corresponden con las reales, presentan alguna modificación de la percepción de la imagen corporal ⁽¹⁸⁾. Un estudio realizado en Madrid en el 2010 reveló que en los adolescentes evaluados existe una evaluación inadecuada de su cuerpo, estos creen tener un IMC superior al que realmente poseen. El 28.6% de los varones se percibieron más gruesos de lo que estaban, frente al 50.2% de las chicas. El 46,2% de los varones están satisfechos con su imagen corporal, en comparación con el 37,4% de las chicas. En conclusión, los hombres presentaron una

distorsión más amplia de su propia imagen corporal, a pesar de esto, mostraron mayores niveles de satisfacción que las chicas con su físico ⁽¹⁹⁾.

Si una persona refiere devaluación de su apariencia y se preocupa excesivamente por su cuerpo, es indicativo de que no se siente satisfecha con su imagen corporal. También suelen ocultar su cuerpo, someterse a ejercicios y dietas extremas y sobre todo tratan de evitar las situaciones que puedan ser observadas y juzgadas por otros individuos ⁽²⁰⁾.

En el 2011 una investigación llevada a cabo en España en jóvenes universitarios encontró que el 63% de los hombres y el 55% de las mujeres tienen distorsionada la valoración de su imagen corporal con respecto a los valores reales del IMC, mostrando como resultado que los participantes de sexo masculino tienen a una subestimación de su peso, mientras que el sexo femenino suele verse más la sobreestimación del peso ⁽²¹⁾.

Por el momento no se encontraron estudios sobre la percepción de imagen corporal en la población de interés en la República Dominicana, por lo que es de suma importancia estudiar la distorsión de la imagen corporal, en especial en las poblaciones de riesgos con diferencias

en grupos de peso, componentes claves de la pregunta que guía esta investigación ¿cuál es la relación entre la percepción de imagen corporal y el estado nutricional de los estudiantes que asisten a los centros educativos de la provincia Santiago?

MÉTODOS

El proyecto de investigación corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal y de fuente primaria. La población estuvo constituida por 49,429 estudiantes entre 13 y 17 años del periodo escolar 2017-2018 de las zonas urbana y rural, así como las escuelas públicas y privadas, que corresponden a la Regional 08 de la provincia Santiago, República Dominicana.

Fue llevado a cabo un muestreo por conglomerado trietápico. En primer lugar, fueron seleccionadas las escuelas de acuerdo con la probabilidad proporcional al número de estudiantes que había en cursos relevantes para el estudio. En la segunda consistió en seleccionar un curso al azar de cada escuela y luego 10 estudiantes de manera aleatoria. La población estudiada fue la regional 08 de la provincia Santiago, Rep. Dom., conformada por los distritos del 01 al 07, en específico los estudiantes que cursan de 1ero a 4to de media, estos distritos están conformados por centros educativos públicos y privados. Luego de realizado el

cálculo se obtuvo una muestra de 53 centros educativos, con un total de 530 estudiantes a los que se les agregó un 20% por pérdidas, por lo que la muestra aumentó a 64 centros educativos compuestos por 640 estudiantes. Sin embargo, a pesar el número total, se recolectaron 62 escuelas de 64, debido a que en dos de ellas fue rechazada por parte de la directiva de la institución la aplicación de la encuesta.

Dentro de las variables estudiadas se encuentran las sociodemográficas conformadas por el sexo, edad, grado escolar, tipo de escuela, zona de residencia y religión. Las variables específicas para el estado nutricional se tomaron en cuenta la percepción de imagen corporal y el índice de masa corporal.

Criterios de inclusión:

1. Adolescentes entre 13 y 17 años, que asisten a los centros educativos de la provincia Santiago durante el periodo septiembre-noviembre 2017. Esto porque la mayor densidad poblacional de los estudiantes adolescente se encuentra entre estas edades, además la manera que se abordaría los estudiantes mayores de edad en cuanto a su participación en la investigación difiere en cuanto a su autorización.
2. Adolescentes con el consentimiento firmados de manera voluntaria por el

padre o tutor y consentimiento firmado por ellos mismos.

Criterios de exclusión:

1. Quedaron excluidas las adolescentes embarazadas que formaban parte del establecimiento educacional debido a los cambios que presenta una persona en gestación, ya que estos podrían modificar los resultados del estudio.
2. Estudiantes con algún tipo de discapacidad funcional que les imposibilitara el llenado anónimo del cuestionario.
3. Aquellos estudiantes que no completaron las preguntas de los datos generales (Características sociodemográficas) y la sección de estado nutricional del cuestionario.

Los investigadores diseñaron una encuesta compuesta por dos partes, un cuestionario A proporcionado por la Encuesta Mundial de Salud a Escolares (GSHS) y un cuestionario B elaborado por los investigadores. El cuestionario A se trata de una encuesta creada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en colaboración con UNICEF, UNESCO y UNAIDS. La GSHS es un proyecto de vigilancia colaborativa que ayuda a los países a medir y evaluar distintos factores en los comportamientos de salud en jóvenes, esta consiste en la aplicación de una

encuesta en las escuelas, a estudiantes de 13 a 17 años con el fin de identificar los factores de riesgo y factores protectores, relacionados con las principales causas de morbilidad entre niños y adultos a nivel mundial ⁽²²⁾. Esta provee la información necesaria para la generación de políticas saludables en favor de los escolares ⁽²³⁾. El cuestionario B fue elaborado con la utilización de otras encuestas y estudios, para ampliar y evaluar los objetivos de la investigación.

A lo largo de toda la investigación fueron respetados todos los principios éticos que expone el Informe Belmont. Con la finalidad de garantizar lo anterior expuesto, previo a su realización el proyecto fue sometido a una revisión y evaluado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud (COBE-FACS) de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra (PUCMM).

El proceso de recolección tuvo un periodo de duración de aproximadamente 7 semanas. Para su realización se eligieron al azar las escuelas y una vez en la institución, los investigadores solicitaron la lista de los cursos de secundaria a la dirección de cada institución educativa. El siguiente paso fue elegir el aula al azar, seguido de igual manera los participantes. Se procedió a entregar el consentimiento

informado, explicándoles que su participación en el estudio sería anónima, voluntaria y de que también su intimidad estaría protegida. Que este debía ser llevado a sus padres, firmado por estos y devueltos al día siguiente. Luego de obtenido este, se procedió entregar a los estudiantes el asentimiento, en el cual se les expuso en qué consistía la encuesta y la finalidad de esta.

Una vez verificado que tanto el consentimiento como el asentimiento estaban firmados, se procedió a medir y pesar a los participantes. El siguiente paso fue aplicar el cuestionario, una vez completado este, se le comunicó a cada estudiante su talla en centímetros y peso en kilogramos, para que este colocara los datos en el cuestionario. La percepción de imagen corporal se evaluó utilizando una tabla de siluetas corporal diseñada por Collins para adolescentes ⁽²⁴⁾. En el instrumento se les mostraron 2 figuras con 7 siluetas cada una, ordenadas en morfología desde desnutrición hasta obesidad. Se les pidió a los participantes que seleccionaran la silueta que creían más parecida a la suya. Inmediatamente completado el cuestionario estos debían colocar las encuestas dentro de una caja y estos volvieron a sus asientos correspondientes.

Para el análisis estadístico se realizaron contingencia para la comparación de prevalencias entre el sexo femenino y masculino. Debido a que las variables correspondientes son cualitativas, para el análisis de la relación existente entre estas se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrado. De forma que si se obtenía un valor $p \leq 0.05$, el resultado es estadísticamente significativo, llegando a la conclusión que ambas variables son dependientes y hay una relación existente entre ellas. La información recolectada mediante el instrumento fue ingresada, almacenada y manejada en una base de datos creada en Microsoft Excel 2013 y luego fue importada y analizada con el programa de paquete estadístico de IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22.0.

RESULTADOS

La encuesta fue aplicada a 620 estudiantes, donde se realizó un análisis con 602 estudiantes debido a que 18 no cumplieron con los criterios de inclusión de la presente investigación. La tasa de respuesta obtenida fue de 90.1% lo que indica que el 10% de los participantes rechazaron realizar la encuesta.

Con respecto al sexo y su relación con la percepción de la imagen se encontró que el sexo femenino un mayor porcentaje opuesto a lo

ocurrido en el masculino en cuanto a su percepción de un peso muy bajo, en donde las mujeres alcanzaron un 77.8% a diferencia de los hombres con tan solo un 22.2%. Asimismo, en referencia al bajo peso las féminas proyectaron un porcentaje mayor que los hombres con un 65.7% ante un 34.3%. En consideración a la percepción de peso normal nuevamente las mujeres encabezaron los porcentajes en comparación a los hombres con un 63.5% y 36.5% respectivamente. De igual forma, los hombres consiguieron los menores porcentajes en su percepción de sobrepeso con un 35.3% mientras que ninguno se percibió obeso. Evaluando la significancia se obtuvo un valor $p=0.303$, no mostrándose correlación de dichas variables en el estudio (ver tabla 1).

En la tabla 2 se presenta la relación entre el IMC y el sexo; se encontraron valores predominantes del sexo femenino sobre el masculino en todos los renglones, destacándose un 77.1 % de mujeres con sobrepeso ante un 22.9 % de hombres con esta condición. No obstante, los hombres se destacaron por tener muy bajo peso obteniendo un 42.5% comparado con el 57.5% referido por las mujeres. Recalcando que para esta sección se obtuvo un valor de $p=0.019$, siendo significativa la relación entre estas dos variables en el estudio.

Con relación al índice de masa corporal y la percepción de la imagen corporal se obtuvo que un 33.3% de los estudiantes con muy bajo peso se percibían normo peso, mientras que un 40.7% se percibía correctamente. De igual manera, un 61.9% de los encuestados con bajo peso se percibía con normo peso. Asimismo, se encontró que un 64.5% de los adolescentes normo pesos tienen una percepción adecuada de su estado nutricional, siendo estos detectados con un índice de masa corporal apropiado para su edad. Sin embargo, un 16.7% de los adolescentes con IMC normal sobreestimó su estado nutricional, considerándose con sobrepeso, mientras que un 2.2% de estos se consideró en muy bajo peso. Por otro lado, el 17.6% de los encuestados con sobrepeso se percibió normo peso y un 82.4% en obesidad. De igual modo, un 66.7% de los estudiantes obesos se considera obeso, estando correctos en su percepción. No obstante, un 33.3% se consideró con peso normal teniendo obesidad (ver tabla 3).

De los estudiantes con sobrepeso un 16.7% tiene una percepción errada de su estado nutricional considerando su IMC normal. Asimismo, un 9.8% de los adolescentes obesos subestiman su peso considerando su índice de masa corporal normal y un 82.4% considerándose únicamente en sobrepeso. Recalcando que para esta

sección se obtuvo un valor de $p < 0.001$, siendo muy significativa la relación entre estas dos variables para este estudio.

DISCUSIÓN

Debido a que la adolescencia es considerada un periodo de cambios y transformación, en esta etapa de la vida la imagen corporal tiende a ser un motivo de preocupación; mostrase con frecuencia en estos individuos, disociación entre la imagen percibida y estado nutricional real de cada uno ⁽²⁵⁾.

En este estudio se encontró que ningún estudiante masculino encuestado se percibió obeso, lo cual indica una percepción errónea, ya que un 3.15% se encontraba en obesidad, mostrando una tendencia a subestimación de su peso, sucediendo igual con los que se encontraban en sobrepeso. En cuanto al sexo femenino, solo un 0.52% se percibió en obesidad sin embargo el 6.47% se encontraba en obesidad, ocurriendo igual con las participantes en sobrepeso, observándose una prevalencia de subestimación de imagen corporal, al igual que el sexo masculino.

Olivia et al. ⁽²⁶⁾, quienes evidenciaron que el sexo masculino tiende a subestimar su peso corporal, mientras que las mujeres lo sobrestiman. Lo cual no coincide con los resultados

mostrados en este estudio, donde tanto hombre como mujeres subestimaron su estado nutricional.

Con relación al estado nutricional y sexo, se encontró un predominio en el sexo femenino de todas las categorías del estado nutricional. Con respecto a la obesidad el sexo femenino obtuvo un 57.2% mientras que el masculino un 32.8%, en relación con el sobrepeso siguiendo el mismo orden se obtuvo un 77.1% vs 22.9%.

Contrario a lo obtenido por un estudio realizado en Indonesia en el año 2007, en el que se encontró que el 1.3% de los estudiantes mostró obesidad, con un predominio del sexo masculino en comparación de un 1% en el sexo femenino, a pesar de que el 50.1% de los encuestados en Indonesia eran femeninas ⁽²⁷⁾. Cabe destacar que en el presente estudio la mayor parte de la población estudiada pertenece al sexo femenino y pudiendo influir en los resultados obtenidos.

La diferencia entre el IMC percibido por medio de las siluetas y el IMC real obtenido por antropometría fue mayor en los que se encontraban en malnutrición por exceso de peso en los que tenían déficit. Datos similares se mostraron en una investigación realizada por Borda et al. en la que la diferencia de IMC fue mayor en varones que en las hembras ⁽²⁸⁾.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede corroborar que las alteraciones en la percepción de la imagen pueden llevar a sobreestimaciones o subestimaciones de la realidad, las cuales en la mayoría de las veces posee un origen social e individual relacionándose directamente con el nivel de autoestima que presentan. A pesar de no obtenerse una alta prevalencia de malnutrición por exceso de peso en la presente investigación, es de importancia abordar los adolescentes, debido a que estos forman parte de un conjunto poblacional intermedio dentro de las poblaciones que poseen mayor riesgo de padecer obesidad. Además, de identificarla como una población con tendencias a presentar mayor insatisfacción con su cuerpo, debido a los cambios físicos propios de su desarrollo biológico. Esto puede desencadenar una serie de conductas restrictivas poco saludables a fin de solucionar el problema.

En vista de lo presentado anteriormente, es pertinente diseñar y aplicar estrategias dirigidas hacia esta población vulnerable y en desarrollo, que permita promover los cambios de estilos de vida por medio de dietas saludables y ejercicios físicos en busca de la mejora del estado nutricional de los adolescentes. También aunado a lo anteriormente expuesto, se deben integrar intervenciones psicológicas con la finalidad de fortalecer la

autoestima y que estos tengan una mejor percepción de su imagen corporal. De esta manera previniendo el desarrollo de trastornos de la conducta alimentaria que comprometa la salud de esta población.

En esta investigación la muestra estuvo conformada por más de 65% de participantes del sexo femenino, por lo que los resultados aquí expresados no pueden ser inferidos a la población total de adolescentes escolares de la ciudad de Santiago. Debido a esto se recomienda realizar futuras investigaciones que la muestra esté ponderada según el sexo.

CONCLUSIÓN

Englobando todos los aspectos tratados hasta el momento se puede afirmar que el 61% de los adolescentes participantes en este estudio tienen un IMC dentro de los parámetros adecuados para la edad correspondiente. Tanto el exceso como el déficit de peso predominan más en el sexo femenino que el masculino.

Cabe destacar que los adolescentes de ambos sexos se perciben con menor IMC del que realmente poseen. Resaltando que sexo femenino fue el que se percibió con exceso de peso en mayor cantidad.

A la hora de la evaluación nutricional es importante tomar en cuenta las ideas y prácticas realizadas por los adolescentes, no solo incorporar contenidos de tipo nutricional sino también incluir elementos de tipo psicológico donde actúan aspectos emocionales como los sentimientos y la autoestima que se manifiestan por el hecho de considerar tener una imagen corporal distinta a las estipuladas por la sociedad, lo que proporcionará una perspectiva más integral del individuo.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO Y CONFLICTO DE INTERESES

La presente investigación fue costeadada por el equipo investigador, compuesto por estudiantes de medicina de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra a cargo de esta. Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Health Organization, [Internet]. 2013. Fact sheet N° 334.
2. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Definición de adolescencia.
3. UNICEF. Estado Mundial de la Infancia. [Internet]; 2011.
4. Organización Nacional de Estadísticas (ONE), República Dominicana: Estimaciones y proyecciones nacionales de población 1950-2100. Tomo IV. Rev. 2016. [Internet]; 2016.
5. Mansilla M E. Etapas del desarrollo humano. Rev. de Investigación en Psicología [Internet]. 2000; 3(2). doi: 10.15381/rinvp.v3i2.4999
6. Borrás ST, et al. Adolescencia: definición, vulnerabilidad y oportunidad. CCM [Internet]. 2014; 18(1): 05-07.
7. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Estado mundial de la infancia 2011: La adolescencia una época de oportunidades. [Internet]. 2011.
8. Soto A, Cáceres K., Faure M., Gásquez M., Marengo L. Insatisfacción corporal, búsqueda de la delgadez y malnutrición por exceso, un estudio descriptivo correlacional en una población de estudiantes de 13 a 16 años de la ciudad de Valparaíso. Rev. chil. nutr. [Internet]. 2013; 40(1): 10-15. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000100001>.
9. García-Sánchez, Alejandro, Burgueño-Menjíbar, Rafael, López-Blanco, David, Ortega, Francisco B., Condición física, adiposidad y autoconcepto en adolescentes. Estudio piloto. Revista de Psicología del

- Deporte [Internet]. 2013; 22(2):453-461.
10. Zeberio N, Malpeli A, Apezteguia M, Carballo MA, González HF. El estado nutricional de niños escolares y su relación con la tensión arterial. Arch Argent Pediatr. [Internet]. 2013; 111(2): 92-7. doi: <http://dx.doi.org/10.5546/aap.2013.92>
 11. Mario S, Kann L, Kinchen S, Razeghi G, Contreras A. Global school-based student health survey El Salvador 2013. CDC, OMS [Internet]. 2013.
 12. Ocaña G, Nadalich JC. Global school-based student health survey Argentina 2007. CDC, World Health Organization [Internet]. 2007.
 13. Canelas GM. Global school-based student health survey via 2012. CDC, World Health Organization [Internet]. 2012.
 14. Tejada CA, García HA. Global school-based student health survey Peru 2010. CDC, World Health Organization [Internet]. 2010.
 15. Centro de Estudios Sociales y Demográficos. Encuesta demográfica y de salud república dominicana 2013. Coordinación con el Ministerio de Salud Pública [Internet]. 2013. 72(2):139-143.
 16. Unikel C., Saucedo T., Villatoro J & Fleiz C. Conductas alimentarias de riesgo y distribución del índice de masa corporal en estudiantes de 13 a 18 años. Salud Mental. 2002; Vol. 25 (2), 49-57.
 17. Gomez A., Sanchez B., Mahedero M. Insatisfacción y distorsión de la imagen corporal en adolescentes de doce a diecisiete años de edad. Ágora [Internet]; 15(1): 54-63.
 18. Sepúlveda AR, Gandarillas A, Carrobles JA. "Prevalencia de trastornos del comportamiento alimentario en la población universitaria." 5º Congreso Virtual de Psiquiatría, 2004.
 19. Gonzales M, André A, García E, López N, Mora A, Morrodán M. Asociación entre la actividad física y percepción de la imagen corporal en adolescentes madrileños. Rev Nutr Clin Diet [Internet]. 2010; 30 (3) 1-9.
 20. Gasco M., Briñol P. y Horcajo J. Cambio de actitudes hacia la imagen corporal: el efecto de la elaboración sobre la fuerza de las actitudes. Psicothema [Internet]. 2010.
 21. Miguéz M., De la Montaña J., González J., Gonzalez M. Concordancia entre la autopercepción de la imagen corporal y el estado nutricional en universitarios de Orense. Nutr

- Hosp. [Internet]. 2011; 26(3): 472-479.
22. Global school-based student health survey CDC, World Health Organization [Internet]. 2015.
23. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Clifton Road Atlanta: CDC. [Internet] 2016.
24. Collins M. Body figure perceptions and preferences among preadolescent children. *Int. J. Eat. Disord.* [Internet]; 10: 199-208.
25. Guadarrama R, Hernández J, López M. "How I perceive myself and how I would like to be): a study on body image of Mexican adolescents. *J Clin Psychol Adolescent Children.* 2018; (5)1: 37-43. doi: <https://doi.org/10.21134/rpcna.2018.05.1.5>
26. Oliva Y, Ordóñez M, Santana A, Marín A, Andueza G y Gómez I. Concordance of BMI and perception of body image in adolescents from a suburban area of Yucatan. *J Biomed.* 2016; 27(2): 49-60. doi: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i2.24>
27. Soerachman R. Global school-based student health survey (GSHS) Indonesia 2007. CDC World Health Organization [Internet]. 2007.
28. Borda Pérez M, Santos MA, Martínez Granados H, Meriño Díaz E, Sánchez Álvarez J, Solano Guerrero S. Percepción de la imagen corporal y su relación con el estado nutricional y emocional en escolares de 10 a 13 años de tres escuelas en Barranquilla (Colombia). *Salud, Barranquilla* [Internet]. 2016; 32(3): 472-482. doi: <http://dx.doi.org/10.14482/sun.32.3.9747>

Tabla 1. Percepción de imagen corporal según el sexo.

PERCEPCIÓN DE IMAGEN CORPORAL							
	Muy bajo peso	Bajo Peso	Normo peso	Sobrepeso	Obesidad	Total	Valor P
	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	
Sexo	N= 581						
Masculino	22.2 (6)	34.3 (46)	36.5 (146)	35.3 (6)	0.0 (0)	35.1 (204)	0.303
Femenino	77.8 (21)	65.7 (88)	63.5 (254)	64.7 (11)	100 (3)	64.9 (377)	
Total	100 (27)	100 (134)	100 (400)	100 (17)	100 (3)	100 (581)	

Fuente: Instrumento de recolección de la investigación: Factores Relacionados a los Comportamientos de Salud en Adolescentes que Asisten a Centros Educativos.

Tabla 2. Índice de masa corporal según el sexo.

ÍNDICE DE MASA CORPORAL							
	Muy bajo peso	Bajo peso	Normo peso	Sobre peso	obesidad	Total	Valor P
	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	
Sexo	N= 602						
Masculino	42.5 (17)	49.3 (33)	34.1 (125)	22.9 (16)	32.8 (19)	34.9 (210)	
Femenino	57.5 (23)	50.7 (34)	65.9 (242)	77.1 (54)	67.2 (39)	65.1 (392)	0.019
Total	100 (40)	100 (67)	100 (367)	100 (70)	100 (58)	100 (602)	

Fuente: Instrumento de recolección de la investigación: Factores Relacionados a los Comportamientos de Salud en Adolescentes que Asisten a Centros Educativos.

Tabla 3. Percepción de imagen corporal según el índice de masa corporal.

PERCEPCIÓN DE IMAGEN CORPORAL								
	Muy bajo peso	Bajo peso	Normo peso	Sobre peso	obesidad	Total	Valor P	
	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)		
Índice de masa corporal							N= 581	
Muy bajo peso	40.7 (11)	14.2 (19)	2.2 (9)	0.0 (0)	0.0 (0)	6.7 (39)		
Bajo peso	25.9 (7)	23.9 (32)	6.8 (27)	0.0 (0)	0.0 (0)	11.4 (66)		
Normo peso	33.3 (9)	61.9 (83)	64.5 (258)	17.6 (3)	33.3 (1)	60.9 (354)	< 0.001	
Sobrepeso	0.0 (0)	0.0 (0)	16.7 (67)	0.0 (0)	0.0 (0)	11.5 (67)		
Obesidad	0.0 (0)	0.0 (0)	9.8 (39)	82.4 (14)	66.7 (2)	9.5 (55)		
Total	100 (27)	100 (134)	100 (400)	100 (17)	100 (3)	100 (581)		

Fuente: Instrumento de recolección de la investigación: Factores Relacionados a los Comportamientos de Salud en Adolescentes que Asisten a Centros Educativos.

Artículo de Revisión

Bases fisiológicas de la microbiota intestinal

Ferreira E¹, Fernández O², López Fañas R²

¹Asistente de Profesor, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana. Contacto: elioferreira26@gmail.com

²Docente, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana.

