



# TECNOLOGÍA *en marcha*

Revista trimestral  
Setiembre 2019  
Volumen 32

ISSN-E 2215-3241

25  
Aniversario  
CIB

Número especial  
25 Aniversario del  
Centro de Investigación en Biotecnología

Publicación y directorio en catálogos

latindex

Dialnet

DOAJ

SciELO

REDIB  
Red Iberoamericana  
de Innovación y Conocimiento Científico

ET  
Editorial Tecnológica  
de Costa Rica

TEC | Tecnológico  
de Costa Rica

## Comisión Editorial

Ana Ruth Vilchez Rodríguez. Directora.  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

Juan Antonio Aguilar Garib  
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica  
Universidad Autónoma de Nuevo León.  
México

Carlos Andrés Arredondo Orozco  
Facultad de Ingenierías  
Universidad de Medellín. Colombia

Lars Köhler  
Experimenteller Botanischer Garten  
Georg-August-Universität Göttingen.  
Alemania

Jorge Solano Jiménez  
Instituto Costarricense del Cemento  
y del Concreto

## Edición técnica

Alexa Ramírez Vega

## Revisión filológica

Esperanza Buitrago Poveda

## Diseño gráfico

Felipe Abarca Fedullo

## Diagramación

Asesoría en Ediciones gráficas

## Diseño de cubierta

Felipe Abarca Fedullo

## Imagen de cubierta

M.Sc. Andrea Ulloa Fernández

## Datos de catalogación en publicación

Tecnología en Marcha / Editorial Tecnológica  
de Costa Rica. - Vol. 32. Especial setiembre  
(2019) -Cartago: la Editorial, 2019 -  
Trimestral  
ISSN-E 2215-3241

1. Ciencia y Tecnología -  
Publicaciones periódicas CDD:600



**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

Apdo 159-7050 Cartago, Costa Rica  
Tel.:(506) 2550-2297, 2550-2618  
Correo electrónico: editorial@itcr.ac.cr  
Web: editorial.tec.ac.cr  
[http://revistas.tec.ac.cr/tec\\_marcha](http://revistas.tec.ac.cr/tec_marcha)



**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

La Editorial Tecnológica de Costa Rica es una dependencia especializada del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Desde su creación, en 1978, se ha dedicado a la edición y publicación de obras en ciencia y tecnología. Las obras que se han editado abarcan distintos ámbitos respondiendo a la orientación general de la Institución.

Hasta el momento se han editado obras que abarcan distintos campos del conocimiento científico-tecnológico y han constituido aportes para los diferentes sectores de la comunidad nacional e internacional.

La principal motivación de la Editorial es recoger y difundir los conocimientos relevantes en ciencia y tecnología, llevándolos a los sectores de la comunidad que los requieren.

La revista *Tecnología en Marcha* es publicada por la Editorial Tecnológica de Costa Rica, con periodicidad trimestral. Su principal temática es la difusión de resultados de investigación en áreas de Ingeniería. El contenido de la revista está dirigido a investigadores, especialistas, docentes y estudiantes universitarios de todo el mundo.

## Publicación y directorio en catálogos



[www.latindex.unam.mx](http://www.latindex.unam.mx)



[dialnet.unirioja.es](http://dialnet.unirioja.es)



<http://www.doaj.org/>



<http://www.scielo.org/>



<https://redib.org>



Revista trimestral.  
Especial 2019.  
25 Aniversario del Centro  
de Investigación en Biotecnología

ISSN 0379-3982 / ISSN-E 2215-3241

# **TECNOLOGÍA** *en marcha*

## Contenido

Presentación .....	3
Proceso Visionario hacia el Desarrollo Biotecnológico Visionary Process towards Biotechnological Development <i>Elizabeth Arnáez-Serrano, Ileana Moreira-González, Silvana Alvarenga-Venutolo, Ana Abdelnour-Esquivel, Dora Flores-Mora, Miguel Rojas-Chaves</i> .....	6
Investigaciones en plantas con potencial bioactivo Investigations on plants with bioactive potential <i>Catalina Rosales-López, Elizabeth Arnáez-Serrano, Ileana Moreira-González, Giovanni Garro-Monge, Ana Laura Agüero-Hernández, Karol Jiménez-Quesada, Ana Abdelnour-Esquivel, Laura Calvo-Castro.</i> .....	12
Investigaciones en Cultivos Frutícolas No Tradicionales en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica Research in No Traditional Fruit Crops at the Biotechnology Research Center of Costa Rica Institute of Technology <i>Alexander Schmidt-Durán, Carlos Alvarado-Ulloa, Randall Chacón-Cerdas, Dora Flores-Mora</i> .....	22
Optimización de un protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de embriones de Coyol ( <i>Acrocomia aculeata</i> ) Optimization of an <i>in vitro</i> culture protocol of Coyol embryos ( <i>Acrocomia aculeata</i> ) <i>Katherine Sánchez-Zúñiga, Elizabeth Arnáez-Serrano, Ileana Moreira-González, Guillermo Vargas-Hernández</i> .....	30
Contribuciones al Desarrollo Forestal de Costa Rica Contributions to Forest Development of Costa Rica <i>Elizabeth Arnáez-Serrano, Ileana Moreira-González</i> .....	36
Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial Bioprocesses in biotechnology: use of bioreactors for the production and scaling of products of commercial interest <i>Catalina Rosales-López</i> .....	41

Implementación de las técnicas de RMN y cristalografía de macromoléculas para la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico Implementation of NMR and macromolecular crystallography techniques for structural characterization of proteins of biomedical interest <i>Silvia Arce-Solano, Erick Hernández-Carvajal</i> .....	47
Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina Cell Culture and Tissue Engineering: Biomedical Applications <i>Johan Morales-Sánchez, Andrea Ulloa-Fernández, Silvia Castro-Piedra, Carolina Centeno-Cerdas, Laura A. Calvo-Castro</i> .....	56
Biología para el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas y la búsqueda de nuevos tratamientos: caso de las neuregulinas Biotechnology for the study of neuropsychiatric diseases and the search for new treatments: case of neuregulins <i>María Clara Soto-Bernardini</i> .....	66
Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico <i>Brucella abortus</i> realizados en el CIB Interuniversity and multidisciplinary research projects about the zoonotic pathogen <i>Brucella abortus</i> developed in the CIB <i>Olga Rivas-Solano</i> .....	77
Biología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional Microalgal biotechnology in Costa Rica: Business opportunities to the national productive sector <i>Fabián Villalta-Romero, Francinie Murillo-Vega, Bernal Martínez-Gutiérrez, Johnny Valverde-Cerdas, Andrés Sánchez-Kopper, Maritza Guerrero-Barrantes</i> .....	85
<i>Helicobacter pylori</i> en Costa Rica, más de una década de investigaciones <i>Helicobacter pylori</i> in Costa Rica, more than a decade of research <i>Virginia Montero-Campos</i> .....	94
Proyectos relacionados con diversidad, ecología, desplazamiento, virulencia y potencial biotecnológico de cepas de <i>Listeria</i> spp. aisladas en Costa Rica a partir de muestras alimentarias, clínicas y ambientales Research projects about diversity, ecology, movement, virulence and biotechnological potential of <i>Listeria</i> spp. isolated in Costa Rica from food, clinic and environmental samples <i>Kattia Núñez-Montero, Rossy Guillén-Watson, Olga Rivas-Solano, Johnny Peraza-Moraga</i> .....	104
Los insectos y la biología: avispas sociales como fuente de nuevos compuestos antibióticos Insects and biotechnology: social wasps as a source for novel antibiotic compounds <i>Laura Chavarría-Pizarro</i> .....	114
Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la producción agrícola Biocontrol Laboratory: Research linked to agricultural production <i>William Rivera-Méndez, Jaime Brenes-Madriz, Claudia Zúñiga-Vega</i> .....	121

# Presentación

Miguel Rojas-Chaves<sup>1</sup>, Mauricio Chicas-Romero<sup>2</sup>,  
Laura A. Calvo-Castro<sup>3</sup>

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), adscrito a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), se localiza en la zona este del Campus Central del TEC, en el Cantón Central de la provincia de Cartago, Costa Rica. Actualmente cuenta con 14 laboratorios especializados en tres áreas generales de Biotecnología (cuadro 1), un campo experimental frutícola, un invernadero y dos estanques para cultivo de microalgas a gran escala (20.000 L), ocupando una superficie de 15 mil metros cuadrados (figura 1).