RESUMEN

El ser humano cuenta con 100 trillones de microorganismos comensales en el tracto intestinal que han sido denominados como microbiota intestinal. Esta comunidad de microorganismos comensales se empieza a desarrollar justamente en el momento del nacimiento y se ve afectada por distintos factores, como el modo de parto, la lactancia materna, la exposición ambiental y el componente genético. La microbiota intestinal varía en número, especie y estabilidad en todo el trayecto del tracto gastrointestinal, siendo el colon la región más poblada. La microbiota intestinal se caracteriza por su gran espectro de funciones que promueven la homeostasis del organismo. Sus funciones van desde aumentar la integridad intestinal hasta inducir respuestas de hambre y saciedad. La microbiota intestinal tiene una gran función de defensa contra ciertos patógenos, función metabólica, inmunológica y neuromoduladora. Debido a esta fuerte asociación de la microbiota intestinal y estas diferentes funciones fisiológicas del organismo, es de esperarse que cualquier alteración de ella, pueda inducir a una enfermedad intestinal. Existe una nueva técnica llamada trasplante de microbiota fecal, que ha demostrado ser efectiva a la hora de tratar una alteración tanto de la composición, variedad como de la estabilidad de la microbiota, siendo su principal objetivo tratar enfermedades inflamatorias intestinales.

Palabras claves: microbiota, microbiota intestinal, inmunidad, metabolismo, disbiosis.

GENERALIDADES

La relación entre la microbiota y la salud del ser humano es un tema que ha ido creciendo en la última década. Está bien establecido que una microbiota saludable es responsable de muchas funciones que conllevan a la salud general del organismo. La microbiota intestinal específicamente, desempeña varias funciones en el organismo como metabolismo de nutrientes y drogas, mantenimiento de la barrera intestinal, inmunomodulación y protección contra patógenos. La microbiota varía en los diferentes estados de la vida y sufre cambios en respuesta a varios factores. Ésta se ha visto asociada a varias enfermedades como Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Síndrome de Intestino Irritable y enfermedades metabólicas como obesidad y diabetes. Incluso, se ha relacionado con alergias y problemas de neurodesarrollo¹.

Concepto

La palabra microbiota se refiere a la población de microorganismos que colonizan una región en particular del organismo e incluye bacteria, virus, fungus y protozoos¹. Otra definición también aceptada es que la microbiota es una comunidad ecológica de microorganismos tanto beneficiosos como patogénicos que viven en estrecha relación con el organismo y que de cierto modo se benefician de éste^{2,3}. La microbiota intestinal es específicamente aquellos microorganismos vivos que residen en el tubo digestivo. La microbiota residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas, incluso más que el suelo, el subsuelo y los océanos^{4,5}.

Otros autores usan el término microorganismos comensales para referirse

a la microbiota intestinal. La palabra comensales deriva del latín “*commensalis*” que significa “comer juntos” haciendo referencia a la gran función metabólica de la microbiota intestinal en la degradación de polisacáridos no digeribles en el intestino^{1,6}.

Composición

Se calcula que el ser humano tiene en su interior unas 2000 especies bacterianas diferentes. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los tres filos bacterianos predominantes en la microbiota intestinal son^{1,6}:

- *Firmicutes* (Abundancia relativa = 65%)
- *Bacteroidetes* (Abundancia relativa = 23%)
- *Actinobacteria* (Abundancia relativa = 5%)

La composición de la microbiota intestinal varía mucho en todo el trayecto del tracto gastrointestinal (*Figura 1*). En el esófago, con un pH de menos de 4, existen aproximadamente 10^1 bacterias/gramo, y las principales son *Bacteroides*, *Gemella*, *Megasphaera*, *Pseudomonas*, *Prevotella*. En el estómago, con un pH de 2, existen 10^2 bacterias/gramo y las principales son *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Enterococcus*, *Helicobacter pylori*. En el intestino delgado, con un pH de 5 a 7, existen aproximadamente 10^7 bacterias/gramo y las principales son *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *g-Proteobacteria*, *Enterococcus*. En el ciego, con un pH de 5.7, existen aproximadamente 10^9 bacterias/gramo y las principales son *Lachnospira*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Fecalibacterium*, *Fusobacteria*. Por último, y la región más importante debido a su gran carga bacteriana, es el colon, con un pH de 5 a 5.7 y las principales bacterias son

Bacteroides, Clostridium, Prevotella, Porphyromonas, Eubacterium, Ruminococcus, Streptococcus, Enterobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Peptostreptococcus, Fusobacteria^{7,8,9}.

MODIFICADORES

El desarrollo de la microbiota intestinal se da justamente después del parto. Debido al paso del bebé por el canal de parto, éste se ve expuesto a una población de microbios que conllevarán al desarrollo de la microbiota¹⁰. Esto se ha demostrado por estudios que demuestran que la mayoría de recién nacidos tienen una composición muy parecida a la de sus madres en los primeros días después del parto. La composición de la microbiota es relativamente simple en todo el intestino, pero varía mucho tanto con el individuo y con el tiempo. Se estima que de 1-3 años es lo necesario para que el lactante tenga una microbiota intestinal definida^{10,11}. De igual forma, se ha demostrado que existe un componente genético que hace más o menos predispuesto al individuo a adquirir unos microorganismos u otros.

Otros factores que contribuyen al origen de la microbiota son enfermedades de la vida temprana, uso de antibióticos y dieta. En el primer año de vida, la microbiota suele tener poca variabilidad y no es hasta los dos años donde ya la microbiota está desarrollada similar a la del un adulto¹².

Modo de parto

Estudios recientes han basado sus cultivos en la cuestionante de si el útero es estéril o no y han sugerido que hay microbios en la placenta^{13,14}, líquido amniótico¹⁵, membrana fetal, sangre del cordón umbilical¹⁶ y meconio¹⁷. Los estudios

sugieren que las muestras intrauterinas albergan ADN bacteriano, pero no necesariamente células bacterianas cultivables. La microbiota intestinal maternal podría transportarse al feto a través del torrente sanguíneo, una hipótesis respaldada por la detección de *Enterococcus faecium* marcado en el líquido amniótico y el meconio de ratones inoculados oralmente. Un estudio reciente también ha informado sobre la presencia de niveles bajos de biomasa bacteriana en la placenta humana y ha identificado una microbiota no patogénica similar a la de la cavidad oral (que incluyen miembros de *Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroides* y *Fusobacteria*), y los autores plantean la hipótesis de que la corriente sanguínea podría ser la vía para administrar las bacterias orales maternas al feto²³. El factor prenatal que influye de manera más directa en la composición y la variabilidad de la microbiota intestinal es el modo de parto y este puede tener dos modalidades: natural, es decir, por el canal vaginal y también por cesárea. Cabe destacar que cada una de estas contribuirá de manera diferente en la composición y variabilidad de la microbiota intestinal¹⁸.

Para comprender el primer inóculo bacteriano que reciben los recién nacidos con modo de parto vía vaginal, es importante caracterizar la microbiota vaginal materna. En mujeres no embarazadas, se han identificado al menos seis tipos de microbiota vaginal¹⁹, y se han definido cinco tipos de estado de comunidad bacteriana (CST)²⁰. Cuatro de estos CST se encuentran típicamente en mujeres asiáticas y blancas, y están dominados por especies de *Lactobacillus* (*L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners*

(CST III) y *L. jensenii* (CST V)). CST IV se observa a menudo en mujeres negras e hispanas, y se caracteriza por bajos niveles de *Lactobacillus spp.* y una mayor diversidad de diversas bacterias anaeróbicas²⁰.

La piel, el intestino y las cavidades orales así como las nasofaríngeas de los bebés que nacen por vía vaginal están inicialmente enriquecidos en *Lactobacillus spp.*, que se asemeja a la microbiota vaginal materna²¹. Por el contrario, la piel, la boca y el intestino de los niños que nacen por cesárea carecen de este inóculo y en su lugar son colonizados por la piel común y microbios ambientales como *Estafilococos*, *Streptococos* o *Propionibacteria*^{22,23}. La microbiota vaginal tiene una menor diversidad y una mayor estabilidad de la composición bacteriana durante el embarazo²⁴, y generalmente está dominada por especies de *Lactobacillus* tales como *L. crispatus* o *L. iners*²⁵. El enriquecimiento con *Lactobacillus spp.* durante el embarazo se ha confirmado en una cohorte de mujeres europeas, aunque también se han notificado casos de comunidades de *Lactobacillus* enriquecidas con bacterias anaeróbicas²⁶.

Antibióticos

El uso de medicamentos (específicamente antibióticos) en la vida temprana es un factor postnatal que afecta directamente la composición y variabilidad de la microbiota. Los antibióticos se administran selectivamente para dirigirse a una población patógena específica. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos producidos tienen un gran espectro de actividad, por lo que pueden usarse para tratar muchas enfermedades. Por lo tanto, aunque los antibióticos están diseñados para atacar organismos patógenos, los

miembros relacionados de la microbiota también se ven afectados^{27,28}.

En ausencia de antibióticos se mantiene una homeostasis intestinal. Los patrones moleculares asociados a los microorganismos (MAMPs, por sus siglas en inglés) de la microbiota son detectados intracelularmente y extracelularmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), específicamente por los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) y los receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos (NODs, por sus siglas en inglés). Estos educan a las células intestinales de Paneth a secretar péptidos antimicrobianos (AMP) así como mucina. La inmunoglobulina A (IgA) secretora y los AMP son importantes para controlar el número de bacterias y mantener la homeostasis epitelial. Las uniones estrechas y una capa espesa de moco evitan que los patógenos entrantes dañen la barrera de la mucosa.

En cambio, la presencia de antibióticos provoca una disrupción la homeostasis epitelial. Se pierden subconjuntos de la microbiota normal, lo que reduce la exposición epitelial a los MAMP derivados de la microbiota. Menos MAMP dan como resultado una disminución de la señalización de la microbiota del huésped, lo que conduce a una producción de AMP disminuida por células epiteliales intestinales. Algunos antibióticos causan adelgazamiento de la capa de moco e interrupción de las uniones estrechas, haciendo que el huésped sea más susceptible al daño a la barrera de la mucosa, causada por los patógenos entrantes. La pérdida de la

producción de AMP y de la integridad de la barrera de las células epiteliales facilita la invasión exitosa por patógenos entéricos²⁹.

Lactancia materna

La leche materna también puede contener hasta 10^7 células bacterianas/800ml de leche, incluidas bacterias como *Estafilococos*, *Streptococos*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que sirven como inóculo para el recién nacido, aunque el origen exacto de estas bacterias maternas aún no se ha detectado^{30,31}. Debido a este número alto de bacterias por mililitro en la leche materna se dice que esta aumenta tanto la variabilidad como la estabilidad en la vida temprana del bebé. Las principales bacterias que aporta la leche materna incluyen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Estreptococos*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los recién nacidos alimentados con leche materna se ha demostrado que tienen una población más estable y uniforme en comparación con los alimentados con fórmula³². Cantidades relativamente pequeñas de suplementación con fórmula de lactantes amamantados provocarán cambios desde un patrón amamantado a uno alimentado con fórmula.

Exposición ambiental

El ambiente que rodea al recién nacido también es una fuente natural de microbios que pueden colonizar diferentes sitios del cuerpo. Por ejemplo, la cohabitación aumenta la probabilidad de intercambio bacteriano mediante el uso de objetos compartidos, el contacto de superficies comunes y el aire interior³³. También, la sala de cirugía que es el primer lugar al cual el bebé es expuesto, cuenta con muchos microorganismos que se ocupan de

colonizarlo justamente en el momento del parto y de este modo aumentar la variabilidad y la estabilidad del bebé.

Una mayor exposición a endotoxinas en el polvo doméstico y un mayor número de integrantes en la familia también puede dar como resultado una floración de *Bifidobacterium* en lactantes y una menor abundancia de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Clostridium difficile* durante los primeros dos meses de vida

Componente genético

Aunque los microbiomas intestinales pueden diferir notablemente en la diversidad entre adultos, a menudo se observa que los miembros de la familia tienen microbiota más similares que las personas no relacionadas. Las similitudes familiares se suelen atribuir a influencias ambientales compartidas, como las preferencias dietéticas, un poderoso modelador de la composición del microbioma. Sin embargo, las personas relacionadas comparten un mayor grado de identidad genética, lo que plantea la posibilidad de que la composición genética compartida subyace a las similitudes familiares del microbioma³⁵. Por ejemplo, la tasa de concordancia para el transporte del metanógeno *Methanobrevibacter smithii* es mayor para los pares gemelos monocigotos (MZ) que dicigotos (DZ), y los estudios que comparan microbiota entre sujetos humanos que difieren en loci genéticos específicos han demostrado interacciones gen-microbiota³⁶. También, se ha visto que el filo *bacterioide* está directamente relacionado con la probabilidad de colonización debido a un componente genético, específicamente por

*Christensenellaceae*¹⁰. En un estudio de sesenta familias estadounidenses, se demostró que los miembros de la familia comparten una microbiota oral, intestinal y, en particular, más similar a la piel que los sujetos no relacionados. Además, se presume que el contacto frecuente con mascotas y animales a temprana edad ejerce un efecto protector en el bebé a través de una mayor exposición a los microbios que ayudan en el desarrollo de la tolerancia inmune³⁴.

TOLERANCIA

El sistema digestivo de los mamíferos cuenta con trillones de microorganismos que conviven en un estado dinámico. Estos microorganismos establecen una relación simbiótica con su hospedador, haciendo así más fácil la contribución al estado de salud general por parte del microorganismo hacia el hospedador. Esta asociación tan estrecha entre la microbiota y el intestino humano posee ciertos retos hacia la salud. El hecho de que existan trillones de microorganismos en los 200 M² de superficie intestinal representa un reto importante para el sistema inmune³⁷. Este sistema inmune tiene un rol esencial en limitar la invasión local por la microbiota y así prevenir cualquier interacción nociva. Los mecanismos por los cuales el sistema inmune logra esto son: inducción de la producción de péptidos antimicrobianos, lámina mucosa e IgA, que, a fin de cuentas, conllevarán a la neutralización, limitación y destrucción de ciertos microorganismos que pueden inducir un estado de disbiosis.

Lámina mucosa

Las células caliciformes son células

epiteliales especializadas que secretan glicoproteínas de mucina. Estas mucinas se organizan en una lámina parecida a un gel viscoso que se extiende hasta 150µm desde la superficie de la célula epitelial formando dos estratos. Debido a la presencia de la microbiota intestinal, los PRR son estimulados por los PAMPs, de este modo se activa por vía del TLR la señalización de la MyD88. Esta terminará activando la IκB kinasa (IKK), quien fosforilará al inhibidor de kappa B (IκB) y de ese modo se inhibe la inhibición del NFκB, induciéndose así el aumento de la producción de mucinas como: MUC2, MUC4, MUC13 y MC5B. La vía dependiente de NOD es a través de una kinasa de la proteína que interactúa con el receptor (RIPK, por sus siglas en inglés) que aumentará la expresión de IKK y permitirá la mayor expresión de NFκB como se mencionó anteriormente^{38,39}.

Esta mucina liberada hacia el lumen tiene la característica de que se organiza en dos estratos o láminas. Una lámina mucosa interna y otra externa, las cuales tienen características distintivas que conllevan a un mejor estado simbiótico. La lámina mucosa interna es una zona protegida donde no hay bacterias mientras que el estrato externo contiene muchas bacterias. El estrato interno es resistente a la penetración de bacterias para que no hagan contacto con las células epiteliales. También, la lámina mucosa interna tiene muchas enzimas hidrolíticas, y es más densa, todo lo contrario a la lámina mucosa externa, la cual no tiene tantas enzimas hidrolíticas y tiene un aspecto más gelatinoso. El principal componente es la MUC2 secretada por las células caliciformes⁴⁰. De este modo, la microbiota intestinal induce

la producción y secreción de mucina y por lo tanto limita el contacto bacteria-epitelio y así se ayuda a mantener el ambiente tolerogénico y, por tanto, la simbiosis.

Péptidos antimicrobianos como mecanismo de tolerancia

Un segundo mecanismo inmune que limita el contacto bacteria-epitelio es a través de la secreción de compuestos antimicrobianos por las células epiteliales. Estos pueden ser defensinas, catelicidinas o lectinas tipo C. La mayoría de estas proteínas destruyen a las bacterias a través de un ataque enzimático a la pared celular bacteriana o por la disrupción de su membrana bacteriana interna. Estos antimicrobianos son producidos por enterocitos, células caliciformes y células de Paneth. Este mecanismo también puede ser controlado por las mismas bacterias ya que sus PAMPs pueden activar los receptores TLR para que se exprese proteína derivada de islole generador 3 gamma (ReG3 γ , por sus siglas en inglés), el cual es un producto antimicrobiano y así poder aniquilar las bacterias. Este mecanismo es dependiente de receptor TLR. Otro mecanismo dependiente de NOD-2 es a través de la síntesis de derivados de las α -defensinas, criptidinas, las cuales tendrán acción directa para destruir las bacterias. El mecanismo más básico es a través de la secreción normal y constitutiva de α -defensinas por las células epiteliales.

Inmunoglobulina A

Un tercer mecanismo para la limitación de esta microbiota es a través de la producción de IgA. La IgA secretada limita la asociación de las bacterias con el epitelio intestinal y restringe la penetración de las bacterias con acción

simbiótica a través del epitelio intestinal. Esta IgA es producida por las células plasmáticas productoras de IgA. El mecanismo molecular de esta interacción se da en la superficie epitelial apical de los enterocitos.

Las células dendríticas (CD) de la lámina propia toman las bacterias que penetran en el epitelio a través del epitelio gracias a sus prolongaciones dendríticas. Después de captar las bacterias, estas CD migran a los nódulos linfáticos mesentéricos y a las placas de Peyer donde inducen la diferenciación de células productoras de IgA. Después, estas células se desplazan a la lámina propia y secretan IgA dimérica la cual sufre un proceso de transocitosis hacia la superficie de la célula epitelial intestinal donde se une a las bacterias y así limita su interacción con el epitelio intestinal y su posterior penetración al mismo.

También las CD de la playa de Peyer captan los antígenos bacterianos que sufrieron transocitosis por las células M y estas van a permitir el paso de célula B a célula B productora de IgA^{44,45}.

FUNCIONES

La microbiota intestinal cuenta con un repertorio de funciones que colaboran para mantener la homeostasis del organismo. Dentro de sus principales funciones, está la metabólica, en donde la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), tiene efectos sistémicos, intestinales e incluso hasta inmunológicos.

De igual manera, la microbiota intestinal tiene una amplia función en cuanto a la

defensa contra patógenos, esta función es gracias a su capacidad de inducir la producción de péptido antimicrobianos que actuarán sobre la superficie de la membrana de las bacterias aniquilándolas. Otro mecanismo para combatir los patógenos por parte de la microbiota es a través del mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal en donde un aumento de ciertas proteínas entre los enterocitos, impide el paso de patógenos desde el lumen hacia la sangre⁴⁶. La microbiota intestinal también se caracteriza por tener una amplia función inmunológica. Dentro de ésta, se encuentra la diferenciación de linfocitos T, el aumento de la respuesta inmune adaptativa intestinal, maduración de la placa de Peyer⁴⁷, aumento de maduración de receptores de células B y T, aumento de producción de IgA, entre otras.

Por último, la microbiota tiene un gran reconocido papel en el sistema nervioso central, en este rol están involucrados metabolitos intestinales que ya sea por su excitación o inhibición de ciertos receptores en ciertas neuronas se asocia a respuestas como el estrés, ansiedad, saciedad y hambre⁴⁶.

Defensa

Los dos mecanismos principales de la microbiota intestinal para combatir los patógenos son a través de los péptidos antimicrobianos y gracias al mantenimiento de la barrera intestinal^{48,49}.

Péptidos antimicrobianos

La comunidad de microbiota intestinal es capaz de producir un gran número de pequeñas moléculas ampliamente

bioactivas que actúan hacia otros miembros de la microbiota intestinal y/o hacia patógenos entéricos⁴⁹. Los AMP se definen como moléculas con 12-60 residuos de aminoácidos de bajo peso molecular (entre 0.7 y 9.0 kDa), con alta termoestabilidad, carga positiva y una elevada presencia de residuos hidrófobos⁵⁰. Estos se dividen en tres grupos principales: péptidos anfipáticos α -helicoidales, péptidos anfipáticos con lámina β y péptidos extendidos. La relación estructura-actividad (SAR) de los AMP es un determinante clave porque proporciona información sobre los mecanismos moleculares que regulan la actividad biológica de los AMP sobre los patógenos. Hasta ahora, se ha comprendido que la capacidad antimicrobiana de muchos péptidos depende de diferentes propiedades biofísicas que permiten la absorción, la penetración y la ruptura de las paredes celulares de los microorganismos.

Los péptidos α -helicoidales anfipáticos corresponden al grupo principal de AMP catiónicos. Este grupo tiene la propensión a crear plegamiento de hélice alfa. En ambientes membranosos aumenta su capacidad antimicrobiana promoviendo una aglomeración en la interfase lípido-péptido que ocurre a través de una intensa atracción electrostática con la cabeza aniónica de los fosfolípidos. Los miembros más representativos de este grupo son cecropinas, magaininas, catelicidinas y temporinas⁵¹.

Los péptidos de lámina β anfipáticos presentan varios dominios bien definidos de cadenas β , generalmente sin ningún dominio helicoidal. En este grupo, los

principales miembros representativos son β -hairpin y defensina. El contacto con membranas aniónicas promueve el plegamiento de péptidos en estructuras oligoméricas de barriletes peptídicos transmembranales, pero también puede producir agregados de láminas β en la superficie de membranas ricas en colesterol. Una gran parte de los AMP en este grupo son membranosos con mecanismos basados en la interacción iónica entre residuos de arginina catiónica y la membrana celular que conducen a la formación de poros toroidales. Sin embargo, la evidencia sugiere que ciertos péptidos de lámina β son capaces de atravesar la membrana celular y unirse al ADN, interfiriendo en las interacciones ADN-proteína.

Los péptidos extendidos tienen una conformación estructural definida por la presencia de arginina (Arg), triptófano (Trp), prolina (Pro), cisteína (Cys) e histidina (His) que da como resultado estructuras secundarias específicas. Histatinas, indolicidina, y PR-39 son miembros representativos de este grupo. En general, estos péptidos no son activos en la membrana celular, y su mecanismo antimicrobiano se atribuye a la interacción con proteínas intracelulares que podrían inhibir el proceso de replicación del ADN⁵². La acción de los AMP sobre los microbios invasores se produce debido a su capacidad de interacción con la membrana o su capacidad para alterar o inhibir los objetivos intracelulares. Entre los mecanismos de actividad membranolítica, los más citados son el modelo toroidal, el modelo de barril y el modelo de alfombra⁵³.

- **Modelo toroidal:** este modelo consiste

en distorsiones continuas en la bicapa lipídica causadas por la atracción electrostática que los péptidos catiónicos promueven sobre los grupos fosfato de las superficies de membrana externa e interna. La asociación entre los péptidos y los lípidos causa una pérdida parcial en la carga líquida positiva de los AMP que favorece la formación de los agregados peptídicos en el núcleo de la membrana, lo que provoca su ruptura y la consiguiente liberación de componentes intracelulares.

- **Modelo de barril:** En este caso, el poro transmembrana está formado por AMP extremadamente hidrofóbicos, como la zervamicina. Los péptidos interactúan a través de sus dominios hidrofóbicos dando como resultado la formación de una estructura de viga helicoidal, en la cual el lado hidrófilo está compuesto por el recubrimiento interno de poro, y el lado hidrófobo interactúa con el núcleo de acil de la membrana y logra estabilidad a través de fuerzas de van der Waals efectivas. Estos últimos se insertan profundamente en el núcleo de la membrana de acilo, promoviendo una mayor expansión de poros y la translocación de fosfolípidos para generar potencial electroquímico trans negativo⁵⁴.

- **Modelo de alfombra:** el modelo de alfombra consiste en la ruptura de la membrana celular debido a la acumulación de péptidos en su superficie. Los AMP catiónicos son adsorbidos por la membrana celular y permanecen enlazados electrostáticamente en diversos sitios a las cabezas de fosfolípidos aniónicos que forman una estructura de alfombra. Este mecanismo se basa en

propiedades de unión de tipo detergente, donde la interrupción de la membrana se produce a pesar de la formación de canales. El péptido Pln149a, la LL37 derivada de catelicidina humana y la Magainin-2amida sustituida con *Xenopus* alanina están implicadas en este proceso.

Integridad intestinal

Se ha demostrado que las bacterias y los probióticos comensales promueven la integridad de la barrera intestinal tanto in vitro como in vivo. El tratamiento de las células epiteliales con *Escherichia coli* conduce a una mayor expresión de la proteína zona de oclusión 2 (ZO2 por sus siglas en inglés). Del mismo modo, *Bifidobacterium infantis* conduce a un aumento en ZO1, ZO3. Esto también conduce a un aumento en ocludina y claudin-2. Se demostró que la administración de *L. plantarum* en el duodeno de voluntarios humanos sanos aumenta significativamente el ZO1 y la ocludina. *L. plantarum*, que conduce a una alta densidad de filamentos de actina en las regiones perijuncionales y las proteínas de unión estrecha (TJ, por sus siglas en inglés) están más estrechamente asociadas con el citoesqueleto^{55,56}.