**Figura 1.** Fotografía área del Centro de Investigación en Biotecnología. Detrás del edificio principal se encuentra la zona de microalgas y a la derecha el campo frutícola.

- 1 Microbiólogo. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: mirojas@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-4770-5003>
- 2 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: mchicas@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-5046-1740>
- 3 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ancalvo@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

**Cuadro 1.** Áreas de investigación del Centro de Investigación en Biotecnología (2019).

Área	Temas	Líneas de investigación
Biotecnología Ambiental	Bio-energía	Cultivos bio-energéticos y micro-algales.
	Bioprospección	Bioprospección con micro y macro-organismos para soluciones ambientales.
	Escalamientos microbianos	Escalamiento de microorganismos para obtener biomasa y compuestos bioactivos de interés.
	Ecología microbiana	Estudio de comunidades microbianas de potencial agrícola y ambiental. Inducción de resistencia en plantas. Control biológico de plagas y enfermedades.
Biotecnología Vegetal	Cultivo de tejidos vegetales	Micropropagación, embriogénesis somática, suspensiones celulares.
	Uso y conservación de recursos fitogénéticos	Crioconservación, apoyo al mejoramiento genético, conservación a mediano plazo.
	Ingeniería genética	Transformación genética.
	Bioprospección	Producción de metabolitos secundarios, bioprocesos, fitoquímica, bioactividad de metabolitos vegetales.
Aplicaciones Biomédicas	Bioquímica y biología estructural de proteínas	Proteínas de interés biotecnológico y biomédico con miras al desarrollo de fármacos alternativos.
	Modelos de regulación génica	Circuitos de regulación génica para comprender mecanismos fisiológicos y patológicos.
	Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa	Procesos biológicos y estrategias que restauren, mejoren o reemplacen tejidos dañados u órganos, con fines terapéuticos y de investigación.
	Biofuncionalidad	Sustancias o estímulos novedosos de origen natural o artificial con potenciales aplicaciones en salud humana.
	Toxicología	Riesgo de agentes con potencial tóxico para humanos.

El CIB inició sus funciones en el año 1994, gracias al esfuerzo de un pequeño, pero soñador grupo de investigadores con la visión de “ser un centro de investigación y transferencia que utiliza la biotecnología para el mejoramiento de la calidad de vida”. Inicialmente se enfocó en el área Vegetal, luego se estableció el área Ambiental y finalmente el área de Aplicaciones Biomédicas. Asimismo, el CIB también colabora con otros programas y grupos de investigación del TEC y de otras universidades a nivel nacional e internacional, en temas tales como nuevos materiales, microscopía electrónica y tecnologías de radiación, contribuyendo con soluciones integrales en los campos agroindustrial, alimentario, silvicultura, ambiente, bioenergías y biomedicina.

Actualmente, en el CIB se desarrollan 33 proyectos de investigación multidisciplinarios, en los cuales participan 34 profesores investigadores de la Escuela de Biología y colaboradores de otros centros de investigación y empresas nacionales e internacionales, así como 95 estudiantes asistentes. Además, se desarrollan ocho proyectos de estudios doctorales y diversas tesis de grado (mayoritariamente de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología, IBio).

La actual dinámica de las investigaciones conlleva la participación de al menos dos estudiantes asistentes en cada proyecto. Este esquema ha sido muy provechoso para capacitar jóvenes profesionales, quienes adquieren una excelente destreza técnica y logística para desempeñarse en labores de laboratorio, contribuyendo a la inserción de este valioso recurso humano en numerosas empresas a nivel nacional e internacional, y mostrando un particular incremento de participación de los graduados de IBio en las industrias biomédicas, de dispositivos médicos y farmacéutica.

Hoy en día, el CIB es uno de los centros de investigación más grandes del TEC, tanto en infraestructura como en personal científico. Sin embargo, afronta múltiples retos para la consecución de recursos en un ambiente económico restrictivo y para la implementación efectiva de estrategias de transferencia de tecnologías al competitivo mercado nacional e internacional. Con miras a los enormes desafíos que enfrentará el planeta en las siguientes décadas, especialmente en las áreas de alimentación, salud y medio ambiente, será misión del CIB continuar aportando soluciones sustentadas en múltiples aplicaciones de la biotecnología.

# Proceso Visionario hacia el Desarrollo Biotecnológico

## Visionary Process towards Biotechnological Development

Elizabeth Arnáez-Serrano<sup>1</sup>, Ileana Moreira-González<sup>2</sup>,  
Silvana Alvarenga-Venutolo<sup>3</sup>, Ana Abdelnour-Esquivel<sup>4</sup>,  
Dora Flores-Mora<sup>5</sup>, Miguel Rojas-Chaves<sup>6</sup>

Arnáez-Serrano, E; Moreira-González, I; Alvarenga-Venutolo, S; Abdelnour-Esquivel, A; Flores-Mora, D; Rojas-Chaves, M. Proceso Visionario hacia el Desarrollo Biotecnológico. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32 Especial. Setiembre 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 6-11.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4614>

- 1 Costarricense. Bióloga. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [earnaez@tec.ac.cr](mailto:earnaez@tec.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0003-4058-4429>
- 2 Costarricense. Bióloga. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Profesora pensionada. Presidenta del Colegio de Biólogos de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [ilea2757@gmail.com](mailto:ilea2757@gmail.com)  
 <https://orcid.org/0000-0001-9426-0986>
- 3 Costarricense. Bióloga. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Profesora pensionada.
- 4 Costarricense. Ingeniera Agrónoma. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [aabdelnour@tec.ac.cr](mailto:aabdelnour@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0002-8951-685>
- 5 Costarricense. Ingeniera Agrónoma. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Profesora pensionada. Correo electrónico: [doramariafloresm@gmail.com](mailto:doramariafloresm@gmail.com)
- 6 Costarricense. Microbiólogo. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [mirojas@tec.ac.cr](mailto:mirojas@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0002-4770-5003>



## Palabras clave

Biotecnología; biomedicina; biotecnología ambiental; biotecnología vegetal; desarrollo de la biotecnología.

## Resumen

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), creado en 1994, es la unidad de investigación de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Como ente investigador, el CIB ofrece a la sociedad una serie de servicios técnicos especializados, como producto del conocimiento obtenido a lo largo de una cantidad creciente de proyectos de investigación, que se han desarrollado enfocados en las tres áreas de investigación: Biotecnología Vegetal, Biotecnología Ambiental y Aplicaciones Biomédicas. Durante los 25 años de su funcionamiento, los investigadores han mostrado un fuerte compromiso para generar ciencia y tecnología con impacto a nivel nacional e internacional. Adicionalmente, las diferentes iniciativas de cooperación entre este centro y otras instituciones son una muestra clara de la dinámica de crecimiento de esta unidad de investigación, tanto en el número de proyectos como en el nivel de los mismos, siendo referente a nivel nacional y regional.

## Keywords

Biotechnology; biomedicine; environmental biotechnology; plant biotechnology; development of biotechnology.

## Abstract

The Biotechnology Research Center (CIB), created in 1994, is the research unit of the School of Biology of the Costa Rica Institute of Technology. As a research entity, CIB offers a series of specialized technical services, which resulted from the knowledge gained through a growing number of research projects developed on three research fields: Plant Biotechnology, Environmental Biotechnology and Biomedical Applications. During the 25 years of its operation, researchers at CIB have shown a strong commitment towards creating science and technology with national and international impact. Additionally, the different cooperation initiatives between this center and other institutions are a clear example of the growth dynamics of this research unit, both in the number of projects and their scientific level, thus becoming a reference at national and regional level