Metabolismo

Se estima que el conjunto de genes de la microbiota intestinal (microbioma intestinal) es de aproximadamente tres millones de genes (150 veces más grande que el del genoma humano). Esta gran y diversa comunidad microbiana tiene un repertorio metabólico igualmente extenso que complementa la actividad de las enzimas de los mamíferos en el hígado y la mucosa intestinal⁵⁷. La microbiota intestinal contribuye de manera importante al

metabolismo humano al contribuir con enzimas que no están codificadas por el genoma humano, por ejemplo, la descomposición de polisacáridos, polifenoles y la síntesis de vitaminas. El metabolismo de carbohidratos no digeribles es la función metabólica más importante de la microbiota intestinal. Los principales productos metabólicos de la microbiota intestinal SCFA: butirato, acetato y propionato. Todos son producidos por la microbiota intestinal y juegan un papel muy importante en ciertas funciones homeostásicas. Estos tienen función tanto a nivel intestinal, inmunológicos y a nivel sistémico⁵⁷.

Producción de ácidos grasos de cadena corta

Todos son producidos por el metabolismo normal de la glucosa que viene de polifenoles y polisacáridos no digeribles⁵⁸. El producto final de la glucólisis, el piruvato, puede irse por tres vías metabólicas que conllevarán a la producción de uno de los tres SCFA.

El acetato como primer producto de la microbiota intestinal puede ser producido por una vía metabólica denominada Wood-Ljungdahl, la cual a su vez tiene dos ramas, una rama en la cual el CO₂ formado se reducirá a CO y éste se unirá a la acetil coenzima A (Acetil-CoA) para formar finalmente acetato. La otra vía es que el CO₂ pasa a formato y el formato pasa a formil tetrahidrolato (formil-H4F) y tienen como intermediario al metil H4F que finalmente dará como producto final el acetato⁵⁹.

El butirato se produce por la vía clásica del butirato en donde el Acetil-CoA se condensa con otro Acetil-CoA para

formar una molécula intermediaria que es el hidroxibutiril-CoA, el cual pasará a butiril-fosfato y finalmente a butirato.

Por último, el propionato puede ser producido por tres vías distintas. La primera es la vía del acrilato en donde el principal precursor es el lactato que pasa a lactoil-CoA como intermediario y finalmente a propionato. Otra vía es la vía del succinato donde el principal sustrato es el succinato y en presencia de un intermediario como el metilmalonil-CoA dará como resultado final el propionato. La última vía para la producción de propionato es la vía del propanediol en donde la fucosa y la romanosa sirven de sustrato, las cuales pasan al intermediario propionaldeído y finalmente propionato^{60,61}.

Efectos de los ácidos grasos de cadena corta

Estos SCFA tendrán muchos efectos sistémicos y locales. Puede afectar el sistema inmune, el apetito, el componente óseo, la secreción de insulina, el hígado, el sistema nervioso central (SNC) y el tejido adiposo. Los receptores de ácidos grasos libres (FFAR) detectan los ácidos grasos libres. Hay dos tipos: GPR43/FFAR2 y GPR41/FFAR3⁶². El GPR43/FFAR2 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) con acoplamiento doble $G_{i/o}$ y G_q , pero estudios recientes han demostrado que las funciones están principalmente mediadas por $G_{i/o}$. La única excepción es el intestino, donde GPR43 está acoplado a G_q , promoviendo la secreción de GLP-1 en las células L, el cual disminuye el tránsito intestinal junto al péptido YY. El GPR41/FFAR3 se acopla solo a G_i y se activa en la orden de afinidad propionato>butirato>>acetato. El

propionato entra por un cotransporte con sodio y promueve la gluconeogénesis intestinal^{50,60,61}.

El butirato es un potente inhibidor de la histona deacetilasa las cuales son un tipo de enzimas implicadas en la eliminación de grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas. En general, la acetilación está ligada a la activación de transcripción de genes, mientras que la desacetilación está ligada a la inactivación transcripcional, por lo tanto, una inhibición de las histonas deacetilasa permite una transcripción de genes y de este modo protege contra el cáncer colorectal y la inflamación.

También el butirato es la mayor fuente de energía para el enterocito y este se une al receptor GPR109A el cual estimula la producción de IL-18 que tendrá un efecto antiinflamatorio y anticancerígeno.

Rol Inmunológico

La función inmunológica de la microbiota intestinal es bien extensa y abarca funciones como diferenciación de células T, maduración de placas de Peyer, maduración de células inmunes, y aumenta la respuesta adaptativa intestinal.

Respuesta adaptativa intestinal

La respuesta inmune adaptativa intestinal puede iniciarse en las placas de Peyer o en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN). Las bacterias pueden ser captadas por las CD de la lámina propia y de la placa de Peyer por un mecanismo de transcitosis. También pueden ser captadas por las prolongaciones dendríticas de las células que expresan receptores de quimiocina tipo 1 (CXCR1⁺, por sus siglas

en inglés). Esto promueve la posterior presentación antigénica en la placa de Peyer a células T, quienes una vez activadas dejan estos tejidos linfoides y se dirigen a la lámina propia a través del torrente sanguíneo.

Diferenciación de células T

Las células dendríticas CD103⁺ están condicionadas por factores derivados del epitelio y de la microbiota intestinal. Dentro de estos factores se encuentran la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y ácido retinoico, también está influenciado por el lipopolisacárido A (PSA) de *B. fragilis*. Esta influencia permite que aparte de adquirir una naturaleza tolerogénica, pueda inducir a las Treg⁺ FOXP3, las cuales producen IL-10 para inducir tolerancia. Un grupo de bacterias llamadas Bacterias filamentosas segmentadas (SFB, por sus siglas en inglés) también pueden provocar un efecto en la inmunidad y es que promueven la diferenciación de TH17 y TH1. Estas bacterias SFB y sus productos como adenosín trifosfato (ATP) y proteína sérica amiloide A promueve que las células dendríticas inflamatorias puedan secretar IL-1, IL-6, IL-23 para aumentar la inducción de TH17. También permite la secreción de IL-12 y así aumenta la inducción de TH1. Las cuales (TH17 y TH1) mantienen la integridad de la barrera intestinal y aumentan la activación de macrófagos y neutrófilos para eliminar bacterias que penetren.

Otros efectos

Aparte del aumento de la respuesta adaptativa intestinal y de aumentar la diferenciación de células T por parte de la microbiota intestinal, ésta también tiene

otros efectos, una de estos es la maduración de la placa de Peyer, producción y secreción de mucina, diferenciación de células B en células B productoras de inmunoglobulinas, maduración de receptores de células B y células T, aumento de la secreción de péptidos antimicrobianos, etc.

Neuromodulación

El eje del intestino-cerebro, un sistema de comunicación neurohumoral bidireccional, es importante para mantener la homeostasis y está regulado a través del sistema nervioso central y entérico y las vías neuronal, endocrina, inmune y metabólica. Mientras que el término "eje microbioma-intestino-cerebro" incluye explícitamente el papel de la flora intestinal en los eventos de señalización bioquímica que tener lugar entre el tracto gastrointestinal y el SNC. Las vías neurales, inmunológicas, endocrinas y metabólicas por las que la microbiota influye en el cerebro, y el componente propuesto de cerebro a microbiota de este eje⁶³.

Los mecanismos putativos por los que las bacterias acceden al cerebro e influyen en el comportamiento incluyen productos bacterianos que obtienen acceso al cerebro a través del torrente sanguíneo y el área postrema, a través de la liberación de citosinas de las células inmunes de la mucosa, mediante la liberación de hormonas intestinales como 5-hidroxitriptamina (5-HT) de células enteroendocrinas, o vías aferentes neuronales, incluido el nervio vago. El estrés y las emociones pueden influir a través de la liberación de hormonas del estrés o neurotransmisores simpáticos que influyen en la fisiología intestinal y alteran

el hábitat de la microbiota. Alternativamente, las hormonas del estrés del huésped, como la noradrenalina, pueden influir en la expresión génica bacteriana o la señalización entre bacterias, y esto podría cambiar la composición microbiana y la actividad de la microbiota⁶⁴.

Comportamiento

Recientemente se ha demostrado el papel que tiene la microbiota intestinal en el comportamiento, cognición, lenguaje y memoria. Gran parte de esto se debe al metabolismo del triptófano. A parte del 90% de producción intestinal de serotonina, existen bacterias específicas que producen serotonina. También la microbiota intestinal tiene la enzima triptófano sintasa la cual aumenta el triptófano. Entre ellas se encuentran *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* y *Morganella morganii*. El triptófano por una enzima conocida como triptófano hidroxilasa pasará a 5-hidroxitriptófano y después a serotonina por una descarboxilasa amínica. Pero también el triptófano, fisiológicamente, puede pasar a kynurina por dos enzimas principales: triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO) e indolamina 2-3 dioxigenasa.

Esta kynurina puede metabolizarse por dos vías. Una lleva a la producción de Ácido Kinúrico (KYN, por sus siglas en inglés) (neuroprotector y antagonista de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y el receptor de N-metil D-aspartato (NMDA)) y el ácido quinolínico (neurotóxico, agonista del receptor NMDA). El KYN tiene actividad neuroactiva y disminuye la excitación neuronal, es antagonista de los receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolpropiónico (AMPA, por sus siglas en inglés), NMDA y kainato⁶⁵. El ácido quinolínico es un agonista de NMDA y tiene un gran efecto neurotóxico que conlleva a problemas neurodegenerativos, este conlleva a defectos del citoesqueleto, vacuolización y muerte celular. Este provoca que la red neuronal de los astrocitos y la microglia sufran apoptosis y así disminuye la expresión de factores neurotróficos y llevando a síntomas depresivos.

Apetito

La vida de todo ser vivo está dominada por la constante necesidad de comer que se traduce a hambre y el hecho de no estarlo, saciedad. La microbiota intestinal como se explicó anteriormente, es responsable de brindarle algunos nutrientes al organismo. Por esto, la microbiota intestinal influye directamente con las vías moleculares que controlan el balance energético del huésped. En el cerebro, las vías del apetito se organizan alrededor de los órganos circunventriculares, como el núcleo arcuato hipotalámico que es directamente accesible a los factores circulantes y los centros aferentes de los nervios craneales, como el núcleo del tracto solitario (NTS), que recibe la entrada vagal.

De forma similar a las rutas moleculares que regulan el metabolismo energético en el huésped, la microbiota intestinal también está sujeta a modificaciones tanto a corto como a largo plazo. Los cambios diarios a corto plazo incluyen fluctuaciones en el número de bacterias, mientras que los cambios a largo plazo se refieren principalmente a la composición de la microbiota. Estos cambios del número de la microbiota intestinal a corto plazo y de su

composición a largo plazo se denomina ciclo de vida bacteriano. Dependiendo de la rapidez y lentitud de estos cambios, se verá afectado el apetito o la saciedad del huésped.

El ciclo de vida bacteriano se puede dividir en dos grandes fases: Una primera fase exponencial y una segunda fase estacionaria. Fase de crecimiento exponencial es la fase de rápido aumento en el número de células, donde cada nueva célula se divide aún más. La duración de la fase de crecimiento exponencial de una población bacteriana depende del número inicial de bacterias, ya que la división celular se detiene una vez que el número de células alcanza un umbral específico. Fase de crecimiento estacionario es cuando hay mantenimiento del tamaño de una población por equilibrio entre células que se dividen y lisis. La duración de la fase estacionaria en condiciones *in vitro* depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes. En las vísceras, la fase estacionaria se acorta por factores de lisis bacteriana regulados por el huésped. Lo interesante de esto es que, tanto la fase exponencial como la estacionaria coinciden con las fases prandiales y postprandiales del huésped. Las moléculas derivadas de bacterias producidas durante la fase estacionaria pueden indicar un equilibrio de energía al huésped, que se convierte en una sensación de saciedad.

Por el contrario, una fase de declive de la población de bacterias intestinales podría ir acompañada de una disminución de tales señales estacionarias relacionadas con la fase, que el huésped percibe como un déficit de energía y una sensación de hambre. Para influir directamente en este circuito

neuronal, los componentes bacterianos deberían estar presentes en la circulación, donde podrían reflejar la abundancia relativa de una población de bacterias intestinales. Las asociaciones causales entre los fenotipos metabólicos de la energía del huésped y la composición de la microbiota intestinal, incluida su estabilidad a largo plazo, apuntan a la existencia de enlaces moleculares entre las bacterias intestinales y la red hipotalámica. Los lipopolisacáridos son probablemente el único fragmento bacteriano que se ha estudiado relativamente bien con respecto a sus efectos sistémicos.

Otros productos del metabolismo bacteriano incluyen ATP y lactato. Además de su papel clave como sustrato energético, el ATP circulante también podría indicar el estado del balance energético⁶⁶. El catabolismo de todos los macronutrientes produce una mayor producción de ATP, mientras que el anabolismo consume ATP y da como resultado un aumento relativo del AMP. Los receptores de ATP están presentes en las células nerviosas, incluidas las neuronas liberadoras del neuropéptido Y/péptido relacionado a agutí (NPY/AgRP, por sus siglas en inglés). El lactato, el sustrato preferido para las neuronas, se produce abundantemente en el intestino por *Lactobacilli*, y también por *Enterobacteriaceae* y *Bifidobacteria*, a partir de carbohidratos fermentables.

Los niveles de lactato se incrementan posprandialmente en la sangre portal, mientras que la infusión portal de lactato reduce el tamaño de la comida, apoyando así un papel para el lactato derivado del intestino en la saciedad. Estos resultados, junto con la activación del homólogo de la proteína caseinolítica peptidasa B (ClpB, por sus siglas en inglés) de las neuronas

productoras de proopiomelanocortina (POMC, por sus siglas en inglés) del núcleo arcuato (nARC), apoyan un enlace humoral mediado por ClpB entre la microbiota intestinal y el circuito hipotalámico neuro-peptidérgico. Además, las proteínas de *E. coli* en la fase estacionaria rica en ClpB aumentaron c-Fos en las neuronas ARC POMC, del núcleo ventromedial (nVMN) y el núcleo central de la amígdala (CeA), demostrando la activación de los centros sensoriales e integradores de los circuitos anorexígenos en el cerebro.

La IgG en circulación podría proteger a las hormonas peptídicas altamente inestables de la degradación al funcionar como un portador peptídico. Tal papel se ha demostrado para la IgG reactiva a la ghrelina, que ha aumentado ligeramente la afinidad micromolar por la ghrelina en individuos con obesidad, mejorando así los efectos orexígenos de la ghrelina⁶⁷.

El PYY secretado por células enteroendocrinas, irá al núcleo arcuato donde inhibirá las hormonas NPY y de AgRP por lo tanto inhibe las señales del núcleo arcuato. También el GLP1 secretado aumentará la secreción de insulina del páncreas la cual tendrá efecto directo en la inhibición de ghrelina y, por lo tanto, de esta manera se inhibe indirectamente las señales orexígenas⁶⁶. El ClpB de *E. coli* es un péptido parecido a la hormona estimulante de melanocitos alfa (MSH- α , por sus siglas en inglés) el cual estimulará el NTS para aumentar las señales anorexígenas⁶⁶.

PERSPECTIVA FUTURA

El trasplante de microbiota fecal (TMF) es una nueva opción terapéutica donde heces procesadas de donadores sanos son

trasplantadas en el tracto gastrointestinal de una persona a la cual se le quiere reestablecer o restaurar su composición de microbiota intestinal debido a una enfermedad. Se ha demostrado que el TMF es una de las terapias estándares para la infección por *Clostridium difficile*. Esta ha demostrado una tasa de mejoría de 70- 94% en cuestión de 3-4 post-transplante⁶⁸.

El TMF está considerado como un tratamiento para la enfermedad inflamatoria intestinal e incluso se considera como una droga en algunos países. Existen protocolos detallados de administración de TMF que establecen el proceso correcto de esta técnica. El marco estructural de TMF se divide en tres secciones: reclutamiento del donador, procesamiento del material donado y la aplicación clínica⁶⁸. Por último, existen ciertos criterios de inclusión y exclusión tanto para ser donador como beneficiario de esta técnica. El TMF es una técnica relativamente nueva que se ha estado empleando en los últimos tiempos y que verdaderamente tiene una visión futura a la hora de tratar enfermedades inflamatorias intestinales⁶⁸.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sai Manasa J. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 2015 August; 21(29).
2. Elizabeth T, Nathalie J. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. 2017 May; 474(11).
3. Ann M O, Fergus S. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 2006 April; 7(7).
4. M E IC. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 2013 April; 78(4).
5. Ruiz Álvarez V, Puig Peñal Y,

- Rodríguez Acosta M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2010 July; 29(3).
6. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2009 July; 90(3).
 7. Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015 March; 15(10).
 8. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*. 2014; 32(8).
 9. Moya A, Ferrer M. Functional Redundancy- Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends in Microbiology*. 2016; 24(5).
 10. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine*. 2016; 22(7).
 11. Clemente J, Ursell L, Parfrey L, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012; 148(6).
 12. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery IB. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*. 2017; 5(1).
 13. Satokari R, Grönroos T, Laitinen K, Salminen S. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*. 2009; 48(1).
 14. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*. 2014; 6(237).
 15. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS ONE*. 2008; 3(8).
 16. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nuño-Palop C. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Current Microbiology*. 2005; 51(4).
 17. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*. 2008; 159(3).
 18. Neu J, Rushing J. Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clinics in Perinatology*. 2011; 38(2).
 19. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 208(1).
 20. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non- pregnant women. *Microbiome*. 2014; 2(1).
 21. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. 2010; 107(29).
 22. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. 2015; 17(5).
 23. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature Medicine*. 2016; 22(3).
 24. Walther-Antônio MRS, Jeraldo P, Berg Miller ME, Yeoman CJ, Nelson KE. Pregnancy's Stronghold on the Vaginal Microbiome. *PLoS ONE*. 2014; 9(6).

25. Goplerud CP, Ohm MJ, Galask RP. Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1976; 126(7).
26. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Scientific Reports*. 2015; 5(1).
27. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS ONE*. 2010; 5(3).
28. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*. 2007; 1(1).
29. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*. 2011; 9(4).
30. Martín R, Langa S, Reviriego C. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 2003; 143(6).
31. Heikkila MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 95(3).
32. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*. 2011; 17(6).
33. Flores GE, Caporaso JG, Henley JB, Rideout JR, Domogala D. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biology*. 2014; 15(12).
34. Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*. 2013; 2.
35. Goodrich J, Waters J, Poole A, Sutter J. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*. 2014; 159(4).
36. Hansen AK, Krych Ł, Nielsen DS, Hansen CHF. A Review of Applied Aspects of Dealing with Gut Microbiota Impact on Rodent Models. 2015; 56(2).
37. Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA, Humphrey G. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*. 2013; 2.
38. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009; 9(5).
39. Yan F, Polk DB. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes*. 2012; 3(1).
40. Lindén SK, Florin THJ, McGuckin MA. Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection. *PLoS ONE*. 2008; 3(12).
41. Pütsep K, Axelsson LG, Boman A, Pütsep K, et al. Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric pro-defensins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(51).
42. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(8).
43. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(52).
44. Macpherson AJ. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science*.

- 2004; 303(5664).
45. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. 2003; 3(1).
 46. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11(4).
 47. Mebius RE. Erratum: Organogenesis of lymphoid tissues. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3(4).
 48. Lievin-Le Moal V, Servin AL. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(2).
 49. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*. 2013; 14(7).
 50. Ostaff MJ, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine*. 2013; 5(10).
 51. Giangaspero A, Sandri L, Tossi A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*. 2001; 268(21).
 52. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. 2011; 29(9).
 53. Yeaman MR. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*. 2003; 55(1).
 54. Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*. 2012; 51(2).
 55. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 49, pp. 35179–35185, 1999. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(49).
 56. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation*. 2005; 85(9).
 57. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*. 2017; 57(1).
 58. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 2014; 12(10).
 59. Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2008; 1784(12).
 60. Hetzel M, Brock M, Selmer T, Pierik AJ. Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. *European Journal of Biochemistry*. 2003; 270(5).
 61. Scott KP, Martin JC, Campbell G, Mayer CD. Whole-Genome Transcription Profiling Reveals Genes Up-Regulated by Growth on Fucose in the Human Gut Bacterium "Roseburia inulinivorans". *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(12).
 62. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM. The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 278(13).
 63. Sampson T, Mazmanian S. Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 2015; 17(5).
 64. Foster JA. Gut Microbiome and Behavior. *International Review of Neurobiology*. 2016.
 65. O'Mahony SM, Clarke G, Y.E B, T.G D, J.F. C. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*. 2015; 277.
 66. Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth

- to animal feeding behaviour. *Nature Reviews Endocrinology* 2016; 13 (1)
67. Core RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience* 2005; 8(5)
68. Jørgensen S, Hansen M, Erikstrup C, Dahlerup J, Hvas C. Faecal microbiota transplantation. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2017;29 (11):e36-e45

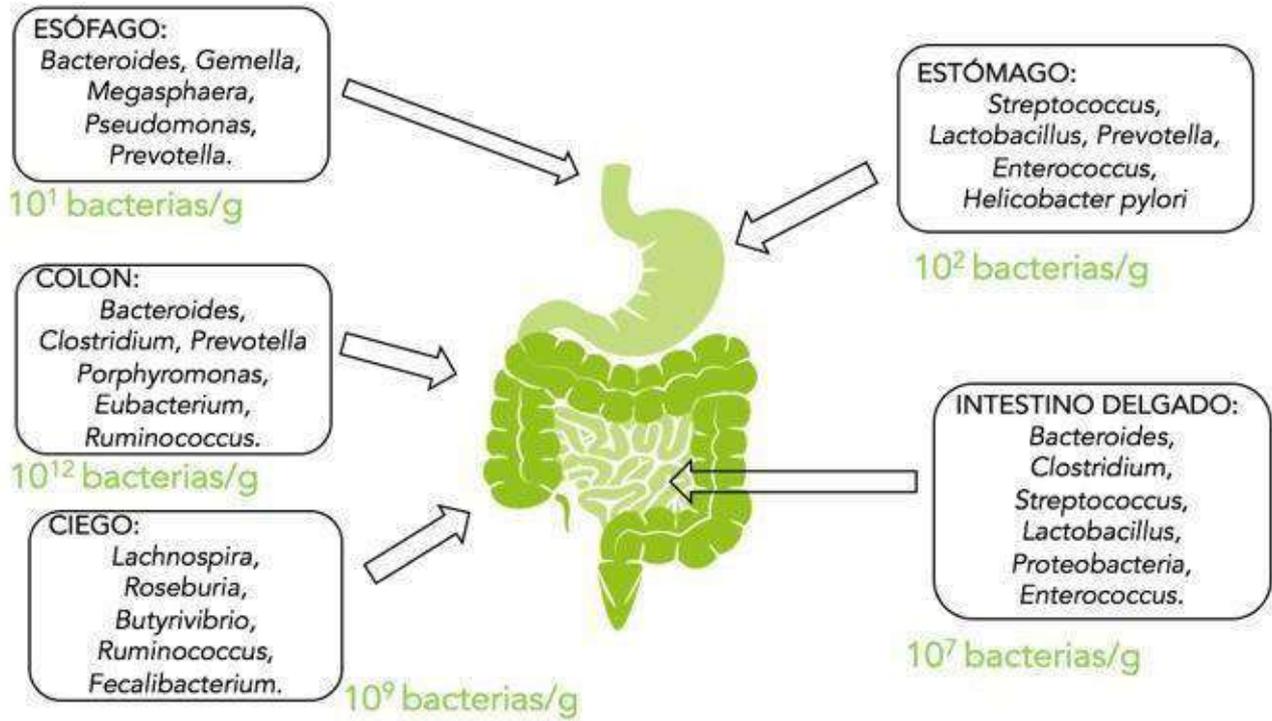


Figura I. Distribución normal de los diferentes microorganismos en el trayecto del tracto gastrointestinal. En todo el trayecto del tracto gastrointestinal la composición y variedad cambia drásticamente desde el esófago hasta el colon. En el esófago las principales bacterias son *Bacteroides* y *Gemella*. En el estómago las principales son *Streptococcus* y *Lactobacillus*. En el intestino predominan *Bacteroides*, *Clostridium* y *Proteobacteria*.

Artículo de Revisión

Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Gram Positivas

Fiallo Souffront PM¹, López Fañas R¹, Bisonó García B², Madera Durán OA³.

¹Docente, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana. Contacto:

p.fiallo@ce.pucmm.edu.do

²Médico Residente, St Barnabas Health System, Nueva York, Estados Unidos.

³Médico Residente, Hospital Metropolitano de Santiago, Santiago, República Dominicana.

RESUMEN

Las bacterias son microorganismos procariotas muy variados que se clasifican dependiendo de varias de sus características, pero principalmente por su coloración de tinción Gram, según la que pueden ser clasificados en Gram positivos y Gram negativos. Los Gram positivos tienen una conformación estructural que les confiere la habilidad de absorber la tinción Gram, lo que permite que se observe azul al microscopio. Estas bacterias a lo largo de la evolución han desarrollado diversos mecanismos de defensa que pueden ser tanto intrínsecos como adquiridos, importantes al momento de evaluar resistencia a productos farmacológicos y a factores propios del huésped, permitiéndoles permanecer por un periodo más prolongado dentro del organismo del hospedador. De manera intrínseca, las bacterias Gram positivas pueden protegerse mediante la activación de bombas de eflujo, de proteínas extracelulares y haciendo cambios estructurales de su membrana y citoplasma. Por otro lado, pueden adquirir resistencia por 3 mecanismos principales, transformación, conjugación y transducción, llevando a modificaciones de componentes específicos de la bacteria, donde se unirán los antibacterianos. La resistencia bacteriana es uno de los desafíos más importantes para medicina hoy en día, dificultando el tratamiento preciso y oportuno para infecciones comunes y provocando un incremento en las tasas de morbi-mortalidad.

Palabras clave: Bacterias, Bacterias Grampositivas, Resistencia a medicamentos, Antibacterianos

ABSTRACT

Bacteria are very varied prokaryotic microorganisms that are classified regarding several of their characteristics, but mainly because of their capacity for Gram staining. According to this, they can be classified into Gram-positive and Gram-negative. Gram-positives have a structural conformation that gives them the ability to absorb Gram stain, which allows them to be observed blue under a microscope. These bacteria throughout evolution have developed various defense mechanisms that can be both intrinsic and acquired providing protection to pharmacological products and host specific factors, allowing them to remain for a longer period in the host organism. Intrinsically, Gram-positive bacteria can be protected by activating efflux pumps, extracellular proteins and making

structural changes to their membrane and cytoplasm. On the other hand, they can acquire their resistance by 3 main mechanisms, transformation, conjugation and transduction, leading to modifications of specific components of the bacteria, where the antibiotic will bind to. Bacterial resistance is one of the most important challenges for medicine today, making it difficult to treat common infections and causing an increase in morbidity and mortality rates.

Keywords: Bacteria, Gram-positive bacterias, Drug resistance, Anti-bacterial agents

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son consideradas los seres vivos más antiguos en la Tierra, sin embargo, es controversial el momento en que se origina la resistencia a productos antibacterianos por las bacterias. El inicio de la resistencia se remonta de 2 Gigas de años a 4 millones de años (1). La resistencia bacteriana, especialmente a productos farmacológicos, es uno de los desafíos más importantes para medicina hoy en día y desde hace años invierte grandes esfuerzos en disminuir la prevalencia de esta.

Desde el descubrimiento de las sulfonamidas en el año 1937 por Domagz (2), la utilización de la penicilina en el año 1940 por Fleming y años más tarde el descubrimiento de la estreptomicina, vancomicina y demás antibióticos, se fue observando que a pesar de la utilización de los mismos, infecciones que en un principio cedían al tratamiento antimicrobiano ya no eran capaz de ser curadas con tratamientos habituales y el microorganismo continuaba causando infección. La

evolución de la resistencia microbiana ha sido tal que el problema ha trascendido el mundo de la medicina y se ha convertido en un problema económico, principalmente para la industria hospitalaria. Se estima una pérdida económica de aproximadamente 20 billones de dólares al año y un impacto de aproximadamente 23,000 muertes por causa de un microorganismo resistente a antibióticos en los estados unidos (1).

CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Las bacterias son microorganismos procariotas de pequeño tamaño con vida independiente y disposición interna simple. Si se compara con la célula eucariota, carecen de organelos definidos; sin embargo, su estructura exterior es bastante compleja (3). Estas células procariotas poseen una característica especial que no se encuentra en otros microorganismos: pared celular. La función de la pared celular trasciende más allá de delimitar la forma de la célula, ya que se encarga de protegerla frente a

perturbaciones físicas y químicas, al mismo tiempo que facilita la obtención de nutrientes y eliminación de productos de desecho (4,5).

Tradicionalmente, uno de los principales métodos de clasificación de las bacterias se ha realizado con enfoque en métodos bioquímicos que requieren técnicas específicas, como la tinción Gram. Esta es un procedimiento de tinción diferencial que depende de la capacidad de algunas bacterias, Gram positivas, para retener el cristal violeta, tomando las bacterias coloración morada o azul. No obstante, las bacterias Gram negativas no pueden retener el colorante y se tornan transparentes, pero pueden teñirse con safranina, adquiriendo una coloración roja, capacidad dada por la estructura de las paredes de las diversas bacterias en cuestión (6,7).

Las bacterias Gram positivas poseen una sola membrana lipídica rodeada por una pared celular gruesa de peptidoglicano (Figura 1). El peptidoglicano es un polímero poroso compuesto de una columna de glucanos, una cadena lateral tetrapeptídico y enlaces cruzados. La cadena principal de glucanos consiste en moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetil glucosamina unidos por enlaces β -glicosídicos (7). Además, posee ácido teicoico incrustado en la capa de peptidoglicano, el cual se considera el

mayor antígeno de superficie de las bacterias Gram positivas; y el ácido lipoteicoico anclado a la membrana citoplasmática a través de una molécula de diacilglicerol (8,9).

Por su parte, la pared celular de las bacterias Gram negativas consiste en una capa delgada de peptidoglicano que se encuentra entre dos membranas lipídicas, una interna y una externa (Figura 2). La membrana celular externa es de particular importancia debido a que contiene lipopolisacáridos, que actúan como endotoxinas bacterianas, entre otras funciones. Asimismo, la membrana externa facilita el transporte no vesicular a través de transportadores especializados o canales, como las porinas. Entre ambas membranas se localiza un espacio periplasmático que contiene enzimas importantes para el funcionamiento de dichas células (9).

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia bacteriana a antimicrobianos es la capacidad que poseen estos microorganismos de poseer de manera intrínseca o adquirida, supervivencia a pesar de la presencia de un antimicrobiano (10); también se puede entender como la capacidad de estos microorganismos a dejar de ser susceptibles a sustancias antibacterianas que previamente causaban daño a la célula. Una vez ocurre la resistencia,

el ciclo de vida bacteriano continúa, causando más daño y una amplia propagación entre los seres vivos (11).

Múltiples mecanismos se han descrito para lograr esta protección, algunos de los cuales se han desarrollado a lo largo de la evolución y otros por procesos de adaptación característicos de los seres vivos (11). Dentro de las causas más comunes está el consumo abusivo de antibióticos, ocasionado por prescripciones inadecuadas y administraciones empíricas, provocando aproximadamente el 50% de desarrollo de resistencia bacteriana, principalmente en los microorganismos que se encuentran en la flora bacteriana normal de todo ser humano y que posee capacidad de ser patógenos (ejemplo: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, etc) (12). Otra causa bastante descrita ha sido la utilización de pesticidas en la agricultura, que son transmitidos a los humanos mediante los alimentos. De igual forma, los antibióticos utilizados en animales de granja pueden tener contacto con los de la microflora, por el uso de desecho animal como abono en la agricultura (13). Estos acontecimientos repetitivos, provocan un contacto más frecuente con compuestos bactericidas, haciendo que las bacterias evolucionen, se adapten y logren sobrevivir ante las adversidades del medio.

La capacidad de evadir el efecto de los antibióticos está dada de dos

maneras: intrínseca: por mecanismos propios de la bacteria, en la que compuestos de la misma le proporcionan capacidad de defensa; o extrínseca: donde la bacteria obtiene su protección a partir de otra bacteria (14) o virus (15).

RESISTENCIA INTRÍNSECA

Dentro de los mecanismos intrínsecos de resistencia se pueden mencionar las bombas de eflujo (pueden ser tanto intrínsecas como extrínsecas) (16), la formación de biopelícula y la producción de exopolisacáridos, la modificación de superficie y membrana citoplasmática y la acción de proteínas extracelulares (14) (Figura 3).

Biopelícula

La biopelícula se conoce como un conjunto de células bacterianas asociadas de forma resistente a una superficie y rodeada por una matriz de polisacáridos (exopolisacáridos). Una biopelícula puede estar formada tanto por materia celular, como no celular (como minerales, componentes sanguíneos y componentes de la matriz celular a la que se encuentre asociada). Esta composición es formada cuando varias bacterias comienzan a colonizar el huésped y promovida por acción del sistema genético *quorum sensing* (17). Las bacterias que

presentan la biopelícula poseen una resistencia de 1000–1500 veces mayor hacia antibióticos y antimicrobianos que las bacterias que no lo presentan (9,18).

Los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares (PLC) son los componentes que se encuentran en mayor proporción y poseen una masa molecular aproximada de 10^6 Dalton. Aparte de tener la función de nutrir las bacterias, pueden modificar su carga y repeler o capturar los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP, por sus siglas en inglés) y del mismo modo a los fármacos evitando que este penetre al citoplasma (18). Dicha capacidad está dada por la deacetilación de la poli-N-acetil glucosamina (PNAG), un EPS de la pared bacteriana. La de-acetilación de la PNAG, ocurre mediante un complejo proteico conocido como Cluster de Adhesión Intracelular (*Ica*, por sus siglas en inglés), donde la IcaA (una N-acetil glucosamina transferasa) unida a la proteína accesoria, IcaD, promueve la síntesis y transferencia de PNAG, la cual será exportado desde el citoplasma hacia el espacio extracelular mediante la IcaC. Luego de ser exportada, IcaB se encarga de remover grupos N-acetilo, haciendo que la PNAG sintetizada sea de carácter positivo y provocando que partículas bactericidas sean repelidas (19).

Modificación de la superficie y de la membrana citoplasmática bacteriana

La modificación de la superficie bacteriana confiere resistencia hacia los péptidos antimicrobianos catiónicos, mediante el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico, componentes de la pared de Gram positivos que modifican su carga mediante la actividad de un sistema proteico (15). Dicho sistema proteico es conocido como péptido antimicrobiano sensor y regulador (Aps), que inicia su acción una vez se asocia un CAMP a la superficie celular que se encuentra cargada negativamente, es sensada por la unidad ApsS y transducida por la ApsX (proteína accesoria), los cuales, una vez activados, promueven la funcionalidad del operon *dlt*, el cual se encargará de la d-alanilación de los ácidos teicoicos, estimulando un cambio de cargas a positivo y que se repelen los CAMP; provocando además un aumento de la densidad de la pared, disminuyendo la permeabilidad (20).

Por otro lado, la modificación de la membrana citoplasmática es dada por el factor resistente a multipéptidos que es responsable de la amino-acilación del fosfatidilglicerol (PG), el fosfolípido más abundante de la membrana, con lisina. La modificación mediada por la L-lisina, conlleva a la repulsión de CAMP y antimicrobiano, evitando el paso hacia el citoplasma bacteriano. Este

proceso, también es activado por la transducción de ApsS y ApsX que llevan a la activación del factor resistente muropeptídico (*MprF*, por sus siglas en inglés). MprF una vez media la amino-acilación de PG que se encuentra en la capa interna de la bicapa lipídica de la membrana, se moverá hacia la capa externa, mediante un dominio de flipasa que se encuentra en el MprF. Una vez presentada en la parte externa, se aumenta la carga positiva de la membrana, provocando nuevamente repulsión de las partículas antibacterianas (20,21). Cabe destacar que las proteínas *VraF* y *VraG* funcionan como transportadores ABC que también llevan a la protección de la bacteria al exportar el agente antimicrobiano al exterior del citoplasma (15).

Proteínas Extracelulares

Es un mecanismo de protección encontrado principalmente en Gram positivos como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Estas se relacionan con la exopolisacáridos para degradarlos en biopolímeros (22). Tienen función de proteasas, que se encargarán de la degradación de las sustancias extracelulares. Una de las proteasas mejor caracterizadas es la *SpeB*, que es una proteasa de los estreptococos del grupo A (23).

RESISTENCIA EXTRÍNSECA

La resistencia extrínseca se describe mediante 3 mecanismos de adquisición que son transformación, conjugación y transducción. Estos mecanismos son obtenidos por la bacteria mediante plásmidos o transposones que permiten introducir material genético de una célula a otra.

Transformación

Esto se puede presentar en algunas especies de bacterias Gram positivas, como lo es el *S. pneumoniae*. Este mecanismo parasexual lleva a la participación de 2 bacterias: donador y receptor. El donador libera al medio ADN de doble cadena con la configuración de resistencia a los fármacos, el mismo, por medio de un complejo proteico (Com), será endocitado e integrado al ADN receptor (24). El material genético se unirá a sub-complejo ComG que funciona como un pilus. Como el ADN es de doble cadena, una de estas cadenas es degradada en el proceso, mientras que la otra es internalizada por el canal transmembrana ComEC con orientación 3'-5' (25).

Al internalizarse la cadena, se une con la proteína transformante *DprA*, quien le da apertura a la recombinasa *RecA* para actuar sobre la cadena de ADN. La *RecA* se encarga de buscar una porción del ADN del receptor donde esta nueva porción de ADN

pueda ser acoplada. Luego de ser encontrada esta posición, el ADN del donador se acopla al ADN del receptor y se sintetiza una cadena homóloga, convirtiéndolo en ADN de doble cadena (25). En el caso del *S. pneumoniae*, utiliza la EndA nucleasa para degradar una de las cadenas del ADN del donador y así permitir la entrada del ADN complementario por el poro ComEC (24). Las proteínas que son necesarias para la nueva codificación para la resistencia a los antibióticos vienen dentro del material genético el cual recibió el receptor. El donador de esta manera puede mantener sus proteínas (24).

Conjugación

La conjugación permite el paso de material genético desde una célula donadora a una receptora mediante plásmidos, principalmente. Para este proceso, las bacterias Gram positivas utilizan el sistema de secreción tipo IV (T4SS) para pasar el ADN del donador al receptor. TraJ, TraE, TraG, TraL, TraN, son factores integrativos para el proceso de la conjugación, donde el TraJ como principal y los demás accesorios permiten la unión de membrana con membrana para el paso del plásmido (26,27). La unión del plásmido pIP501 al TraA, lleva al cambio conformacional para activar el TraJ fosforilando el TraG y promoviendo la formación de un poro por TraL, que lleva a la apertura

y unión de las membranas del donador y el receptor, permitiendo un paso seguro del ADN plásmido. Este, al llegar al receptor, es descondensado y se une con el ADN del receptor sin tener que sufrir modificaciones como en el caso de la transformación (21,26).

Transducción

Este proceso ocurre a través de un bacteriófago, el cual infecta una célula huésped inyectando su material genético al interior de su citoplasma, llevando a la bacteria a: 1) Ciclo lítico donde la bacteria muere luego de 1 o 2 ciclos celulares; 2) Ciclo lisogénico donde el material genético del virus se une con el de la bacteria replicándose como parte del material bacteriano sin producir factores líticos (21, 28). Esto se da al unirse la subunidad terminasa pequeña (TerSf) a una región del ADN bacteriano la cual corta la subunidad terminasa larga dependiente de actividad nucleasa (TerL), permitiendo el acoplamiento del nuevo material genético sin causar la lisis (27). Luego de varios procesos de replicación, la célula puede lisar e infectar otras células adyacentes con el bacteriófago liberado (29).

MECANISMO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS

En la actualidad, se han propuesto diferentes mecanismos mediante los cuales las bacterias han adquirido la capacidad para resistir la acción de los antibióticos, algunas de las vías más utilizadas son: la disminución en la entrada del antibiótico hacia la célula, la alteración de su sitio blanco y las modificaciones de su estructura química (Figura 3).

Modificaciones del antibiótico

Alteraciones químicas del antibiótico

Las bacterias Gram positivas, e incluso las Gram negativas, sintetizan enzimas capaces de inducir cambios químicos en la molécula antimicrobiana (30). La adición de grupos químicos a la estructura normal de la molécula del antibiótico es uno de los mecanismos más importante en la resistencia a antimicrobianos. Esto lo realiza tras impedir el correcto funcionamiento del fármaco, pues previene la unión a su sitio diana como resultado tras generar un obstáculo estérico. Uno de los principales ejemplos es la modificación por enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que modifican covalentemente al hidroxilo o amino de la molécula de aminoglucósido. Este mecanismo es utilizado por las bacterias *Providencia*, *E. faecium*, *S. marcescens* (11) (31).

La mayoría de las enzimas ejercen su función a través de la inhibición de la síntesis proteica mediante la acetilación (la N-acetiltransferasa acetila los grupos amino del antibiótico), la fosforilación a través de O-fosfotransferasa o kinasas, que permiten agregar grupos PO_3^- y la adenilación, que agrega AMP utilizando O-adenililtransferasas (32). Los genes de esas enzimas se localizan generalmente en elementos móviles, tales como transposones o plásmidos, aunque algunos también se encuentran en cromosomas bacterianos (33,34).

Destrucción del antibiótico

Otro de los mecanismos cruciales de resistencia bacteriana hacia antimicrobianos es la destrucción de la molécula farmacológica. Desde un punto de vista clínico, el mecanismo clásico y más importante para la este tipo de resistencia consiste en la inactivación hidrolítica del anillo betalactámico de las penicilinas y cefalosporinas, a través de la elaboración de enzimas betalactamasas por la bacteria resistente, como es el caso del *S. aureus* resistente a penicilina. Estos microorganismos producen enzimas que se dirigen hacia el periplasma con la finalidad de destruir el antibiótico antes de que alcancen su destino en las proteínas de unión a penicilina (PBP), que actúa como molécula

receptora para el fármaco y crucial para su mecanismo de acción (30).

Para este mecanismo, la especificidad química depende del tipo de betalactamasa utilizado por las bacterias. Las betalactamasas tipos A, C (cefalosporinasa) y D (oxaciliniasa), operan a través de residuos de serina catalizadoras con función de proteasas. Estas atacan el carbonilo electrofílico del anillo betalactámico, resultando en un intermediario y modificando la transpeptidasa del peptidoglicano, que es punto diana del antibiótico. Estas enzimas realizan una hidrólisis rápida, que puede ser hasta de 103 moléculas por segundo (31). Por otro lado, las metalo-beta-lactamasas o betalactamasas tipo B, realizan su mecanismo mediante 1-2 sitios activos de átomos de Zn^{2+} , y es el mecanismo implicado en resistencia a otros fármacos como los carbapenémicos (34,35).

Disminución del flujo: Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas de transporte implicadas en la expulsión de sustratos o productos farmacológicos desde el interior celular hasta el entorno externo (36). Estas proteínas se encuentran en casi todas las especies bacterianas y los genes que las codifican se pueden ubicar tanto en cromosomas como en plásmidos (37). Así como los mecanismos de resistencia, éstas

también pueden ser clasificadas como intrínsecas o adquiridas, esta última presentándose como un incremento en las mutaciones cromosómicas (33).

En el reino procariota se han descrito diversos transportadores que actúan mediante dicho mecanismo. Los principales tipos de proteínas son (10,16,38,39):

1. MFS: superfamilia de facilitador principal o mayor
2. MATE: multidrogas y eflujo de compuestos tóxicos
3. RND: superfamilia de resistencia-nodulación-división
4. SMR: pequeña resistencia a múltiples fármacos
5. ABC: cassette de unión a ATP
6. DMT: superfamilia de transportadores de metabolitos de drogas

Es bien conocido el papel de los transportadores MFS en el desarrollo de resistencia en bacterias Gram positivas. Estas proteínas consisten en doce hélices transmembrana con cuatro de ellas (H3, H6, H9 y H12) que se alejan del interior, y las restantes forman la cavidad interna. De acuerdo con su función de transportar compuestos lipófilos, la cavidad interna de EmrD comprende principalmente residuos hidrófobos (37). Estos, al igual que los otros

sistemas, utilizan la fuerza motriz del protón como fuente de energía, además de la familia ABC, que utiliza hidrólisis de ATP para impulsar la exportación de sustratos.

El mecanismo de resistencia a través de bombas de eflujo afecta diversas familias de fármacos, incluyendo inhibidores de la síntesis proteica, como las fluoroquinolonas, betalactámicos, carbapenémicos y tetraciclinas (30). En el caso particular de las tetraciclinas, tanto en las bacterias Gram positivas como Gram negativas que se vuelven resistentes a las tetraciclinas, comúnmente incrementan la síntesis de proteínas de membrana que actúan como una bomba de eflujo para la droga. El medicamento se bombea hacia el exterior más rápido de lo que se puede difundir hacia dentro, por lo que las concentraciones dentro de las bacterias se mantienen bajas e insuficientes para realizar la inhibición del crecimiento bacteriano (31).

Los genes *tet* son adquiridos por las bacterias, que pertenecen a la familia MFS. *TetK* (en *S. aureus*), *TetL* (en *B. subtilis*) y *TetZ* (en *C. glutamicum*) confieren resistencia a tetraciclina. Estas bombas son inducidas por tetraciclina y generarán resistencia frente a ella por el mecanismo anteriormente descrito (10). Por otro lado, otro gen es el *TetR*, o proteína represora de unión a ADN, además

de unir tetraciclina permite la expresión del transportador encargado del eflujo de esta (16, 40).

Cambios en sitios diana

Los cambios en sitios diana son mecanismos de resistencia, que como su nombre lo indica, ocurren mediante alteraciones que le confieren características específicas al sitio diana. Este mecanismo se suele subdividir en dos sub-mecanismos: protección del sitio diana y modificación del sitio diana (16).

Protección del sitio diana

El mecanismo de protección del sitio diana queda ejemplificado de manera didáctica mediante antibióticos como la tetraciclina. Como ya fue mencionado, las bacterias pueden ejercer dos mecanismos por los cuales pueden resistir a las tetraciclinas: mediante bombas de eflujo y mediante protección ribosomal (10). La protección ribosomal está dada por la adquisición de genes a través de conjugación, los cuales serán encargados de permitir la síntesis de diversas proteínas que se encargarán del proceso. Los genes más conocidos son el *tetM* y *tetO*, que sintetizan las proteínas Tet-M y Tet-O, respectivamente, también conocidas como proteínas de protección ribosomal. El transposon Tn916, para Tet-M es una de las formas de

adquisición mejor conocidas en algunas Gram positivas (10,41).

Las proteínas de protección ribosomal poseen cierta homología con el factor de elongación G de los ribosomas. Dichas proteínas funcionan catalizando la liberación del fármaco de su lugar de unión ribosomal mediante hidrólisis, principalmente, y utilizando GTP como energía. Los cambios conformacionales que ocurren en el ribosoma impiden que el fármaco, posteriormente, pueda unirse nueva vez a su sitio diana (30,41).

Otro ejemplo de protección del sitio diana son las quinolonas. El mecanismo de acción de estos fármacos ocurre mediante la inhibición de la duplicación del material genético (ADN), ya que impide la unión de éste con la girasa y topoisomerasa IV de la bacteria en cuestión (42), llevando al impedimento de la replicación bacteriana. La resistencia está determinada por el gen *qnr* a la enzima que será atacada, previniendo la afección de la misma. Se han descrito diversos alelos, dentro del gen *qnr*, siendo de estos el *qnrA1* el más estudiado, pero también se encuentran *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC*, entre otros (30).

Modificación del sitio diana

La modificación del sitio diana ocurre mediante cambios específicos,

llevados a cabo por reacciones químicas, mediante enzimas o genes que codifican complejos proteicos que alterarán los lugares de unión reconocidos por los antibióticos (30).

Mutaciones en el sitio diana

El mecanismo de resistencia de mutaciones en el sitio diana, consiste en hacer modificaciones a nivel genético de alguna estructura específica. Las oxazolidinonas, como linezolid y tedizolid utilizadas para infecciones por gram positivos, afectan a las bacterias al interrumpir la traducción del ARNm, inhibiendo así la síntesis proteica (39).