## Introducción

La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos [1]. Basada en esta definición, la existencia de esta disciplina se remonta a miles de años atrás con la fabricación de cervezas, quesos y vinos, el cultivo de vegetales, así como el uso doméstico de animales. Aunque el término fue acuñado por el Ingeniero Agrónomo Karl Ereky en 1917, su empleo se popularizó en la década de los años 70 al empezar la manipulación genética de organismos [2]. En Costa Rica, comienzan esfuerzos aislados en instituciones públicas y empresas privadas en la década de los ochenta, esencialmente en la biotecnología vegetal [2]. De manera visionaria, se funda en 1994 en el TEC, el primer centro costarricense dedicado a la investigación en biotecnología; asimismo, tres años después se

abre la carrera de Ingeniería en Biotecnología. Biotecnología fue ubicada como uno de los pilares de desarrollo en la Estrategia Siglo XXI en el 2006 [3]; fue decretada de interés nacional en el 2012; y es uno de los sectores estratégicos escogidos para el desarrollo de las zonas francas. Adicionalmente se estableció como una de las áreas prioritarias de Planes Nacionales de Ciencia, Tecnología e Innovación 2011-2014 y 2015-2021 [4] [5].

La vocación investigativa del cuerpo docente de la Escuela de Biología consolidó el CIB, mediante la formulación y realización creciente de proyectos, de los cuales se han realizado 119 solo en la última década. A continuación se presenta una sinopsis, donde se relata el proceso del desarrollo de la biotecnología en el Instituto Tecnológico de Costa Rica.

## Creación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)

A partir de 1976 se iniciaron las carreras de ingeniería en el campo agroforestal en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC); desde entonces, se impartieron cursos de biología y genética, gracias a biólogos que laboraban en el denominado Departamento de Química (hoy Escuela de Química). En 1982 fue creada la denominada “Área de Biología” con dos funcionarios: Benjamín Mora (como Coordinador) y Silvana Alvarenga, la cual amplió su oferta académica y conllevó por ello a contratar más biólogos. Además, los funcionarios de esta área realizaron esfuerzos para promover y desarrollar investigaciones conjuntas, con académicos de otras disciplinas y escuelas del TEC, que se iniciaron formalmente en 1986, con la participación de Benjamín Mora y Elizabeth Arnáez en proyectos de investigación y extensión en el campo ambiental, en colaboración con profesionales de las Escuelas de Química y de Cultura y Deporte del TEC.

En el año 1987, la bióloga Silvana Alvarenga inicia su capacitación en cultivo de tejidos vegetales en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Extensión (CATIE), donde realizó sus estudios de posgrado (Maestría) en Fitomejoramiento (1988-1990), desarrollando su trabajo de tesis en cultivo *in vitro* de chayote. Ya en el año 1989, el TEC enfrentaba retos con nuevas carreras ingenieriles y reformas en mallas curriculares que propiciaban un terreno fértil en el campo biológico. Esos cambios llevaron a algunos profesores del TEC a asumir procesos de formación, realizando maestrías en el campo de la Biotecnología (entre ellos, Olman Murillo, Tomás Palma y Nancy Hidalgo), quienes regresaron con una mentalidad clara de fomentar la investigación en el área Vegetal. A su vez, Ileana Moreira y Elizabeth Arnáez comenzaron a generar experiencia en investigaciones de campo con especies forestales nativas.

Bajo el apoyo de Ricardo Aguilar, en ese entonces Oficial de Proyectos de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE), se conformó un grupo de investigadores con miras a plantear una estrategia de trabajo futuro en el campo de la Biotecnología. Luego de un arduo esfuerzo, se concretó el denominado “Programa de Biotecnología y Recursos Genéticos”, coordinado por Ileana Moreira González. En este período se concretaron trabajos conjuntos en temas como mejoramiento genético (Olman Murillo), cultivo *in vitro* de raicilla (Nancy Hidalgo, Tomás Palma e Ileana Moreira) y domesticación de especies forestales nativas (Ileana Moreira y Elizabeth Arnáez).

Entretanto, el personal del Área de Biología de ese entonces (Antero Muñoz, Elizabeth Arnáez, Braulio Vílchez, Fiorella Donato e Ileana Moreira), iniciaron el planteamiento de la creación de la Escuela de Biología, a la cual se sumó Silvana Alvarenga una vez finalizados sus estudios de posgrado, y fue aprobado el 4 de septiembre de 1991 (Asamblea Institucional Representativa, sesión 023-91), con la profesora Alvarenga como su primera directora.