Existen 3 mecanismos de resistencia ejercidos por las bacterias Gram positivas, que actúan con el fin de interrumpir el mecanismo de acción de estos fármacos:

1. Mutaciones en genes que codifican 23S ribosomal (rRNA)
2. Cambios en las proteínas ribosomales L3/L4
3. Metilación de 23S rRNA por una metilasa Cfr (cloramfenicol-florfenicol resistance)

Cabe destacar que la resistencia estará dada por una combinación de los distintos tipos de mecanismos de resistencia y ocurren de manera sucesiva (11,19).

Las mutaciones, por lo general ocurren en el bucle central del dominio V del 23 ARNr o en el centro peptidil transferasa, localizado en el dominio 23S de la subunidad 50S, y uniéndose específicamente al sitio A. El cambio más frecuente es en G2576T y G2447T en Gram positivos, también pueden ocurrir mutaciones duales en estafilococos en el que haya cambios en G2576T y en T2571C. Para que la resistencia puede llevarse a cabo, las mutaciones deben acumularse para aumentar la concentración inhibitoria mínima, en las diversas copias de genes 23S del ARNr que poseen las bacterias (10,19,32,39,43).

Alteración enzimática del sitio diana

En el caso de la alteración enzimática, una enzima se encarga de modificar el sitio de unión del fármaco, impidiendo su unión con el mismo. Fármacos como la eritromicina y las oxazolidinonas son afectados por estos procesos (30). Este proceso es parecido al descrito más arriba en la sección de modificación ribosomal para la resistencia a tetraciclinas.

Dentro de los elementos genéticos móviles, se han descrito más de 30 genes de metilación ribosomal de eritromicina (*erm*, por sus siglas en inglés). En los estafilococos, los más conocidos son *ermA* (en MRSA) y *ermC* (en *S. aureus*). Asimismo, en los enterococos y neumococos se encuentra *ermB*. Estos genes codifican

una enzima que cataliza la metilación del ribosoma, mediante un residuo de adenina localizado en la posición A2058 del dominio 23 del ARNr de la subunidad 50S (10,32,35,43).

El resultado final de la metilación, conlleva a pérdida de enlaces de hidrógeno e impedimento estérico en el lugar de unión del antibiótico en el ribosoma, específicamente, en la región denominada túnel de salida de la subunidad mayor ribosomal. Esta alteración enzimática, inicia inmediatamente el antibiótico se une a la región descrita, provocando activación del mecanismo rápidamente. Cabe destacar que diversos fármacos, entre ellos los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, comparten este sitio de unión a la hora de ejercer su mecanismo de acción, por lo que la expresión de *erm* también provoca resistencia bacteriana hacia dichos antibióticos (2,32).

Reemplazo completo

En este proceso, ocurre una remodelación en algún factor de la composición estructural bacteriana. Un mecanismo de reemplazo completo es presentado por ciertas bacterias, como los enterococos, al administrar vancomicina. Dicha resistencia es mediada por el operón *Van*, que la bacteria obtiene de forma adquirida, por plásmidos o transposones (30,44).

El operón *Van* está conformado por varios genes (43,45):

- *vanS-vanR*, reguladores de la respuesta que actúan como sensores de la membrana celular, conformando *vanS* una histidina-cinasa que actúa como el sensor que tiene sensibilidad hacia la fosforilación de *vanR* y *vanR* funciona como el sistema regulador y activará la transcripción de *vanH*, *vanA* y *vanX*.
- *vanH*, un gen de D-lactato deshidrogenasa que es el encargado de la reducción desde piruvato hacia D-Lac.
- *vanX* gen de dipeptidasa, que hidroliza el peptidoglicano D-Ala-D-Ala, cambiando la conformación estructural de la pared bacteriana e impidiendo la sensibilidad a vancomicina.
- Una ligasa variable compuesta por 9 genes, *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* y *vanN*. De todos estos, los más estudiados son *vanA* y *vanB*. La ligasa que se encuentre presente tendrá la función unir D-Ala escindido por *vanX* y D-Lac reducido por *vanH*, esto mediante la catálisis de un enlace éster.
- *vanY* es un gen de D,D-carboxipeptidasa que hidrolizará

el residuo terminal de D-Ala en caso de que la eliminación mediada por la acción de *vanX* no fuese suficiente.

- *vanZ* están encargados de la resistencia a teicoplanina.

Mediante los diversos cambios que ocurren por la acción del operón, se producirá una alteración significativa sobre la pared celular, que no será reconocida como el sitio de unión hacia el fármaco, pero que permitirá la sobrevivencia de la bacteria. Se describe que la afinidad fármaco-sitio diana disminuye hasta 1,000 veces (30,44,45).

AVANCES: NANOTECNOLOGÍA EN LA TERAPIA ANTIBACTERIANA

Mediante el incremento sobre las investigaciones en nanotecnología, se ha reevaluado el uso de terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés) para el control y erradicación bacteriana. El PDT funciona mediante la transferencia de electrones y/o protones, o de energía hacia un punto específico donde interactúa con moléculas de oxígeno, lo que provocará una subsecuente producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y/o tripletes de oxígeno, que podrían inducir a daño celular (46).

La terapia fotodinámica es un método que se conoce hace muchos años, pero que fue desplazado por la introducción de antibióticos (47). Sin embargo, con el aumento de la resistencia a los antibióticos, se ha visto necesidad de explorar nuevos mecanismos que permitan la erradicación de patógenos sin inducir resistencia a los medicamentos (48). Para ello, se ha descubierto que el efecto de la PDT puede ser potencializado y específico para el tratamiento en infecciones bacterianas, mediante la introducción de nanopartículas a esta terapia. El uso de PDT con nanotecnología podría generar cambios significativos y prometedores en el área de salud (49).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses personales o no personales sobre el presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011 Sep;477(7365):457.
2. Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current opinion in chemical biology*. 2003 Oct 1;7(5):563-9.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. Elsevier. 2014. 7a edición. Sección I: Introducción. Capítulo 1: Introducción a la microbiología.
4. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. eds. *Microbiología médica*, 27e New York, NY: McGraw-Hill; Capítulo 2: Estructura celular.
5. Wyckoff TJ, Taylor JA, Salama NR. Beyond growth: novel functions for bacterial wall hydrolases. *Trends in microbiology* [Internet]. 2012;20(11):540-7. Disponible en: [http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(12\)00146-1](http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(12)00146-1)
6. Brooks GF, Carroll KC, Butler JS, Morse SA, Mietzner TA. *Jawetz Melnick y Adelberg. Microbiología médica*. 25 edición. 2011. Sección 1: Bases de la microbiología. Páginas 21-24
7. Bohara, Raghvendra & H Pawar, Shivaji. Innovative Developments in Bacterial Detection with Magnetic Nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology* [Internet]. 2015;176(4). DOI:10.1007/s12010-015-1628-9
8. Miller, Wang, Benicewicz & Alan. *Inorganic Nanoparticles*

- Engineered to Attack Bacteria. Chemical Society reviews [Internet]. 2015;46(50). DOI: 10.1039/c5cs00041f
9. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015 Oct ;13(10):620-30. doi: 10.1038/nrmicro3480. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3480>
 10. Berger-Bächi B. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002 Jan 1;292(1):27-35.
 11. Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Piddock L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2014 ;13(1):42-51. DOI: <http://10.1038/nrmicro3380>
 12. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*. 2011;47(3):137-46.
 13. Holbrook S, Garneau-Tsodikova S. Expanding Aminoglycoside Resistance Enzyme Regiospecificity by Mutation and Truncation. *Biochemistry* [Internet]. 2016;55(40):5726-5737. DOI:10.1021/acs.biochem.6b00770
 14. Bodi M, Ardanuy C, Rello J. Impact of Gram-positive resistance on outcome of nosocomial pneumonia. *Critical Care Medicine* [Internet]. 2001;29(Supplement):N82-N86. DOI:10.1097/00003246-200104001-00005
 15. Omelchenko MV, Makarova KS, Wolf YI, Rogozin IB, Koonin EV. Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement in situ. *Genome biology*. 2003 Sep;4(9):R55.
 16. Markham PN, Neyfakh AA. Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2001;4:509–514.}
 17. Donlan R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [Internet]. 2002 ;8(9):881-890
 18. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2010;74(3):417-433. DOI:10.1128/mubr.00016-10
 19. Munita J, Bayer A, Arias C. Evolving Resistance Among Gram-positive Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*

- [Internet]. 2015 ;61(suppl 2):S48-S57. DOI: <http://10.1093/cid/civ523>.
20. Otto M. Staphylococcus epidermidis — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2009;7(8):555-567. DOI:10.1038/nrmicro2182
 21. Palmer K, Kos V, Gilmore M. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2010;13(5):632-639. DOI:10.1016/j.mib.2010.08.004
 22. Tenover F. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* [Internet]. 2006;34(5):S3-S10. DOI:10.1016/j.ajic.2006.05.219
 23. Bahar A, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2013 ;;6(12):1543-1575. DOI:10.3390/ph6121543
 24. Kovacs M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Peschel A, Vollmer W et al. A Functional *dlt* Operon, Encoding Proteins Required for Incorporation of D-Alanine in Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2006;188(16):5797-5805. DOI:10.1128/jb.00336-06
 25. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys J. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2014;12(3): 181-196. Doi: 10.1038/nrmicro3199
 26. Goessweiner-Mohr N, Arends K, Keller W, Grohmann E. 2014. Conjugation in Gram-positive bacteria. *Microbiol Spectrum* 2(4):PLAS-0004-2013. Doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0004 -2013.
 27. Sørensen S, Bailey M, Hansen L, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2005;3(9):700-710. DOI:10.1038/nrmicro1232
 28. Thomas C, Nielsen K. Mechanisms of and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2005;3(9):711-721. DOI:10.1038/nrmicro1234
 29. Yoko E, Lowy F. Horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4, 36-45 doi:10.1038/nrmicr ; Balcazar

- JL (2014) Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog* 10(7): e1004219. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219>
30. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*. 2016 Apr;4(2).
31. Walsh C. Molecular mechanism that confer antibacterial drug resistance. *Nature* [Internet]. 2000 ;406(6797):775-81.
32. Dessen A, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O. Molecular Mechanism of Antibiotic Resistance in Gram-Positive Pathogens. *Current Drug Targets - Infectious Disorders* [Internet]. 2001;1:63-77.
33. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* [Internet]. 2002;92:55S-64S.
34. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2005 ;8:525-533. DOI 10.1016/j.mib.2005.08.016
35. Wright G. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications* [Internet]. 2011 ;47(14):4055. DOI: <http://10.1039/c0cc05111j>
36. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2003;51(1):9-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
37. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 2014;453(2):254-267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
38. Soto S. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* [Internet]. 2013; 4(3): 223-229. DOI: 10.4161/viru.23724
39. Barbachyn M. The Oxazolidinones. *Topics in Medicinal Chemistry* [Internet]. 2017;. DOI: http://10.1007/7355_2017_15
40. Alekshun M, Levy S. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* [Internet]. 2007;128(6):1037-1050. DOI:10.1016/j.cell.2007.03.004
41. Donhofeer A, Franckenberg S, Wickles S, Beminghamen O,

- Beckmann R et al. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *PNAS*. 2012 [citado 11 de febrero 2018]; 109 (42): 16900-16905.
42. Beceiro A, Tomás M y Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical microbiology Reviews*. 2013 [citado febrero 11 2018]; 26(2): 185-230.
43. Miller W, Munita J, Arias C. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [Internet]. 2014;12(10):1221-1236. DOI: <http://10.1586/14787210.2014.956092>
44. Faron M, Ledebor N, Buchan B. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in the Health Care Setting. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2016;54(10):2436-2447. DOI: <http://10.1128/JCM.00211-16>
45. Hughes D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nature Reviews Genetics* [Internet]. 2003;4(6):432-441. DOI: <http://10.1038/nrg1084>
46. Sharma S, Mroz P, Dai T, Huang Y, Denis T, Hamblin M. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference?. *Israel Journal of Chemistry* [Internet]. 2012;52(8-9):691-705. DOI: <http://10.1002/ijch.201100062>
47. Issa M, Manela-Azulay M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [Internet]. 2010 [citado 8 Febrero 2018];85(4):501-511. DOI: <http://10.1590/S0365-05962010000400011>
48. Liu S, Qiao S, Li L, Qi G, Lin Y, Qiao Z et al. Surface charge-conversion polymeric nanoparticles for photodynamic treatment of urinary tract bacterial infections. *Nanotechnology* [Internet]. 2015;26(49):495602. DOI: <http://10.1088/0957-4484/26/49/495602>
49. Bloise N, Minzioni P, Imbriani M, Visai L. Can Nanotechnology Shine a New Light on Antimicrobial Photodynamic Therapies?. *Photomedicine - Advances in Clinical Practice* [Internet]. 2017;. DOI: <http://10.5772/65974>

FIGURAS

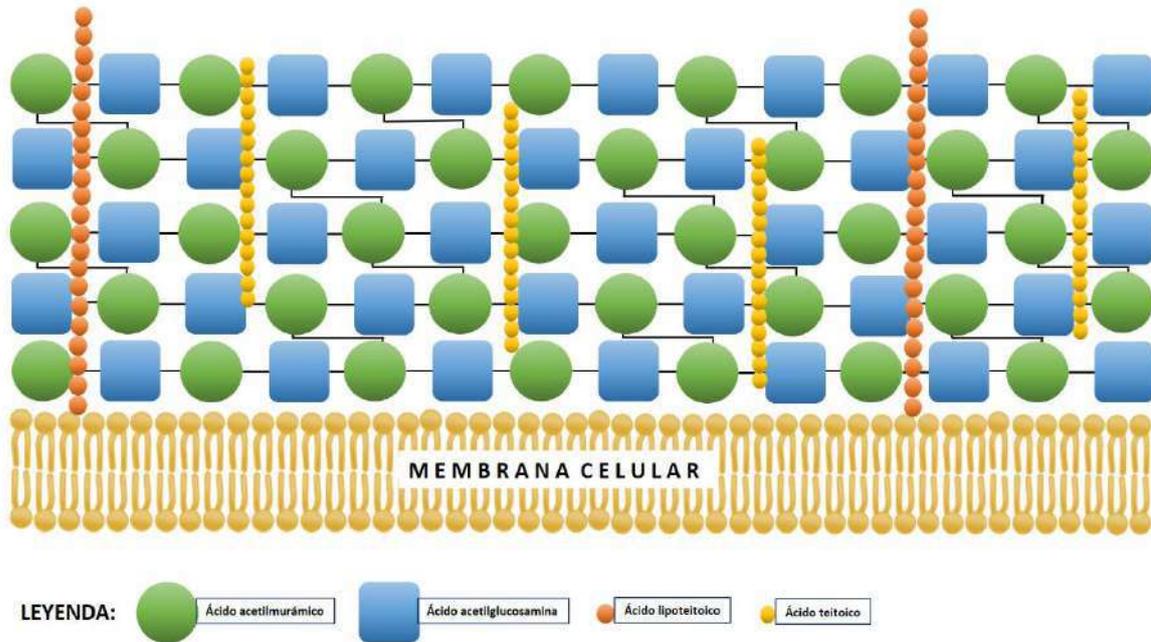


Figura 1: Pared celular de la bacteria Gram positiva. Está compuesta por una capa de peptidoglicano gruesa, con ácido acetilmurámico y ácido acetilglucosamina. Además, poseen ácidos lipoteicoicos y teicoicos.

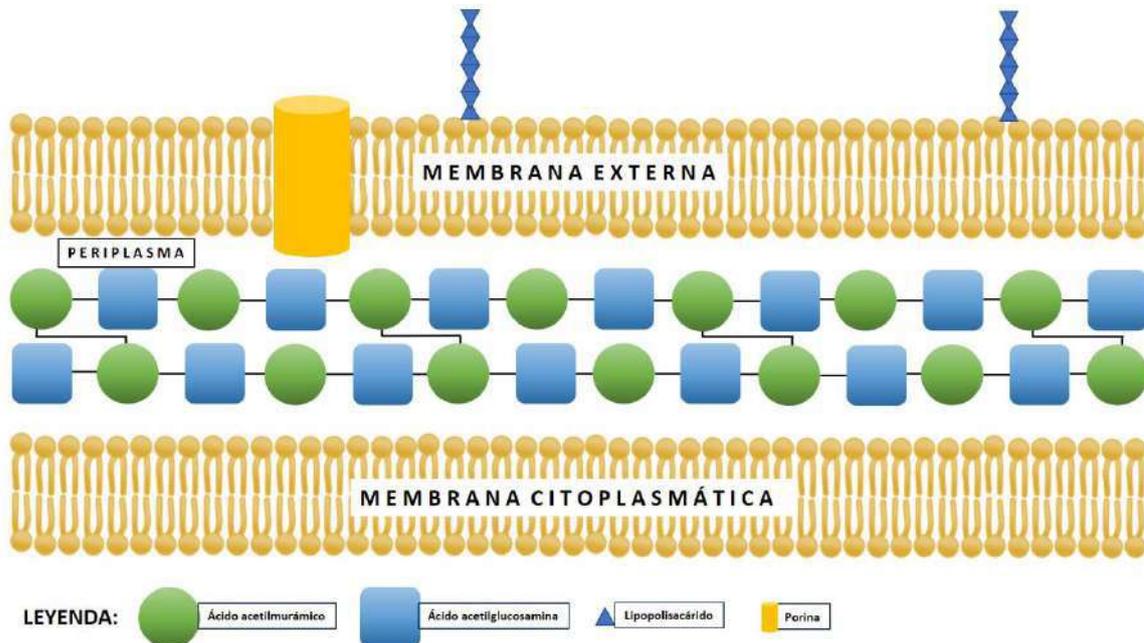


Figura 2: Pared celular de la bacteria Gram negativa. Posee dos membranas, una externa y una interna, con una pared de peptidoglicano fina y espacio periplasmático.

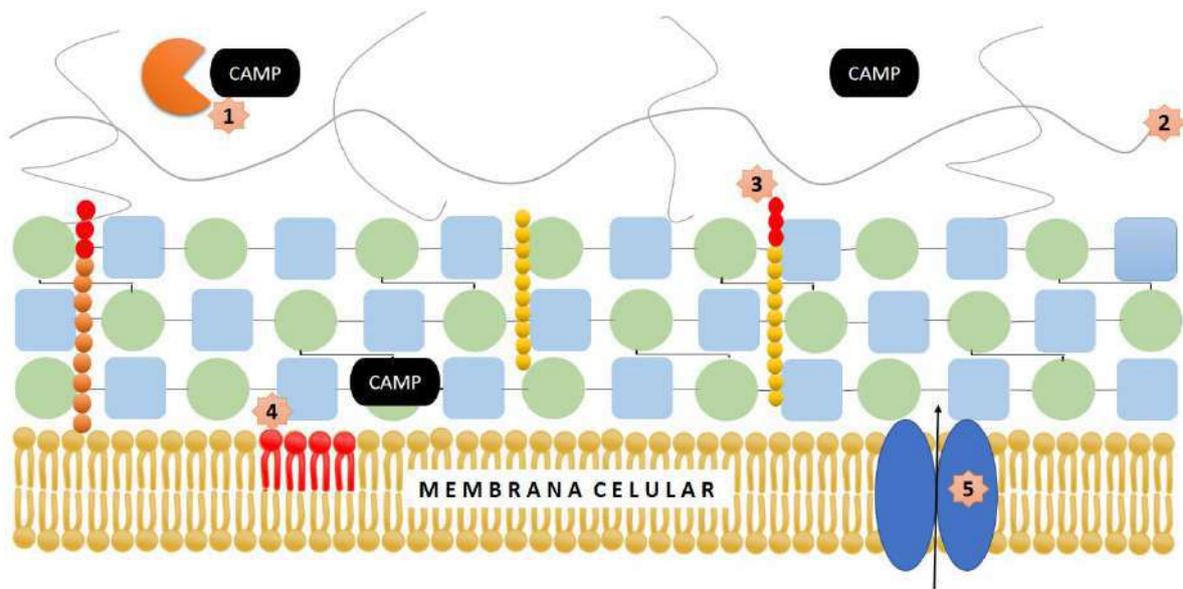


Figura 3: Mecanismos de resistencia intrínseca a fármacos en bacteria Gram positiva. Se esquematizan los principales mecanismos intrínsecos: 1) Proteasas; 2) exopolisacáridos; 3) D-alanilación de ácidos teicoicos; 4) cambio en la membrana; 5) bomba de eflujo.

Artículo de Revisión

CRISPR: MODELOS DE EDICIÓN GÉNICA

Gutiérrez A¹, Zorrilla C¹, López L²

¹Asistente de Profesor, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana. Contacto: anthjgutierrez@gmail.com

²Docente, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, República Dominicana.

RESUMEN

CRISPR-Cas9 es un diverso sistema de edición génica con actividad nucleasa guiado por ARN. Tiene la capacidad de apuntar virtualmente alguna secuencia genética de cualquier organismo, alterándola más allá de solo cortarla, modificando como interacciona el organismo con su medio desde su genoma. Su uso empodera de manipulación estructural, espacial y secuencial del material genético a sus usuarios. A continuación, se describe cómo se desarrolla el sistema y sus aplicaciones en diferentes ámbitos.

Palabras clave: CRISPR, genética, RNAsa, edición genética, Cas9, ARN, ADN

ABREVIATURAS

RH: recombinación homóloga, **ZFN:** nucleasas dedos de zinc, **TALENs:** nucleasas parecidas a efectores de la transcripción, **CRISPR:** repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, **PAM:** motivo adyacente al proto-espaciador, **H-NS:** proteína nucleoide parecida a histona.

INTRODUCCIÓN

La edición génica es una herramienta indispensable y poderosa con amplio uso en el desarrollo de todo tipo de tecnologías hoy en día. Esta permite el estudio del genoma a través de la observación de la función de los genes, la regulación de estos, su expresión *in vitro* o *in vivo* y su manipulación para el estudio de fenotipos patológicos en modelos animales¹.

La manipulación génica es tan vieja como la civilización

Los principios de la edición génica se remontan al momento en el cual el hombre empezó a manipular los cultivos y el ganado para generar estirpes más productivas al entrecruzar especímenes similares con características favorables. Mario Capecchi fue en primero en desarrollar la edición génica moderna con su demostración de ratones con genes eliminados en 1989¹. A mediados de los 90s, dos grupos de investigadores demostraron la capacidad de inducir cortes bicatenarios, es decir, en ambas

cadena de ADN, y la posibilidad de realizar una modificación por recombinación homóloga (RH) mediante la enzima de restricción I-SceI de *Saccharomyces cerevisiae* ilustrada en la figura 1¹. Concluyendo la década de los 90, dos grupos de investigadores fabricaron las primeras nucleasas tipo dedos de zinc (ZFN por sus siglas en inglés), resultando de la fusión de estructuras proteicas de unión a ADN llamadas dedos de zinc, con las previamente descritas enzimas con capacidad nucleasa o de corte de cadena de secuencia nucleotídica, como se demuestra en la figura 2^{1ss}.

En ese momento, el campo de la ingeniería genética no contaba con herramientas suficientes como para realizar manipulaciones completas y específicas sobre el genoma, pero las ZFN tenían problemas que dificultaban su uso como la toxicidad asociada a su sobreactividad y el alto costo de producción. Esto llevo a que surgieran en el 2011 las nucleasas parecidas a efectores de

activación de la transcripción, como la vista en la figura 3, (TALENs por sus siglas en inglés) que consisten en proteínas de unión a ADN derivadas de *Xanthomonas*, un género de proteobacterias, con afinidad aumentada en respecto a su antecesor¹. El próximo paso fue decisivo y cambió la ingeniería genética de forma irreversible, consistió en la descripción del sistema CRISPR y su proteína asociada Cas9 (proteína asociada a CRISPR, por sus siglas en inglés), como una herramienta de edición génica al provocar cortes bicatenarios guiados por ARN¹.

Los cortes de ADN y cambios asociados causados por estos métodos propuestos funcionan como una simulación de mutación intencionada en los sistemas biológicos, sobrepasando la capacidad de solo eliminar un gen y pasar a alterar su estructura al gusto. En la actualidad, CRISPR se ha adaptado a infinidad de usos solo limitados por la creatividad de los investigadores abarcando áreas como la epigenética² y la edición de bases³.

MODELOS CLÁSICOS DE EDICIÓN GÉNICA

El advenimiento de CRISPR al panorama actual desplazó métodos previos a un segundo plano, aunque sigan usándose. Su descripción asiste en el entendimiento de que la ingeniería genética es un área extremadamente dinámica donde hay un nicho para el uso de cada herramienta disponible.