En 1992, con fondos del BID-CONICIT, se desarrolló el proyecto de investigación “Micropropagación *in vitro* y establecimiento en el campo de fenotipos seleccionados de chayote (*S. edule*)”, coordinado por Silvana Alvarenga y con la participación de Nancy Hidalgo.

Este proyecto aportó los recursos para el equipamiento del laboratorio de biotecnología y sirvió de base para iniciación formal de las investigaciones, transferencia de tecnología, y venta de servicios biotecnológicos. La cantidad de propuestas de investigación aumentó, por lo que incorporó la investigadora Anabelle Muñoz.

Para diciembre de 1993 ya se disponía de un plan estratégico, razón por la cual se unificaron esfuerzos para avanzar en una propuesta de creación de un centro de investigación. Esto se vio acompañado de la reestructuración del proceso investigativo del TEC, relacionado a la conformación de centros de investigación institucionales y propuesto por la administración del Rector Arturo Jofré y su Vicerrector de Investigación Ricardo Aguilar.

En 1994 fungió Silvana Alvarenga como directora de la Escuela de Biología y se incorporaron dos profesionales más: Ana Abdelnour y Dora Flores. En ese mismo año, empleado la información y materiales producidos por el equipo del Programa de Investigación y Extensión en Biotecnología, se presentó la solicitud de creación del CIB, la fue aprobada el 10 de marzo del 1994 en la sesión 1748, Art. 7, del Consejo Institucional del TEC, siendo Dora Flores su primera coordinadora. Es importante mencionar que, debido a que la normativa institucional de la época no permitía que los centros fueran inter-escuelas, se acordó la adscripción del nuevo centro a la Escuela de Biología del TEC, por lo que algunos investigadores que acompañaron el proceso se integraron a otros centros; tal fue el caso Olman Murillo al Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF), Tomás Palma al Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH), y la Ing. Nancy Hidalgo se integró al trabajo del CIB, debido a que la Escuela de Ingeniería Agrícola no contaba con un centro de investigación.

La primera visión del CIB fue *“Ser un centro de investigación y transferencia que utiliza la biotecnología para el mejoramiento de la calidad de vida”*. La **misión** fue: *“Desarrollar investigación y ofrecer soluciones biotecnológicas pertinentes y de excelencia a través del trabajo multidisciplinario comprometido con la sociedad”*. En suma, el CIB buscaba generar investigación de alto nivel para transferir el conocimiento académico y los avances en biotecnología a la sociedad y hacer frente a los retos del siglo 21.

Ya como centro de investigación debidamente constituido, se logró aumentar paulatinamente la cantidad de proyectos de investigación. Así, con la participación de Ana Abdelnour, Dora Flores y Jaime Brenes, se fortaleció el área de Biotecnología Vegetal, con investigaciones en el campo de la micropropagación y crioconservación de papa, mora, orquídeas, plantas forestales y otras especies de importancia económica. Entretanto, Elizabeth Arnáez e Ileana Moreira trabajaron con especies forestales nativas dentro de un proyecto de la Agencia de Cooperación Alemana (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ), denominado COSEFORMA (Cooperación en los Sectores Forestal y Maderero).

En sus inicios, el CIB estuvo localizado en un laboratorio del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) de la Escuela de Química, compartido con Sayra Navas; sin embargo, las actividades de investigación se tornaron incompatibles debido a los tipos de muestras procesadas. Por ello, el equipo, materiales y utensilios, fueron trasladados a un espacio ubicado en el edificio de Maderas, frente al antiguo aserradero, gracias a la desinteresada colaboración de Olman Murillo, quien se desempeñaba como director de la Escuela de Ingeniería Forestal, y quien otorgó el uso de este espacio de 30 m<sup>2</sup>, sin límite de tiempo, para colocar el cuarto de preparación de medios y el cuarto de transferencia y crecimiento para micropropagación, ubicados en un mismo lugar.