Las enzimas de restricción son los pilares de los avances posteriores

Las enzimas de restricción son un conjunto de proteínas con actividad catalítica sobre nucleótidos. Pueden ser endonucleasas o exonucleasas según el punto donde se realice el corte, interno a la unión proteína-nucleótido o en los extremos distales a la unión, respectivamente. Su descubrimiento fue una innovación en el área por abrir las puertas a los cortes del ADN, pero su configuración rígida es una gran limitante. El mejor ejemplo de enzimas de restricción con utilidad en edición génica son las meganucleasas

que se caracterizan por ser endonucleasas de alta afinidad mediada hasta por 40 nucleótidos⁴. Entre todas las herramientas, se consideran las más específicas, pero al precio de ser las más difíciles de manipular. A pesar de presentar la mayor actividad celular y ser muy maleables al momento de llevarlas al tejido, demostraron no ser efectivas respecto al costo y su uso no se popularizó. Otra estrategia para su uso fue la integración de dominios nucleasa presentes en enzimas de restricción a sistemas de reconocimiento de ADN para que estos medien la capacidad de escisión⁴.

Las ZFN dieron inicio al uso en masa de la ingeniería genética

Para que una nucleasa sea útil comercialmente necesita ser específica para lograr un corte sin efectos similares en zonas no deseadas, preferiblemente con afinidad en una secuencia suficientemente larga para ser única en el genoma y adaptabilidad en cuanto cambiar su afinidad con el fin de que tenga versatilidad. Las ZFN cumplen con todo esto al tener un dominio de reconocimiento compuesto por dedos de zinc, motivos (secuencias lineales de aminoácidos en una proteína que median una función específica y conservada) ricos en cisteína e histidina, unido a un dominio nucleasa dependiente de dimerización llamada FokI. La especificidad depende de la cantidad de dominios dedos de zinc que se usen, cada dominio media unión a 3 nucleótidos⁵ como es visto en la figura 2.

La composición usual consta de 2 proteínas, una en la cadena 5' a 3' y otra en la cadena 3' a 5', cada una de 3 a 6 dominios dedos de zinc que coordinan unión a 9-18 nucleótidos consecutivos en cada cadena. Posterior a su unión, se dimerizan ambas nucleasas FokI y se media la rotura bicatenaria en un mismo punto con extremos libres romos. La dependencia de dimerización promueve un control adecuado de los cortes evitando que la unión aberrante a una secuencia similar provoque un corte al ser mínimas las

probabilidades de que se dé una unión no intencionada similar contralateral. Aunque el estándar es 18 nucleótidos, la unión de más dominios dedos de zinc permite aumentar la especificidad a pesar de aumentar el tamaño que se asocia a aumentada toxicidad e inmunogenicidad⁴⁵. Esta versatilidad primicia en el área permitió que se catapultara el uso de los dedos de zinc y fue el primer modelo de edición génica que se consideró para uso clínico con prospectos de uso en masa⁵.

Las TALENs representan el punto más alto en cuanto a afinidad

Los efectores parecidos a activadores de la transcripción derivados de *Xanthomonas* pueden unirse casi a cualquier secuencia de ADN. En el estudio de estas estructuras, se descubre que, de las más de 100 formas observadas de dominios parecidos a activadores de transcripción, se repiten 34 aminoácidos y solo 2 (12^{do} y 13^{ero}) por repetición son hipervariables. Estos últimos son los determinantes de la afinidad a un nucleótido u otro, recibiendo el nombre de “diresiduos de repetición variables”⁶. Estos dominios previamente descritos unidos a la nucleasa FokI son una mejora al sistema previo, con el mismo rigor regulando el corte, sumado a la minuciosa afinidad lograda con módulos unidos que determinan unión a nucleótidos específicos como se observa en la figura 3.

Entre las mejoras en cuanto a los métodos previamente usados están la nula toxicidad por cortes no intencionados y la presencia de una librería completa de combinaciones que median la unión a cada nucleótido para abaratar el proceso de construcción y facilitar el proceso de síntesis de novo. El proceso de construcción de un TALENs consiste en la selección de 12 aminoácidos por cada nucleótido a fijarse, lo que permite reducir el tamaño final de la proteína para encajar toda la maquinaria responsable de la afinidad y asegurar

su ensamblaje secuencial para que se corresponda con su función nucleasa⁶.

CRISPR

El inicio de la revolución en edición génica

Para la investigación de CRISPR todo empezó en 1987 en el estudio de la enzima IAP, una enzima asociada a la conversión de la fosfatasa alcalina en *E. coli*. Nakata y colegas reportaron como dato colateral la presencia de unas secuencias en repetición de 29 nucleótidos intercaladas con secuencias espaciadoras de 32 nucleótidos próximos a la secuencia de la enzima estudiada. Mojica y colegas posteriormente clasificaron esta estructura dentro del genoma como elementos presentes en más del 40% de las bacterias y más del 90% de arqueas. En 2002, Mojica y Jansen le dieron el nombre CRISPR para describir el fenómeno e incentivaron a la comunidad científica a que investigaran más sobre la misma. Poco tiempo después, Jansen describió las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) por su localización próxima a las secuencias de repetición⁷. La primera descripción funcional de CRISPR la dio Horvath trabajando en la producción de lácteos con *Streptococcus thermophilus*, brindando la primera evidencia de la función inmune en las bacterias. Este demostró la capacidad de lisis nucleotídica guiada por las secuencias espaciadoras como determinantes de especificidad y las proteínas Cas como determinantes de acción catalítica⁷. Posteriormente, se indagó mucho sobre la capacidad inmune de este sistema, pero no fue hasta el 2012 cuando Doudna y Charpentier postularon el uso de este sistema como una herramienta de edición génica guiada por ARN⁸.

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

CRISPR se define como una conformación de pequeñas repeticiones intercaladas por secuencias espaciadoras. Dentro de un locus CRISPR, las repeticiones son muy similares en longitud y secuencia de 21 a 47 nucleótidos. Las secuencias

espaciadoras suelen ser muy similares en longitud de 20 a 72 en el mismo locus con alta variabilidad entre una secuencia de nucleótidos entre una secuencia espaciadora y otra. La cantidad de estas combinaciones entre segmento espaciador y de repetición generalmente oscila cerca de los 20s, aunque se han observado microorganismos con una única y otros hasta con 374. Próximo a estas combinaciones se encuentra la secuencia líder de varios cientos de nucleótidos en longitud y sin capacidad de transcribirse. Posterior a la secuencia líder se encuentra el conglomerado de proteínas Cas asociadas a ese sistema efector ilustrado en la figura 4.

No es raro encontrar que una misma célula tenga varios locus de CRISPR y estos incluso pueden variar en su composición proteica efectora⁹.

CRISPR funciona como memoria adaptativa inmune procariota

En el mundo microscópico, se desarrolla constantemente una guerra interminable entre las bacterias y los virus bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente bacterias. El arsenal armamentístico de ambas está en constante evolución para superar a su contrario. Bajo este concepto nace CRISPR como una alternativa bacteriana para contrarrestar la acción lítica de los fagos. El proceso de acción de este sistema se divide en 3 fases: adaptación, biogénesis del ARN e interferencia¹⁰, viéndose este proceso en la figura 5.

Adaptación: Comienza con la invasión del fago y si la bacteria sobrevive a la infección de este se procede a incorporar una secuencia llamada "proto-espaciadora" mediado por un complejo proteico mayormente a partir de Cas1 y Cas2. Este material genético se integra en el genoma como una secuencia espaciadora próximo a la secuencia líder. Este remanente del fago servirá como la base de la memoria inmune^{10,11}. La selección de que material se incorpora no es aleatoria; para esto la

secuencia debe contener un motivo adyacente al proto-espaciador (PAM por sus siglas en inglés), que será a su vez una secuencia a reconocer por un dominio de reconocimiento PAM del complejo de adaptación y por el de interferencia^{10,11}.

Biogénesis del crARN: Los espaciadores integrados en el genoma bacteriano sirven como base para la creación del ARN CRISPR (crARN), mediador del reconocimiento de lo externo en el complejo de interferencia, en este caso secuencias de nucleótidos ajenas al microorganismo. Se necesita un ARN adicional de transactivación (tracrARN) que se obtiene de la cadena no complementaria de la secuencia de repetición. Este ARN es complementaria a la porción transcrita a partir de la secuencia de repetición, formando así un dúplex de ARN de tracrARN y precrARN de aproximadamente 30 pares de base. Posterior a la escisión por una RNasa tipo III y otros mecanismos aún no dilucidados, se forma crARN que se estabiliza para su unión con el complejo de interferencia^{10,12}.

Interferencia: El crARN maduro se une a un complejo de interferencia con afinidad nanomolar. En el caso del sistema tipo 2, el complejo de interferencia está comprendido por la proteína Cas9, la clasificación se trata más adelante. Al unirse al crARN, esta adopta un cambio conformacional que favorece la unión a nucleótidos en busca de su PAM que puede estar en el extremo 5' o 3' según el sistema CRISPR tratado. Cuando Cas9 encuentra una secuencia donde se corresponda tanto el PAM como la secuencia dictada por el crARN, se induce un corte bicatenario para la posterior degradación del material genético del fago^{10,11,12}.

Los bacteriófagos responden al agravio de los microorganismos con Anti-CRISPR

Según la descripción realizada hasta ahora, CRISPR parece el sistema perfecto para la protección contra infecciones virales en bacterias.

Sin embargo, en una gran cantidad de microorganismos, ocurren mutaciones en el locus CRISPR, que, en caso de ser dañinas, inutilizan cualquiera de las 3 etapas del proceso, haciendo que el microorganismo quede susceptible a cualquier injuria externa. Los bacteriófagos desarrollaron proteínas capaces de unirse y contrarrestar la actividad normal de las proteínas asociadas a CRISPR. Se describen como Anti CRISPR (Acr) a 21 familias de proteínas de 50 a 150 aminoácidos que no comparten ninguna característica más allá de su función, demostrando su origen impulsado por el fenómeno de la selección natural sobre los fagos susceptibles a la injuria. Los mecanismos usados por las proteínas Acr son muy variados: unión al dominio de reconocimiento de PAM, bloqueo del sitio activo de una o ambas nucleasas, bloqueo el sitio de unión a ADN, inducción de dimerización de proteínas del complejo efector, entre otros¹³.

Los microorganismos le sacan el máximo provecho posible al sistema CRISPR

La maquinaria de CRISPR y sus proteínas asociadas representan un esfuerzo biológico muy grande, tiene sentido que las bacterias le den otros usos alternativos a su función defensiva. En *Francisella novicida*, por ejemplo, se demostró la represión transcripcional de lipoproteína bacteriana asociada a la presencia de Cas9, resultando en una menor expresión superficial de esta lipoproteína, disminuyendo la respuesta inmune del humano a la presencia de esta bacteria¹⁰. Por otro lado, cepas selectas de *Campylobacter jejuni* con delección de Cas9 mostraron citotoxicidad limitada, posiblemente por afectar la composición de la pared y aumentar la susceptibilidad de unión a anticuerpos¹⁰. De igual manera, la presencia de ARN asociado a CRISPR sin presencia de Cas9 mostró ser moduladora en *Listeria monocytogenes* y su capacidad de colonizar tejido¹⁰. *Myxococcus xanthus* es una bacteria con capacidad de producir esporas; la delección de Cas7 y Cas5 disminuyó en

gran cantidad su capacidad de esporulación relacionando directamente la actividad del sistema CRISPR con el ciclo de vida de la bacteria en cuestión¹⁰.

Una herramienta tan poderosa necesita ser regulada

La información conocida en respecto a la regulación intrínseca del sistema CRISPR en las células procariontas es muy precaria, pero proporciona un preámbulo de cómo se puede regular posterior a su administración terapéutica. El organismo más estudiado en cuanto a regulación es *Escherichia coli* y su subtipo I-E, del mismo se extrajo información sobre un eje modulador de la respuesta CRISPR¹⁴.

La proteína nucleoide parecida a histona (H-NS por sus siglas en inglés) es un regulador global de la compactación del material genético bacteriano y se une con alta afinidad a las porciones ricas en pares de base A-T. Estas regiones curvas tienen elevada presencia de promotores cuya actividad se inhibe por la unión de la H-NS al impedir la unión de la polimerasa de ARN. En relación con el sistema CRISPR la proteína H-NS, que se une al promotor de CRISPR, tiene función dual, al inhibir su promotor y posterior expresión celular en situaciones basales libres de estrés celular. La presencia de material genómico exógeno provoca la unión de la H-NS al mismo por su alto contenido A-T, interrumpiendo la inhibición constante a la expresión de las proteínas Cas al liberar el promotor CRISPR¹⁴. Existe un conjunto de proteínas que tienen en común el efecto antagonista que ejercen sobre la función del sistema CRISPR/cas. La proteína RP es un regulador negativo de la expresión del gen *cas* en la bacteria *Salmonella typhi*; LeuO afecta la expresión del gen *cas* por medio de una competición con la H-NS; finalmente, la HtpG, chaperona encargada de estabilizar el Cas3, promueve un funcionamiento ineficiente del sistema CRISPR-Cas en *E. coli*¹⁴.

CLASIFICACIÓN

La clasificación de CRISPR como efector biológico fue un proceso caótico en sus inicios, debido a la libertad que se tomaban los investigadores para nombrar los elementos descritos, dando como resultado que una misma proteína pudiese tener hasta 4 nombres diferentes. En 2015 se propuso el actual sistema de clasificación que establece un único nombre para cada proteína, además de criterios definidos para delimitar una división de otra¹⁵.

Para la estandarización de la clasificación se optó por un proceso de dos pasos, centrado en caracterizar primero todos los componentes genéticos que transcriben proteínas efectoras dentro de la secuencia CRISPR y luego caracterizar los elementos constantes que solapaban entre un subtipo y otro. Se denominaba un sistema completo y funcional si de la transcripción resultaba un complejo efector de interferencia completo con función biológica¹⁵.

Los diferentes sistemas CRISPR se clasifican según las proteínas de su complejo efector

La división más amplia se da según la cantidad de proteínas en el complejo efector: clase I comprende todos los complejos conformados por varias subunidades proteicas en contraste con la clase II que se describe como un complejo efector de una sola proteína¹⁵. En lo que respecta a la edición génica, se opta por opciones más simples de clase II para disminuir el peso y mayor versatilidad en la manipulación. Una segunda división alterna es por tipos (I-III), estos se desglosan según las proteínas específicas que componen el sistema CRISPR-Cas. Hay 3 tipos canónicos: tipo I contiene Cas3, tipo II contiene Cas9 y tipo III contiene Cas10¹⁶. Cabe detallar que estas proteínas suelen acompañarse de muchas otras, se resaltan estas 3 por su presencia inequívoca en cada sistema descrito. Por otra parte, se describen 2 tipos alternativos en los cuales no se han caracterizado componentes proteicos constantes,

tipo IV y tipo V. En un intento por delimitar los tipos alternativos, se describe casf1 como proteína clave en IV y cpf1en V. Dentro de la clase I se encuentra el tipo I, III y IV mientras que dentro de la clase II se localiza el tipo II y V¹⁶.

Posteriormente, cada tipo se dividió en subtipos en base a expresión de proteínas específicas únicas de esa división. La misma se desglosa de la siguiente manera¹⁵:

Tipo I: Se divide en 7 subtipos, desde I-A hasta I-F y I-U. Se caracterizan por codificar una superfamilia de helicasas estimulada por ADN de cadena monocatenaria. Destaca que I-U recibe la U por ser no caracterizado dado que los componentes del sistema efector y su mecanismo no han sido descritos.

Tipo II: Se divide en 3 subtipos, desde II-A hasta II-C. Un complejo proteico de multidominio es codificado por este tipo, el cual combina las funciones del complejo crARN-efector con el corte del ADN blanco.

Tipo III: Se divide en 2 subtipos que son III-A y III-B. Se encargan de codificar una proteína de multidominio que contiene un dominio "Palma", variante del motivo de reconocimiento de ARN (RRM), el cual es homólogo al dominio del centro de diversas polimerasas y ciclasas de ácidos nucleicos.

Tipo IV: Este tipo tiene una división más informal basa en la presencia o no de una helicasa DinG. Este tipo codifica un complejo crARN-efector, compuesto por Csf1, Cas5 y Cas7.

Tipo V: Esta división no presenta subdivisiones. Se encarga de combinar Cpf1 con un módulo adaptador.

El hecho de que la división se haga a partir de los componentes del complejo efector de interferencia se basa en el hecho de que la gran mayoría de los sistemas CRISPR-Cas comparten Cas1 y Cas2 como complejo efector de adaptación, pero debido a la diversidad genética de todas las células

procariotas con el sistema, hay excepciones como los sistemas del subtipo IIIB y del tipo IV¹⁵. Dicha estructura puede apreciarse en la figura 6.

Las proteínas anti CRISPR se clasifican según el subtipo del sistema diana

La clasificación no solo se limita a los efectores, encasillando también a las antagonistas de la función de Cas9 según la ramificación previamente explicada. Las Acr se nombran según el tipo y subtipo diana, numerándose progresivamente según la cronología de su caracterización. AcrF4 inhibe al subtipo I-F y fue la cuarta proteína descrita que con capacidad inhibitoria de ese subtipo¹³.

ESTRUCTURA

Cas9 es una proteína ideal para ingeniería genética

Entre todas las proteínas descritas dentro de los sistemas CRISPR, se opta por Cas9 sobre todas las demás como preferencial, aunque en casos especiales se puede usar cualquier otra. Cas9 es una proteína modular, bien caracterizada, con capacidad de alteración costo-eficiente, ideal relación tamaño/peso independiente de otros componentes proteicos y con capacidad de mediar reconocimiento como también escisión por sí misma. Es el efector ideal para la manipulación genómica y cumple con todas las características¹⁶.

La estructura de Cas9 describe un lóbulo nucleasa y un lóbulo de reconocimiento

El lóbulo de reconocimiento está compuesto por 3 dominios alfa hélice denominados Hel I, II y III. Este lóbulo es único al no compartir conformación estructural con ninguna otra proteína. Su función principal se basa en realizar interacciones estabilizantes con el dúplex repetición-anti-repetición presente en el crARN. El lóbulo nucleasa está compuesto por dos dominios nucleasa: uno encargado de la escisión de la cadena complementaria denominado "HNH", de motivo conservado histidina-arginina-histidina y el RuvC, recombinasa asociada a bacterias gram-

negativas, responsable de la acción en la cadena no complementaria¹⁶.

El dominio RuvC tiene una estructura similar a ARNasas con pliegue H presente en integrasas retrovirales y media catálisis por dos iones metálicos, probablemente magnesio. A su vez, presenta 3 subdominios, RuvCI hasta RuvCIII y estos se distinguen por ser intercalados por el dominio HNH y el dominio C terminal. En cuanto a la porción nucleasa de HNH, tiene una estructura homóloga a pliegue asociado a iones metálicos $\beta\beta\alpha$. Ambos dominios tienen un aminoácido conservado, aspartato e histidina respectivamente, cuya importancia radica en que su sustitución por una alanina transforma a Cas9 en una versión inactiva dCas9 que mediará solo unión y no escisión del ADN¹⁶.

Ambos lóbulos están interconectados por 2 segmentos de unión, siendo el primero un puente rico en arginina muy importante al momento del cambio conformacional que activará la proteína. El otro es un segmento de unión desordenado que abarca los aminoácidos del 712 al 717. A propósito de la activación de la proteína, en este proceso se aprecia la reorganización del dominio C terminal, importante por la presencia de la región de reconocimiento de PAM¹⁶.

MECANISMO

La escisión de la doble cadena se divide en 3 grandes pasos, es importante que el proceso sea secuencial y la presencia de múltiples limitantes para la acción. Esto último ayuda a controlar la actividad catalítica contra un componente vital para la supervivencia celular. Estos pasos son: activación, reconocimiento y corte.

La activación media los cambios conformacionales que preparan a Cas9 para su interacción con nucleótidos

Previo a la activación, Cas9 es una proteína de estructura desorganizada y sin capacidad de realizar actividad catalítica recibiendo el nombre

de apoCas9. Para este paso de activación, se adaptó una versión de crARN creada artificialmente llamada ARN guía (gARN) para evitar el tedioso proceso biológico previamente descrito en la etapa de biogénesis de crARN¹⁶.

La activación se da por la unión del gARN a apoCas9, principalmente a Hel I. El cambio conformacional más relevante es la creación de un canal central donde se localizará el ADN, esto propiciado por una reorganización general donde Hel III se traslada aproximadamente 65 Å hacia el dominio HNH. En ese momento, apoCas9 pasa a ser Cas9 y adquiere capacidad de unión a material genético para realizar el siguiente paso¹⁶.

El reconocimiento se basa en la búsqueda activa del PAM correspondiente a esa proteína y posteriormente, su secuencia diana

La proteína Cas9 posterior a su unión con el gARN empieza la búsqueda activa por su secuencia PAM a través de todo el genoma, siendo este el mecanismo endógeno bacteriano para discernir entre lo endógeno y lo exógeno. El PAM más frecuentemente usado corresponde a Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, siendo este 5'-NGG-3', siendo N cualquiera de los 4 nucleótidos y esta secuencia se estima se repite cada 16 pares de bases, favoreciendo la capacidad de editar virtualmente cualquier secuencia auxiliándose también de otras Cas9 con PAM cortas en caso de ser necesario como lo son *S. thermophilus* y *F. novicida* que se unen a 5'-NGGNG-3' y 5'-NG-3' respectivamente¹⁶.

La unión a una porción de ADN no correspondiente a su PAM causa rápida disociación del complejo proteína-nucleótido, en caso de que sí se reconozca la secuencia. La acción se logra a través de puentes de hidrógeno coordinados por los aminoácidos arginina 1333 y 1335 en una conformación de horquilla β localizada en el dominio C terminal con la cadena no complementaria contenedora de la secuencia. Esta unión propicia la invasión por la hebra de

gARN por la separación que causó la unión del ADN a la región de reconocimiento a PAM. La fuerza que propicia este fenómeno es la complementariedad de los nucleótidos del gARN que procede a invadir y la hebra de ADN que será invadida. Se separan la cadena complementaria y la no complementaria de forma progresiva de extremo PAM proximal a PAM distal como consecuencia de la invasión del gARN, tomando una conformación de bucle R o "R loop" por su nombre en inglés. Aproximadamente 20 nucleótidos median unión dentro del canal formado por Cas9, pero no todos son necesarios para mantener esta adherencia entre la proteína y la hebra de ADN; se describe una región base o "seed" por su nombre en inglés. Esta se conforma por aquellos nucleótidos cuya complementariedad es obligatoria para mediar el reconocimiento y mantener esta estrecha asociación, con una longitud comprendida entre 8 a 12 pares de base. Los nucleótidos restantes del gARN no pertenecientes a la región base son más capaces de tolerar no ser complementarios¹⁶.

El bucle R es una estructura compleja y necesaria debido a que la actividad nucleasa de la proteína Cas9 es dependiente de un reconocimiento geométrico y no secuencial, donde el bucle R promueve el acercamiento del sitio de corte de la cadena complementaria al dominio HNH y el punto de escisión de la cadena no complementaria al dominio RuvC. Para lograr esta conformación se necesita más que las interacciones Watson y Crick. En el nucleótido aguas arriba del PAM, también referido como +1, existe un impedimento de giro sobre su grupo fosfato estabilizado por los aminoácidos leucina 1107 y serina 1109 en el dominio C terminal, dirigiendo la cadena complementaria hacia el gARN y alejándolo de la cadena no complementaria promoviendo así la invasión del gARN¹⁶. Por otro lado, la cadena no complementaria es estabilizada por interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals, mostrando una conformación helicoidal

distorsionada en la cadena no complementaria, aguas arriba del PAM, también denominado nucleótido -1 (la numeración se lleva a cabo siempre de 5' a 3'). Esta conformación no es termodinámicamente estable y para mantenerse se refuerza con interacciones estabilizadoras entre los nucleótidos -2 y -3 de la cadena no complementaria y Cas9¹⁶.

La forma final del bucle se dará entonces por los cambios de dirección de ambas hebras de ADN generados por los impedimentos previamente descritos. La porción PAM proximal muestra adherencia al dominio C terminal mientras el extremo PAM distal es coordinado entre Hel III y RuvC, en el trayecto comprendido entre estos dos puntos hay una rotación global de 150° a 180° que asegura la acomodación de cada hebra en una posición favorable para su corte¹⁶.

El corte se media por dos dominios nucleasas activados por la cercanía al nucleótido diana

La unión del segmento base proximal al PAM es primordial para asegurar la unión de la proteína al material genético, sin embargo, la porción PAM distal será decisiva con relación a la posición del dominio HNH que a su vez regula la actividad nucleasa del dominio RuvC de forma alostérica. La unión ADN-gARN en los nucleótidos +14 a +17 será el fenómeno que estabilizará y regulará la acción nucleasa¹⁶.

La unión de los 20 nucleótidos del dúplex ADN-gARN serán la señal que mediará la tracción del dominio HNH por el dominio Hel II, acción coordinada por interacciones hidrófobas. Este movimiento coloca el dominio HNH a unos 10 Å del fosfato a escindir, la presencia del ion metálico que coordina el ataque nucleofílico disminuye esta distancia a apenas 5.5 Å, suficiente para que se dé la escisión coordinada por el aminoácido histidina 840. Por otra parte, la unión entre HNH y RuvC por segmentos de unión o "linkers", por su nombre en inglés, L1 y L2 se somete a un re-

arreglo en consonancia con los cambios traslacionales del HNH. Este re-arreglo es la base de la regulación alostérica del dominio HNH sobre el dominio RuvC, causando un acercamiento de esta última a 2.1 Å aproximadamente del fosfato para la escisión dependiente de ion metálico Mg²⁺ y coordinado por el aminoácido aspartato 10¹⁶. Cada proteína Cas9 será capaz de mediar un único corte y el tiempo que toma la realización del corte es de 0.1 a 1 min⁸.

REPARACIÓN

Las dos vías posibles de reparación llevan a diferentes resultados en el genoma

Las células generalmente son víctimas de 10⁵ lesiones por día en su material genético, esta injuria es tratada por la maquinaria celular para evitar la pérdida de la integridad del genoma. Posterior a la acción de Cas9 sobre el ADN, el resultado es un corte romo de ambas cadenas, hasta este punto lo realizado se define más como un daño que como una edición. En ese momento entra en juego la maquinaria celular para mediar la reparación de este corte por una de dos vías: unión de extremos no homólogos o recombinación homóloga (NHEJ y HR por sus siglas en inglés, respectivamente). En la primera se unen extremos causando deleciones o inserciones para hacer ambos extremos homogéneos y complementarios, en la segunda se inserta una nueva secuencia a partir de otra secuencia molde entre los extremos libres del ADN¹⁷.

La respuesta al daño del ADN mediada primordialmente por la familia de proteínas parecidas a fosfatidilinositol-3-quinasa y polimerasas poli-ADP-ribosa. La localización de las proteínas de respuesta al sitio de daño es iniciada por sensores y el ensamblaje de la maquinaria reparadora depende del estado de condensación del material genético y los cambios post-traducción de estas proteínas. La fase celular determina la vía de reparación, si la célula está en

fase S o G2, la vía más probable es la HR, de lo contrario será NHEJ¹⁷.

En la unión de extremos no homólogos, las proteínas Ku70 y Ku80, de estructura toroidal con un hueco central, son las primeras en rápidamente unirse como heterodímero a los extremos libres posterior al corte. La presencia de Ku unido a ADN promueve la asociación a proteínas quinasas de ADN, DNA-PK por sus siglas en inglés, que mediarán la estabilización de los extremos y evitarán su resección a través de fosforilaciones consecutivas. La posterior unión de enzimas procesadoras de extremos como ARTEMIS que causan homología de cadena mediante adición o descarte de nucleótidos, el acercamiento y protección de ambas hebras para permitir la acción de una ligasa de ADN 4 que resultará en la unión de los extremos libres con posibilidad de inserción o delección¹⁷.

En la recombinación homóloga, cada extremo es invadido por una proteína polimerasa de poli (ADP-ribosa) 1, PARP1 por sus siglas en inglés, al mediar adición de grupos poli-ADP-ribosa coordina la acumulación de un complejo MRN compuesto por: proteína de recombinación meiótica (MRE), proteína de reparación RAD50 y la proteína reguladora del ciclo celular P95 (NBS1). Este complejo mediará el reclutamiento de una serina treonina kinasa ATM mediante la región C terminal de NSB1, que junto a MRE y RAD50 mediarán la resección del ADN para la creación de 2 extremos monocatenarios libres 3'. Estos nuevos extremos se unirán cada uno a un complejo heterotrimérico de proteínas de replicación RPA1, 2 y 3 para lograr estabilizarlos. La sumoilación del complejo RPA ya unido al ADN provoca la adición de la proteína RAD51 que mediará la infiltración de los extremos 3' libres en el molde y la integración del material genético del molde a la cadena original por actividad de la ADN polimerasa. Esto último resulta en la adición de una secuencia nueva en el punto donde se cortó el

ADN. Normalmente este nuevo segmento proviene de una cromátida hermana, pero el mecanismo se presta a la inserción de un fragmento de ADN deseado a partir de un molde proporcionado a la célula de manera exógena¹⁷.

COMPARACIÓN DE MODELOS DE EDICIÓN GÉNICA

Como en la naturaleza, la supremacía de CRISPR se atribuye a que es el más apto

Al evaluar un sistema de edición génica, hay muchos requisitos que sopesar tomando en cuenta la delicadeza del sustrato a alterar. En cuanto a reconocimiento, Cas9 típicamente maneja 22 nucleótidos, 20 del gARN y 2 de PAM, siendo este un buen número al mediar un reconocimiento más específico, pero no se compara a las estáticas meganucleasas que median reconocimiento de entre 14 a 40 pares de base. En realidad, si solo se evaluara la afinidad, Cas9 fuese la peor considerando que el reconocimiento por ZFN y TALENs es definido por qué tantos dominios de reconocimiento se añadan. La especificidad de Cas9 también es deficiente en comparación a todas las otras al permitir errores tanto puntuales como también secuenciales, en contraste a los demás que solo permiten errores puntuales. La característica que corona a CRISPR-Cas9 como mejor sistema de edición génica es la facilidad de manipulación y reajuste de secuencia diana, donde todos los demás modelos necesitan el cambio de complejas estructuras proteicas con interacciones caracterizadas, sin embargo, de impredecible resultado, tomando largos periodos de prueba para evaluar diferentes combinaciones similares para un mismo potencial resultado. CRISPR solo necesita la presencia de la secuencia diana sintetizada en un gARN y su secuencia PAM 3 nucleótidos después de la rotura, pero no solo eso, sino que su estructura permite alteraciones modulares dando una versatilidad solo limitada por la creatividad de los investigadores¹⁸.

A pesar de lo desarrollado previamente, los modelos de edición génica no han descontinuado su uso, por ejemplo: ZFN ha sido usado como modelo terapéutico para hemofilia B, VIH e inmunodeficiencia severa combinada. TALEN ha sido usado como modelo terapéutico para la distrofia muscular de Duchenne y el virus de la hepatitis B. La estrategia terapéutica en cada caso abarca manipulación por ambas vías de reparación, tanto NHEJ como HR¹⁸.

RIESGOS

Las mutaciones no intencionadas son dañinas para la célula y dependen de la especificidad de Cas9

La supervivencia de cualquier modelo de edición génica depende grandemente de su especificidad y los primeros reportes de uso no mostraron datos favorables para CRISPR. Se describen como mutaciones no intencionadas u “off target” a aquellos cortes causados en puntos con secuencias similares a la diana. Para aminorar la incidencia de estos eventos se han desarrollado estrategias como el corte del gARN para tener regiones más pequeñas de complementariedad disminuyendo las mutaciones no intencionadas sin sacrificar eficacia al corte. Otro método fue la adición de dominios nucleasa FokI a dCas9, haciendo que el corte generado sea dependiente de dimerización duplicando así la cantidad de nucleótidos que median el reconocimiento. La mejor estrategia para este problema hasta hoy es el uso de dos “nickasas”, proteínas Cas9 que realizan cortes monocatenarios debido a la mutación del aminoácido aspartato 10 del dominio RuvC por una alanina, resultando en una pérdida de función nucleasa al ser incapaz de coordinar el ion metálico. Estas dos nickasas están dirigidas a nucleótidos adyacentes causando una rotura bicatenaria, en caso de que una de estas Cas9 modificadas cause un corte no intencionado, es rápidamente reparado sin causar mutaciones²⁰.

Los humanos presentan anticuerpos hacia Cas9

Aproximadamente un 40% de la población está colonizada por *Staphylococcus aureus* y 20% de los niños en edad escolar están colonizados por *Streptococcus pyogenes* en cualquier momento dado, ambos microorganismos comensales normales con potencial patogénico. De igual manera, sus proteínas Cas9 son ideales para edición génica por su corto PAM. En un estudio de inmunidad humoral se encontró que la totalidad de adultos humanos presentan anticuerpo contra ambas bacterias, planteando dudas sobre la capacidad inmunogénica de las proteínas Cas9. En caso de una reacción citotóxica contra los elementos asociados al sistema CRISPR, se destruiría la célula a editar y suscitara una reacción inflamatoria local. Posteriormente, se detectaron anticuerpos séricos tipo IgG contra la Cas9 de ambos microorganismos, limitando los métodos de entrega que involucren la presencia de estas proteínas en la sangre. El problema real radica en la presencia de poblaciones de células T de memoria contra Cas9 proveniente de *S. aureus* específicamente, con capacidad de desarrollar una respuesta inmune que anule el efecto, a su vez, con un potencial nocivo sistémico. Este descubrimiento obliga la adición de tratamiento inmunomodulador simultáneo a la terapia génica²¹.

ENTREGA

La edición génica puede medirse en el tejido o mediante trasplante

Para lograr el objetivo terapéutico, es necesario que Cas9 llegue dentro de la célula para mediar su efecto. Las dos grandes vertientes descritas para este proceso son: *in vivo* y *ex vivo*. En la primera, se administran los componentes del complejo efector a la célula en el tejido enfermo, en contraste al segundo donde se realiza un trasplante autólogo con previa modificación genética de la célula. Otro factor que tomar en cuenta es el potencial mutagénico del sistema al ser administrado como material genético a la célula para que esta lo

transcriba, mediando niveles de concentración más altos del complejo efector. Contrario a lo que pasa cuando se administra directamente la proteína y el gARN, caso en el cual hay más limitación de la actividad mutagénica¹⁸.

Los métodos ex vivo son más maleables

La capacidad de manipulación de la célula da capacidad al equipo de investigadores de evaluar el fenotipo previo a insertar esa célula a un tejido, evitando tal vez potenciales tumorales o patologías mutacionales no intencionadas. Pero el potencial terapéutico de este método se ve limitado por la capacidad de mantener a la célula viva en un medio ajeno a la misma, pérdida de propiedades asociadas a estímulos locales y la capacidad de reincorporarse al tejido exitosamente. El proceso de incorporación se da por inserción de un plásmido con el material genético a insertar¹⁸.

Los métodos in vivo alteran varias poblaciones celulares con amplificación del efecto final

Las estrategias de entrega *in vivo* son preferibles para tratar enfermedades sistémicas por su capacidad de afectar a varias poblaciones simultáneamente, permitiendo que el efecto final tienda a ser más sistémicos. Las células diana no tienen que someterse al estrés de la separación de su medio intracelular. El mejor ejemplo de edición *in vivo* se presenta en el uso de virus cargados con el material genético que codifique los componentes del complejo, estos vectores virales tienen previamente establecido un tropismo celular y una limitación de la capacidad de material genético a movilizar. Uno de los problemas que presentan los virus es la mutagenicidad asociada a la integración de este nuevo ADN en sitios no determinados en el ADN de la célula diana. Entre los virus usados para este proceso están los lentivirus, retrovirus y como vector de mayor uso, adenovirus. Otro método válido es la entrega directa de ribo-

nucleoproteínas, que son proteínas asociadas a RNA^{18,21}.

El oro como solución a los principales problemas de entrega al tejido

Todos los métodos previos de entrega tienen limitantes de tamaño o potencial inmunogénico y la solución fue tan brillante como la idea que la originó. Se denomina CRISPR-GOLD al método que consiste en empaquetar Cas9 como ribonucleoproteína y ADN donante para la recombinación homóloga en una cubierta interna de nanopartículas de oro y otra externa de polímeros de aspartamida con grupos aminoetilo asociados. El polímero de la capa externa promueve la exocitosis por su carga positiva y dentro de la célula causa disrupción endosomal, con posterior liberación del complejo aún cubierto por la capa interna al citosol, donde el glutatión mediará la liberación del complejo efector de las nanopartículas de oro, cuya contribución era brindar estabilidad al conjunto de todos los componentes. De esa manera, se tiene la ribonucleoproteína con el ADN donante dentro de la célula, además de altas probabilidades de realizar recombinación homóloga con relación a la introducción por factores virales. Un factor que considerar es la potencial acumulación intracelular de oro, pero la cantidad necesaria para alcanzar niveles tóxicos es virtualmente imposible de lograr²².

MODALIDADES ALTERNAS DE EDICIÓN GÉNICA

No solo de cortes se vale la manipulación genética, Cas9 es una plataforma de muchas posibilidades

El genoma es un componente muy complejo de los sistemas biológicos, su acción no solo depende de la secuencia de pares de base, sino que, muchos otros factores como las metilaciones o acetilaciones, la condensación y disponibilidad espacial juegan un papel importante en su función. Para que Cas9 funcione como una proteína de unión que guíe un efecto no catalítico, se necesita

su variante mutada dCas9. Esta última es conjugada con módulos efectores para lograr una multitud de efectos como lo son²:

Represión: La adición de proteínas de represión como KRAB permite el estudio simultáneo de fenotipos similares con ausencia de cambios mutacionales pero diferente expresión proteica².

Inducción: Proteínas como la VP64 unidas al dCas9 promueven el ensamblaje de la maquinaria transcripcional, permitiendo así la observación de una vía celular u otra por previa inducción de esta².

Visualización: La unión de dCas9 a un fluoróforo permite el seguimiento en vivo de la secuencia diana, útil para localizar organización cromosomal intracelular².

Regulación exógena: Es posible gracias al puente rico en arginina la inserción de un segmento de impedimento de ensamblaje entre los lóbulos de Cas9. Este segmento puede ser sensible tanto a químicos como doxiciclina o a la luz de 450 nm a 48 lúmenes, dando como resultado que el corte solo se dé posterior a un estímulo exógeno²³.

Epigenética: Adición de enzimas acetiltransferasas y metilasas la alteración dirigida del estado epigenético del genoma, dando la capacidad de manipular la disponibilidad de segmentos específicos al modificar su condensación².

Edición de bases: La proteína citosina desaminasa guiada por una dCas9 es capaz de catalizar la eliminación de un grupo amino en la citosina convirtiéndola en uracilo. El par de U-G se somete a la maquinaria de reparación celular y pasa a U-A, posteriormente se repara a T-A. Permitiendo la reparación de mutaciones puntuales sin la necesidad de causar cortes en la cadena de ADN. De igual manera, se puede editar A-T a C-G por desaminación de la adenina y la detección del producto, inosina, como una guanina por la maquinaria de reparación celular³.

Edición de ARN: Si a la célula se le administra un fragmento PAM correspondiente a la proteína Cas9, PAMmero, esta adquiere la capacidad de

unirse y cortar RNA monocatenario. En el proceso, Cas9 se vuelve mucho más exigente en cuanto a la cantidad de nucleótidos que deben ser complementarios en el dúplex. Igual que este, existen muchos otros métodos alternos para convertir Cas9 y otros ortólogos en herramientas de edición de ARN, como la modificación de la proteína para aumentar su actividad intrínseca anti-ARN²⁴.

La edición génica es más que solo cambiar el genoma, hay que hacer que ese cambio sea sostenible

Varios factores afectan la eficacia de un cambio en el genoma, sea del tipo mutacional o no. Antes que nada, se debe definir el efecto terapéutico esperado por la alteración realizada. El principal indicador de éxito en la terapia será el estado de "bienestar" de la célula receptora, si estas tienen un aumento neto de sus capacidades en general, serán más aptas que las demás células de su medio y su replicación preferente causarán que sea necesario una menor población editada para lograr el efecto terapéutico. Un ejemplo de esto son las células hematopoyéticas con IL2RG funcional que tienen mayor capacidad proliferativa en relación con las que tienen un *knockout* en este gen¹⁸.

El otro factor mayor que determina la eficacia de una manipulación mutacional es la preferencia por una vía de reparación u otra. El método más difícil de lograr es la recombinación homóloga y mientras mayor sea el tamaño del segmento a insertar, menos probabilidades hay de que se dé. En ese mismo ámbito, si la reparación no destruye la secuencia diana, Cas9 volverá a escindir en el mismo sitio, dando indicios de mutagenicidad. Para aumentar la probabilidad de que se recombine, se puede aumentar la homología entre los extremos libres del molde y del segmento escindido. Como última medida, y preferencial para asegurar la integridad del proceso, se puede inhibir la vía NHEJ, aunque no se conoce que tan seguro sea este procedimiento¹⁸.

HORIZONTES

CRISPR se perfila como la estrategia terapéutica ideal

Dado el rol central que tiene el ADN en la biología, su manipulación terapéutica parece una frontera viable para tratar patologías asociadas a expresión génica. Las mutaciones patológicas son muy variadas y cada una recibe un modelo terapéutico específico:

Mutaciones de ganancia de función como ejemplo están el gen *HTT* en la enfermedad de Huntington y el gen *FGFR3* en la acondroplasia, como tratamiento, se induce NHEJ para inactivar el alelo mutante e inducir la expresión del alelo intacto en el cromosoma homólogo¹⁸.

Mutaciones de expansión de nucleótidos como la enfermedad de Huntington y la ataxia de Friedreich se corrigen al inducir dos cortes bicatenarios en cada extremo de la inserción patogénica con posterior corrección por NHEJ¹⁸.

Mutaciones puntuales donde haya ganancia de función como el gen *SOD1 G93A* en la esclerosis lateral amiotrófica pueden ser confundidas con su versión sana en el cromosoma homólogo al momento de tratar de inducir un corte de "reparación". Por ello, se opta por inducir un reemplazo de todo el gen a través de recombinación homóloga donde se inserte una versión funcional no patológica de la secuencia¹⁸.

Mutaciones con pérdida de función como en la enfermedad de Tay-Sachs usan un modelo terapéutico similar donde se inserta una versión sana del gen. Esto permite reestablecer niveles fisiológicos de la expresión de la proteína implantada¹⁸.

Mutaciones asociadas a cambio de función sin aparición de un fenotipo patógeno son inducidas en casos como el receptor CCR5 en VIH y PCSK9 en hipercolesterolemia. En ambos casos, se disminuye la posibilidad de una infección o un cuadro patológico asociado respectivamente¹⁸.

Ataque de ADN extra-cromosomal como al genoma viral de hepatitis B o HIV, concediendo la capacidad de degradar secuencias conservadas en

virus específicos o fragmentos mediadores de su replicación¹⁸.

Los microorganismos resistentes son particularmente sensibles a Cas9

Las cepas altamente virulentas y fármaco resistentes de microorganismos son un problema latente en la medicina contemporánea. El uso indiscriminado de antibióticos ha llevado a las bacterias a desarrollar rápidamente una plétora de mecanismos para asegurar su supervivencia, el modelo terapéutico propuesto basado en edición génica plantea eliminar ese problema mediante la programación de Cas9 para que ejerza actividad citotóxica al tener como diana secuencias conservadas y específicas de las cepas resistentes. La especificidad del método promueve el ataque solo a patógenos, protegiendo el microbioma comensal²¹.

El cáncer es una diana compleja de edición génica

Las células T quiméricas receptoras de antígeno (CAR-T) son un invento innovador, se basan en la introducción de un gen que codifica una cadena artificialmente determinada. El fragmento variable de la cadena media la especificidad hacia cualquier marcador de superficie deseado, esto aprovechando la capacidad de las células T de orquestar y dirigir la respuesta inmune. Hasta ahora, este método ha sido usado para atacar linfomas y leucemias, pero hay prospectos de su uso en tumores sólidos. Diferentes moléculas han sido usadas como objetivos y estas tienen como característica su sobreexpresión en procesos tumorales, algunos ejemplos de estas son: CD19, Her2/neu, mesotelina cMet, GD2, receptor de interleucina 13 alfa 2 y el receptor de crecimiento epidermoide. Todas las moléculas previamente descritas están en diferentes fases de estudios clínicos²¹.

La generación de modelos transgénicos se facilitó grandemente

A nivel académico, CRISPR-Cas9 tuvo uno de sus picos de utilidad. Previo a este, la generación de un modelo animal transgénico, que es un espécimen genéticamente modificado, era un proceso que tomaba de meses a años. Los estudios más ambiciosos se veían limitados por los recursos materiales y humanos necesarios para observar unos pocos fenotipos de forma simultánea. Cas9 permite la creación de modelos de animales transgénicos por inyección directa de cigotos para lograr la presencia de la mutación en todo el organismo. La diferencia radica en la rapidez y sencillez con la cual se realiza este proceso, hasta el punto donde se pueden hacer estudios poligénicos sin incurrir en gastos comparables a los correspondientes con el uso de métodos previos. El estudio del componente génico de enfermedades multifactoriales se facilita por la capacidad de manejar mayor cantidad de modelos con muchas mutaciones y solo diferencias genéticas puntuales entre él⁷.

Mucho se ha dilucidado sobre la función de largos segmentos de material genético no codificante. CRISPR-Cas9 es la herramienta ideal para la manipulación de fragmentos no codificantes y observar el efecto que tiene la presencia o modificación de estos sobre el organismo modelo. Mantener una imagen en vivo de la organización del material genético y compararlo con la actividad transcripcional permitirá entender mejor el fenómeno de compromiso a una línea celular, siguiendo la misma idea, dando posibilidad a inducción de pluripotencialidad *in vivo*⁷.

El potencial terapéutico de las células pluripotentes no puede ser subestimado. La edición del gen *CFTR* de la fibrosis quística en células pluripotenciales inducidas dio como resultado la proliferación de un fenotipo funcional capaz de disminuir las manifestaciones clínicas *in vitro*. Si la inducción y edición se diesen

simultáneamente *in vivo*, enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne asociada a un defecto en la distrofina, cataratas asociada a defecto de la *Crygc*, tirosinemia y la anemia de Fanconi pudieran ser erradicadas eficientemente^{7,21}.

Observar los estímulos celulares de forma individual permite conocer como interacciona esta con lo exógeno

Uno de los usos más novedosos del sistema Cas9 ha sido la creación de un sistema de seguimiento intracelular altamente sensible, CAMERA1, permitiendo el estudio de los cambios intracelulares secundarios a un estímulo en específico. Para esto se introduce un plásmido que normalmente se replica unos cientos de veces dentro de las bacterias. Este plásmido contiene una secuencia diana de Cas9, pero esta última está condicionada a solo funcionar en presencia de un químico que funge como el estímulo. Cada exposición al estímulo que puede ser, por ejemplo, un antibiótico, causa la degradación del plásmido por la ausencia de mecanismos de reparación eficientes en bacterias. Otro plásmido funcional se replicará para sustituir el dañado, alterando la proporción de plásmidos funcionales o degradados. Esta información es analizada y permite observar qué tanto se expuso esa población en específica al fármaco, que puede compararse a la vez con qué tanto antibiótico se administró para saber la penetrabilidad de este a la célula²⁵.

Un método parecido, pero empleando el uso de edición de bases permite ampliar la sensibilidad hasta a 4 estímulos diferentes (uno por cada base a editar) y el establecimiento de un orden cronológico de estos establecido por la presencia de la alteración en la secuencia. Este sistema recibe el nombre de CAMERA2 y sus prospectos incluyen el estudio de los dinámicos cambios del microbioma para entender cómo varía está en exposición a estímulos puntuales²⁵.