La creación del CIB permitió consolidar las áreas de investigación prioritarias que sirvieron de apoyo para la creación de un programa de grado en Biotecnología, que pretendía cubrir el vacío existente en este campo en Costa Rica, ya que en ese momento no existía un plan de estudios en esta disciplina en el país, ni en la región centroamericana. A partir de ahí nació

el programa de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología (IBio) en el TEC. El 15 de octubre de 1996, el Consejo Nacional de Rectores (CONARE) aprobó la propuesta para la creación la carrera de Ingeniería en Biotecnología (IBio) en su grado de bachillerato (Sesión 27-96, artículo 6). Al año siguiente se inició esta opción académica en el Campus Central del TEC, para ofrecer una opción a nivel nacional y regional, con énfasis en el cultivo de tejidos vegetales y los recursos fitogenéticos.

Posteriormente, en la gestión de Ileana Moreira como directora de la Escuela de Biología, se inauguró en 1999 un nuevo edificio de investigación de 600 m<sup>2</sup>, el cual pronto resultó insuficiente. El incremento sostenido de proyectos condujo al necesario aumento del espacio físico y mejores condiciones para la investigación. Por esta razón, en junio del 2011, siendo Jaime Brenes director de la Escuela de Biología, se aprobó la construcción de una nueva edificación para el CIB, la cual, incluyendo los 194 m<sup>2</sup> ya existentes del área de Aplicaciones Biomédicas, y junto con los invernaderos y estanques, suman una superficie de poco más de 15000 m<sup>2</sup>. Adicionalmente, se dispone desde el 2010 de un campo frutícola de 2200 m<sup>2</sup>, también en el Campus Central del TEC.

Durante estos 25 años de investigación en el CIB, se han establecido iniciativas de cooperación con otras instituciones nacionales e internacionales. Fruto de esta interacción se formaron las áreas de investigación en Biotecnología Ambiental y Aplicaciones Biomédicas, las cuales fortalecieron el área de Biotecnología Vegetal, presente desde sus inicios. Se ha trabajado en el desarrollo de técnicas biotecnológicas modernas, como es el caso de cultivos celulares vegetales para la búsqueda de compuestos bioactivos mediante producción escalonada; análisis molecular de microorganismos, virus y plantas; así como proyectos relacionados con la generación de bioenergías haciendo uso de cultivos no alimenticios y de microalgas, proyectos para la evaluación de biocontroladores de diferentes organismos patógenos en la agricultura, y el uso de nanopartículas para promover resistencia y crecimiento de plantas. Además, en el área biomédica se han implementado técnicas novedosas para el cultivo de piel humana, producción de biomateriales y proteínas de interés biomédico, así como el establecimiento de bancos de tejidos. Estas técnicas biomédicas han permitido establecer plataformas para la realización de bioensayos a nivel celular para evaluar la actividad de sustancias de diverso origen.

La investigación es un quehacer esencial de la Escuela de Biología y, subsecuentemente, del Centro de Investigación en Biotecnología; por esa razón, el incremento del espacio físico del centro evidenció su crecimiento en proyectos de investigación, contabilizándose una media de 32 proyectos anuales en el último lustro. De esta manera, en total han participado más de 40 funcionarios de la Escuela de Biología, en conjunto con otros investigadores a nivel institucional, nacional e internacional, de diferentes disciplinas. Se ha contado con financiamiento para los proyectos otorgados por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC (VIE), Fondo de Riesgo para la Investigación (FORINVES), Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), Fundecooperación para el Desarrollo Sostenible (FUNDECOOPERACION), Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI), Consejo Nacional de Rectores (CONARE), Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR), Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (BIOLAC), Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBIOT), Instituto Científico Pfizer, Analytical Instruments y Programa de Biología Molecular-ASD de C.R, entre otros.

Los estudiantes son una parte activa de la investigación como asistentes; dado el alto número de proyectos, por año se contabiliza un promedio de 90 estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología (IBio), como asistentes en el CIB. Además, los académicos de la Escuela

de Biología se caracterizan por su entusiasmo y apoyo que proveen a las iniciativas del estudiantado. Esto se ve reflejado en el desarrollo de proyectos estudiantiles, en los cuales los estudiantes tienen la oportunidad de realizar sus propios proyectos de investigación con el patrocinio de la VIE. El trabajo de los estudiantes asistentes ha sido decisivo tanto para el CIB, como para los mismos estudiantes, muchos de los cuales han realizado sus posgrados dentro o fuera del país, convirtiéndose en destacados científicos jóvenes en prestigiosas universidades alrededor del mundo.