Una industria biológica se abre camino a partir de CRISPR-Cas9

El uso de microorganismos para la generación de moléculas biológicas con utilidad comercial no es un concepto nuevo, se ha usado desde los inicios de la ingeniería genética para la síntesis de: insulina, isopropanol, terpenoides, aminoácidos, antibióticos entre otros. Estudios recientes demostraron que la aplicación de Cas9 sobre estos microorganismos aumentan la eficiencia de síntesis hasta en un 100%. Para lograr esta eficiencia hay diferentes métodos, todos con el fin de priorizar una ruta metabólica sobre otras. *E. coli* es un microorganismo muy estudiado en el ámbito y se toma como base para plantear las siguientes soluciones: antes que todo se inserta la maquinaria enzimática que promueve el paso de sustrato a producto, posteriormente, se prioriza esta vía al inducir una sobreexpresión las enzimas exógenas y las responsables de la maquinaria energética celular con consecuente disminución de otras vías endógenas. Para disminuir la interferencia de otras rutas metabólicas que compartan sustrato o sean muy energéticamente exigentes, se pueden provocar deleciones de las enzimas responsables de estas. Otra posibilidad es el mejoramiento del contenido lipídico de *E. coli* al integrar factores de transcripción asociados a la regulación de ácidos grasos junto a una delta 9 desaturasa y acetil-CoA carboxilasa, esto resulta en una capacidad

aumentada de almacenamiento de la célula al saturar su citoplasma de producto final sin causar rotura membranal, gracias al elevado contenido de componentes lipídicos en la membrana²⁶.

Estos métodos de aumento de productividad se pueden aplicar a la síntesis de cualquier material biológico, creando una maquinaria eficiente cuyo combustible es glucosa, sin descartar la posibilidad de darle la capacidad de degradar otros componentes de desecho como fuente energética. CRISPR-Cas9 es la herramienta que pondrá todo el potencial de la edición génica sobre microorganismos a merced de la humanidad.

CONCLUSIÓN

Descubierto como un sistema de defensa procarionte y adaptado como un modelo de edición génica, CRISPR-Cas9 se perfila como una de las herramientas más importantes de manipulación biológica hoy en día. Su uso ofrece solución definitiva a varios procesos patológicos, solo superado por la plétora de aplicaciones académicas e industriales. La caracterización de este modelo de edición génica despierta curiosidad si el próximo hito de la biología está en alguna esquina no explorada de la diversidad biológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martinez-Lage M, Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR/Cas9 Technology: Applications and Human Disease Modeling. *InProgress in molecular biology and translational science* 2017 Jan 1 (Vol. 152, pp. 23-48). Academic Press.
2. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature biotechnology*. 2016 Sep;34(9):933.
3. Kim JS. Precision genome engineering through adenine and cytosine base editing. *Nature plants*. 2018 Feb 26:1.
4. Guha TK, Edgell DR. Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Nov 29;18(12):2565.
5. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Sep;11(9):636.
6. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology*. 2011;29(2):135-136 y Guha TK, Edgell DR. Applications of Alternative Nucleases in the Age of CRISPR/Cas9. *International journal of molecular sciences*. 2017 Nov 29;18(12):2565.
7. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262-78.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821.
9. Karginov F, Hannon G. The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. *Molecular Cell*. 2010;37(1):7-19.
10. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016;371(1707):20150496.
11. Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and molecular life sciences*. 2014 Feb 1;71(3):449-65.
12. Chen J, Doudna J. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nature Reviews Chemistry*. 2017;1(10):007.
13. Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. Anti-CRISPR: Discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*. 2018 Jan;16(1):12.
14. Richter C, Chang J, Fineran P. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses*. 2012;4(10):2291-2311.
15. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature*

- Reviews Microbiology. 2015 Nov;13(11):722.
16. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. Annual review of biophysics. 2017 May 22;46:505-29.
 17. Ciccia A, Elledge S. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Molecular Cell. 2010;40(2):179-204
 18. Cox D, Platt R, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nature Medicine. 2015;21(2):121-131.
 19. Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. Molecular cell. 2015 May 21;58(4):568-74.
 20. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Dejene B, Gomez-Ospina N, Mantri S, Pavel-Dinu M, Camarena J, Weinberg KI, Porteus MH. Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. bioRxiv. 2018 Jan 1:243345.
 21. Ren J, Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. Protein & Cell. 2017;8(9):634-643.
 22. Lee K, Conboy M, Park H, Jiang F, Kim H, Dewitt M et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. Nature Biomedical Engineering. 2017;1(11):889-901.
 23. Polstein LR, Gersbach CA. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. Nature chemical biology. 2015 Mar;11(3):198.
 24. O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature. 2014 Dec;516(7530):263. Y Strutt, S., Torrez, R., Kaya, E., Negrete, O. and Doudna, J. (2018). RNA-dependent RNA targeting by CRISPR-Cas9. eLife, 7
 25. Ledford H. CRISPR hack transforms cells into data recorders. Nature. 2018;554(7693):414-415.
 26. Mougiakos I, Bosma EF, Ganguly J, van der Oost J, van Kranenburg R. Hijacking CRISPR-Cas for high-throughput bacterial metabolic engineering: advances and prospects. Current opinion in biotechnology. 2018 Apr 30;50:146-57.

FIGURAS

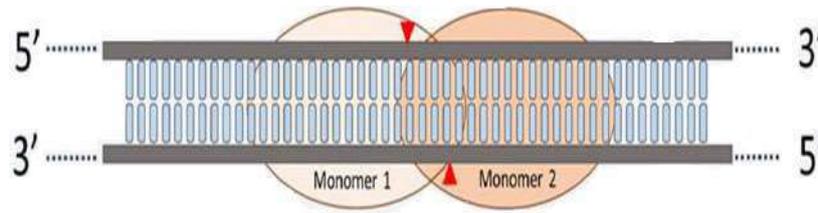


Figura 1. Meganucleasas. Dos meganucleasas individuales se unen a próximas una a la otra y causan un corte de extremos cohesivos. Sustraída de Romay G, Bragard C. *Antiviral defenses in plants through genome editing. Frontiers in microbiology. 2017 Jan 23;8:47.*

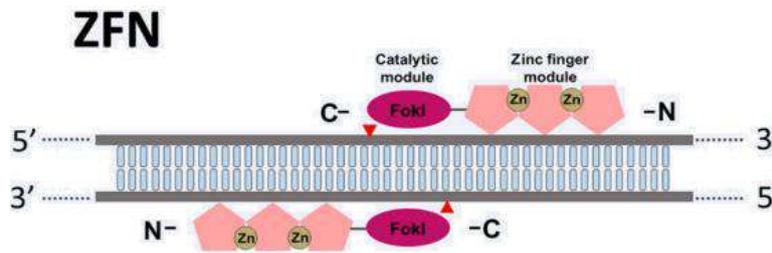


Figura 2. Nucleasas dedos de zinc. El corte se da por 2 nucleasas que se unen a cada cadena de ADN. El reconocimiento se da por motivos dedo de zinc que median reconocimiento a 3 nucleótidos sucesivos, la actividad nucleasa es por los dominios FokI, que al dimerizar con su contraparte, causa escisión de ambas cadenas. Sustraída de Romay G, Bragard C. *Antiviral defenses in plants through genome editing. Frontiers in microbiology. 2017 Jan 23;8:47.*

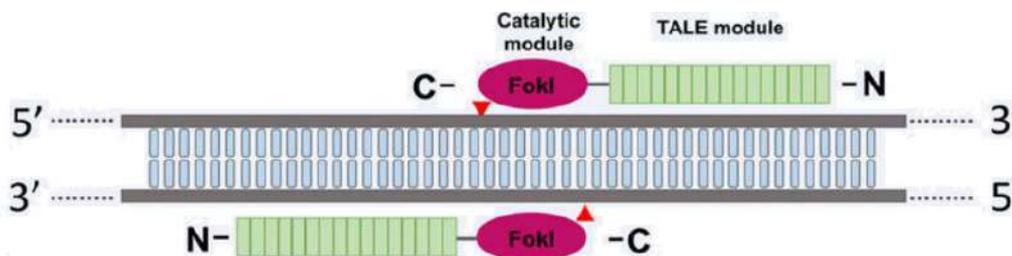


Figura 3. TALENs. Las TALENs median reconocimiento siendo cada dominio afín a un nucleótido específico en sucesión. La actividad nucleasa está a cargo de dos dominios FokI, uno en cada cadena de ADN, que cuando entran en contacto y se dimerizan, causan la escisión bicatenaria. Sustraída de Romay G, Bragard C. *Antiviral defenses in plants through genome editing. Frontiers in microbiology. 2017 Jan 23;8:47.*

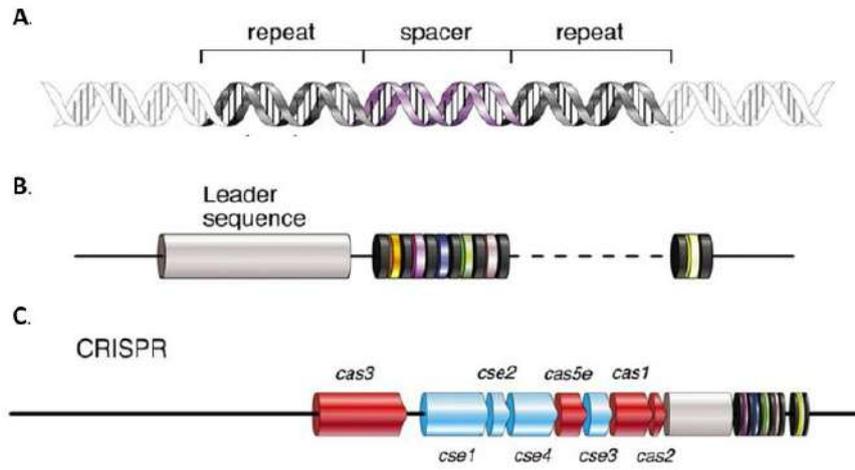


Figura 4. CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. A) Las secuencias espaciadoras contienen la ADN exógeno incorporado que transcribirá a crARN. Las secuencias espaciadoras se intercalan con secuencias de repetición de por medio. B) Una secuencia líder no codificante precede al conjunto de combinaciones de secuencias espaciadoras y secuencias de repetición. C) El locus CRISPR está compuesto en orden por las proteínas Cas, la secuencia líder y el conjunto de repeticiones de secuencias de repetición y espaciadoras. Sustraída de Karginov FV, Hannon GJ. *The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. Molecular cell.* 2010 Jan 15;37(1):7-19 y modificada por Anthony Gutiérrez.

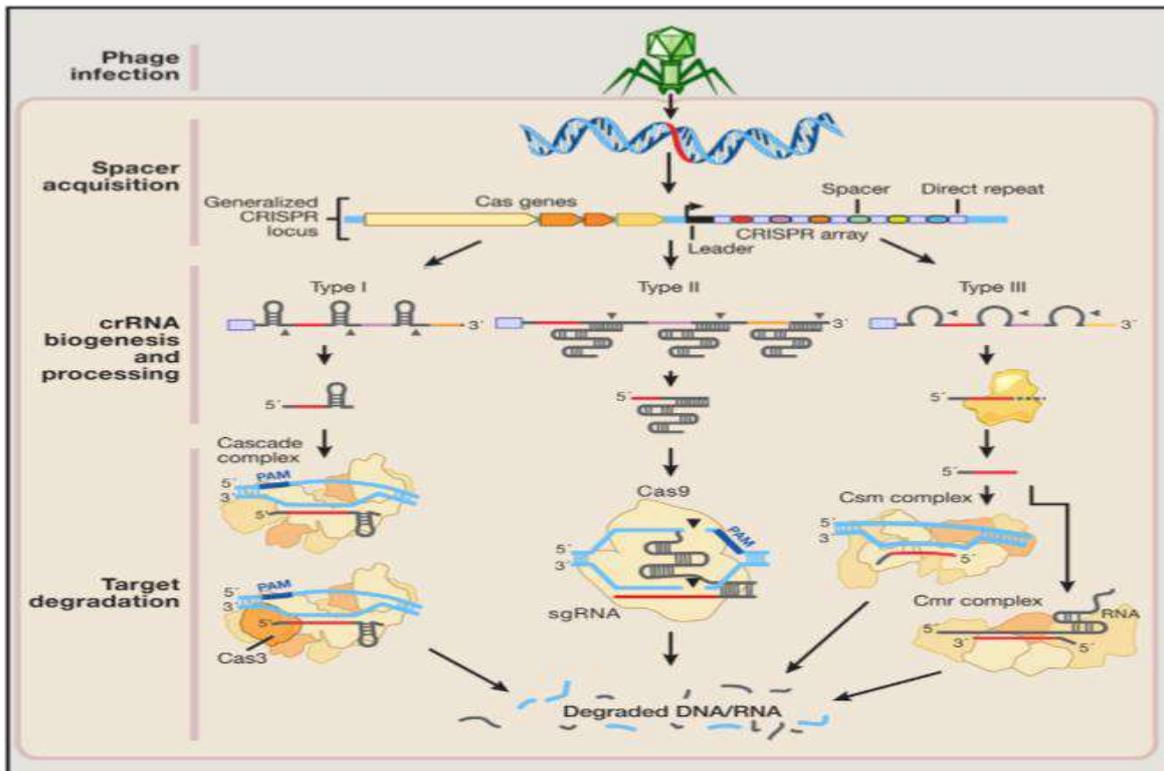


Figura 5. CRISPR: sistema inmune adaptativo bacteriano. En el proceso de inmunidad adaptativa procarionte primero el fago invade la bacteria, si la bacteria sobrevive, en la fase de adaptación incorpora el material genético viral al locus CRISPR como secuencia espaciadora. Luego, en la fase de biogénesis del crARN se transcribe el ARN que se unirá al complejo efector para su activación. En la fase de interferencia, el complejo efector conformado por proteínas Cas y crARN escinde material genético complementario al especificado por su crARN. Sustraída de Hsu PD, Lander ES, Zhang F. *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1262-78.

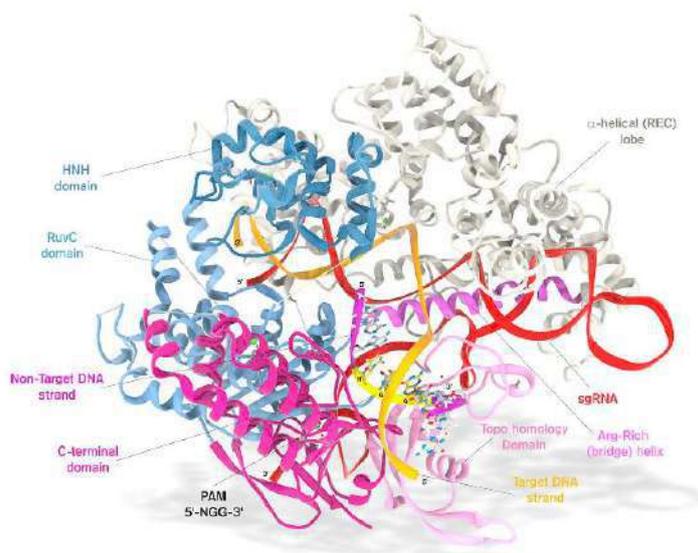


Figura 6. Estructura de Cas. Está compuesta por dos lóbulos, uno de reconocimiento y otro nucleasa. El primero está compuesto por tres dominios Hel (I, II y III) y el segundo por dos dominios nucleasas, HNH y otro RuvC. Ambos lóbulos están unidos por un puente rico en arginina y un segmento de unión desorganizado. El lóbulo de reconocimiento interactúa con el crARN, el lóbulo nucleasa escinde el ADN y el dominio C terminal en el lóbulo nucleasa reconoce el PAM. Sustraída de *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease.* Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., Jinek, M. (2014) *Nature* 513: 569



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
 UNIDAD TÉCNICO ASESORA DE INVESTIGACIÓN

ANALES DE MEDICINA PUCMM

Guía para la Elaboración del Manuscrito de Publicación

El propósito de esta guía es ofrecer los requerimientos mínimos para la publicación de artículos de investigación en la revista de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra.

Normas Generales

Los artículos que se someten a la revista deben ser originales o artículos de revisión y deben remitirse de la siguiente manera:

- El manuscrito debe enviarse al correo analesdemedicina@pucmm.edu.do como un documento de Microsoft Word y debe escribirse a doble espacio en todas las secciones. Todas las páginas, incluyendo la del título, deben ser enumeradas.
- El texto del manuscrito debe estar escrito en español o en inglés.
- Las tablas, ilustraciones o figuras y los gráficos deberán presentarse individualmente en una hoja, con sus respectivos títulos y leyendas, enumeradas y a espacio doble. En el caso de las figuras o ilustraciones, deberán obtenerse los permisos correspondientes para su uso, en caso que no sean de la propia autoría de los autores. Se recomienda un máximo de 6 por artículo.
- Se espera que el manuscrito no contenga más de 4,000 palabras (artículo original) o 5,000 palabras (artículo de revisión), sin incluir el resumen analítico/abstract, referencias, tablas, figuras, ilustraciones y gráficos.

Artículos Originales

El manuscrito que se somete para publicación, tanto de estudios observacionales como experimentales, debe estar organizado en las siguientes secciones: introducción, métodos, resultados y discusión.

El contenido del manuscrito es como se muestra a continuación:

- **Página de presentación.**
 - I. **Título del artículo.** Utilice un título conciso que facilita la lectura. También es necesario que sea un título llamativo, que capte la atención del lector y que represente el enfoque de la investigación. Se recomienda utilizar una terminología

que aumente la sensibilidad y la especificidad en la búsqueda. No se recomiendan títulos muy cortos porque pueden obviar información importante.

2. **Nombres de los autores y sus afiliaciones.** En el caso de las tesis de grado, es mandatorio enlistar como afiliación la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra.
 3. **Nombre del Departamento y la institución** a la cual será atribuido el trabajo. En el caso de las tesis de grado, es mandatorio nombrar a la Escuela y a la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra.
 4. **Información de contacto** del primer autor o del autor por correspondencia.
 5. **Fuente de financiamiento.**
 6. **Conteo de palabras.** No se incluyen en este conteo: resumen analítico (abstract), agradecimientos, leyendas y referencias.
 7. **Cantidad de figuras y tablas.**
- **Declaración de conflicto de intereses**
Puede descargar el modelo del ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors), disponible en el siguiente sitio de internet: http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf. También puede redactar una comunicación tomando esta información de base.
 - **Resumen analítico/Abstract.** Es una parte muy importante del manuscrito. Debe estar escrito de forma clara, con suficiente detalle, tanto en español como en inglés. Para algunos este es la carta de presentación del artículo, ya que muchos lectores se refieren a él para buscar más información sobre el estudio; en otros casos, este es la única información a la que tienen acceso algunos lectores. De esta manera, es imprescindible que esta sección refleje el contenido del artículo con la mayor precisión posible. En el caso de las tesis de grado, por convención hemos adoptado un total de 250 palabras para los estudios descriptivos y los estudios observacionales; en el caso de ensayos clínicos o estudios experimentales se permitirá hasta 300 palabras. Deberá incluir: introducción, métodos, resultados, conclusión y palabras claves (3-5), estas últimas basadas en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS) o Medical Subject Headings (MeSH).
 - **Introducción.** Debe proveer de forma clara y precisa el contexto o los antecedentes del problema estudiado. Debe expresar el propósito o el objetivo del estudio o la hipótesis que se evalúa en el mismo. A menudo se prefiere presentar el objetivo del estudio como una pregunta. Utilice solo referencias que sean pertinentes y no incluya datos o conclusiones del trabajo que se está presentando en este artículo.
 - **Métodos.** Debe incluir la información que estaba disponible cuando se escribió el protocolo del estudio. Si apareciera algún dato durante o después del estudio, deberá referirse en la sección de resultados. Su contenido incluye, pero no se limita a:
 1. Descripción de la población estudiada y del proceso de selección. Es importante mencionar los criterios de inclusión y los criterios de exclusión y explicar por qué fueron delimitados. Es importante expresar cómo se midieron estos criterios y su relevancia para el estudio.
 2. Identifique los métodos, los equipos (incluyendo el nombre del fabricante), todos los procedimientos con suficiente detalle como para que se puedan reproducir los resultados. Si alguno de los métodos ha sido tomado de otros estudios, ofrezca las referencias adecuadas.
 3. Debe referir información y describir en detalle los métodos utilizados para encontrar, seleccionar, extraer y resumir los datos obtenidos.

4. En lo que refiere al tratamiento estadístico, debe detallarse lo suficiente como para que cualquier lector pueda tomar la información original y verificar los resultados que se reportan. Mencione el paquete estadístico utilizado. Debe incluir suficiente información sobre los resultados, no solo los estimados, sino las medidas de incerteza a su alrededor, esto es, los intervalos de confianza. No solo presente los resultados de la prueba de hipótesis.
- **Resultados.** Los resultados deben presentarse en un orden lógico. Utilice tablas, figuras. Presente los resultados más importantes al inicio. No describa todos los resultados de las tablas o de los gráficos en el texto, refiérase solo a los más relevantes. Es importante presentar los datos relativos y las cifras absolutas relacionadas. No presente los mismos datos en tablas y en gráficos.
 - **Discusión.** Debe presentar los aspectos novedosos y más relevantes del estudio y las conclusiones que se derivan de esta investigación a la luz del contexto en el que se realizó. No debe detallar ninguna información que ha sido presentada en la introducción ni en la sección de resultados. Puede ser beneficioso iniciar con un breve resumen de los datos y luego tratar de explicar estos hallazgos, comparar con la literatura existente, declarar las limitantes del estudio y las fortalezas. Es importante que se describan las implicaciones de estos hallazgos para futuras investigaciones, para la práctica clínica o para la salud pública.
 - **Referencias.** Utilice las Recomendaciones ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors).

Artículos de Revisión

El texto del manuscrito que se somete para publicación, tanto de estudios observacionales como experimentales, debe estar escrito en español y organizado en las siguientes secciones: introducción, métodos, resultados y discusión.

El contenido del manuscrito es como se muestra a continuación:

- **Página de presentación**
La página de presentación contendrá la información básica del artículo que aparecerá en la página inicial del documento. Debe de presentar:
 - **Título:** preferiblemente conciso e informativo. Se recomienda entre 8 a 12 palabras, como máximo. No debe ser un título resumido o abreviado, sino el título completo del artículo.
 - **Autores:** se debe incluir sus nombres y afiliaciones. Todas las afiliaciones deben estar indicadas con letra superíndice minúscula después del nombre de cada autor.
 - **Autor por correspondencia:** indicar claramente el autor determinado a manejar la correspondencia en todas las etapas de evaluación durante la publicación, así como después de ser publicado. Se debe asegurar de proporcionar la dirección de correo electrónico y de agregar datos de contacto actualizados.
- **Resumen**
Incluye una descripción de los temas cubiertos y/o una idea general del artículo. Esta es la información inicial que el lector revisará. Debe de ser preciso e informativo, tanto en español como en inglés. Se recomienda que este incluya entre 200-250 palabras. Inmediatamente después del resumen, proporcione un máximo de 6 palabras clave, evitando términos plurales y conceptos múltiples (evite, por ejemplo, "y", "de"). Estas

palabras clave se utilizarán para fines de indexación.

▪ **Abreviaturas (opcional)**

Puede definir las abreviaturas que no son estándar en este campo en una nota al pie que se colocará en la primera página del artículo. Tales abreviaturas que son inevitables en el resumen deben definirse en su primera mención allí, así como en la nota al pie. Asegure la consistencia de las abreviaturas a lo largo del artículo.

▪ **Tabla de contenido (opcional)**

Puede incluir una tabla (o índice) de contenido que facilite al lector la organización del texto y debe indicar la página por sección o título del artículo.

▪ **Cuerpo del artículo**

Debe señalar y diferenciar cada acápite del cuerpo del artículo: los títulos o secciones en negrita, y subtítulos o subsecciones en letra cursiva. Además, se recomienda dividir el artículo en secciones claramente definidas y numeradas en orden secuencial (1.1, 1.2, etc.), sin incluir el resumen. Se sugiere seguir el siguiente esquema general:

- **Introducción:** Incluye una descripción del tema y antecedentes relevantes de la revisión del tema.
- **Desarrollo:** Representa 70-90% de todo el texto.
- **Conclusión:** Establece las implicaciones de los hallazgos e identificar posibles nuevos campos de investigación.

▪ **Agradecimientos (opcional)**

Se pueden indicar los nombres completos de las personas, agencias o programas de financiamiento, así como sus contribuciones específicas al proyecto, si aplica.

▪ **Referencias**

Debe incluir por lo menos 25 referencias y deben estar organizadas por número en el orden en que fueron citadas en el texto. Utilice las Recomendaciones ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors).

Referencias bibliográficas

1. Nature. Formatting guide.
2. Mayer P. Guidelines for writing a Review Article. Plant Science Center. 2009
3. Axinthe D. International Journal of Machine Tools and Manufacture. Elsevier. 2017.
4. Organización Panamericana de la Salud. Instrucciones para los autores y pautas para la presentación de manuscritos. Revista Panamericana de Salud Pública.