El emprendimiento, ha sido otro aspecto que el CIB ha impulsado en los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología, lográndose conformar grupos de jóvenes muy competitivos, que generan proyectos altamente innovadores y exitosos con una visión global de la biotecnología. En el 2017, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), señaló al CIB como uno de los actores de innovación de Costa Rica. Este reconocimiento ha sido evidenciado también, por la creciente solicitud del criterio técnico de sus investigadores para decretos y proyectos de ley en las áreas agrícolas, ambientales y biomédicas.

Para finalizar, otra parte importante del quehacer académico del CIB, ha sido la publicación de artículos en diversas revistas científicas indexadas, generación de protocolos, guías y manuales para diferentes usuarios. Por ello, se ha interactuado con contrapartes tan diversas como grupos comunitarios, micro, medianas y grandes empresas e inclusive instituciones gubernamentales y consorcios transnacionales.

## Conclusión

La investigación es una labor esencial de la Escuela de Biología y subsecuentemente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del TEC; de esta manera, la totalidad de los docentes en contratación indefinida o definida, participan en proyectos de investigación, financiados con fondos nacionales o internacionales. Los estudiantes son una parte activa de la investigación como asistentes, dado el alto número de proyectos. El incremento sostenido de proyectos condujo al necesario aumento del espacio físico, equipo y adecuadas condiciones para la investigación. Además, desde sus orígenes, el CIB mantiene una interacción muy activa con otras universidades, centros de investigación y compañías nacionales y extranjeras. Para mantener un nivel proporcional a las demandas de estos tiempos, es esencial tener una relación cercana con colegas fuera del país, así como la interacción con diferentes grupos comunitarios, empresas, instituciones gubernamentales y no gubernamentales. Parte del quehacer académico ha sido la publicación de artículos en diversas revistas científicas, generación de protocolos, guías y manuales para diferentes usuarios.

## Referencias

- [1] Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms, United Nations. 1992  
<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>
- [2] M. Valdez, Rebeca López & Luis Jiménez. 2004. Estado actual de la biotecnología en Costa Rica. Revista Biología Tropical 52(3). San José. Sep.
- [3] Estrategia siglo XXI. Costa Rica. 2006 [http://ticotal.cr/uploads/media/Plan\\_de\\_Medio\\_Siglo\\_\\_ESXXI.pdf](http://ticotal.cr/uploads/media/Plan_de_Medio_Siglo__ESXXI.pdf)
- [4] Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación [http://ticotal.cr/uploads/media/MICIT\\_Plan\\_Nacional\\_Ciencia\\_Tecnologia\\_Innovacion\\_2011-2014.pdf](http://ticotal.cr/uploads/media/MICIT_Plan_Nacional_Ciencia_Tecnologia_Innovacion_2011-2014.pdf)
- [5] Plan Nacional de Ciencia y Tecnología 2015-2021 [https://www.micit.go.cr/images/imagenes\\_noticias/02-25-2015\\_PNCTI/IMG\\_6055.JPG](https://www.micit.go.cr/images/imagenes_noticias/02-25-2015_PNCTI/IMG_6055.JPG)

# Investigaciones en plantas con potencial bioactivo

## Investigations on plants with bioactive potential

Catalina Rosales-López<sup>1</sup>, Elizabeth Arnáez-Serrano<sup>2</sup>,  
Ileana Moreira-González<sup>3</sup>, Giovanni Garro-Monge<sup>4</sup>,  
Ana Laura Agüero-Hernández<sup>5</sup>, Karol Jiménez-Quesada<sup>6</sup>,  
Ana Abdelnour-Esquivel<sup>7</sup>, Laura Calvo-Castro<sup>8</sup>

Rosales-López, C; Arnáez-Serrano, E; Moreira-González, I; Garro-Monge, G; Agüero-Hernández, A; Jiménez-Quesada, K; Abdelnour-Esquivel, A; Calvo-Castro, L. Investigaciones en plantas con potencial bioactivo. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 12-21.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4621>

- 1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: crosales@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0001-8336-0498>
- 2 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: earnaez@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0003-4058-4429>
- 3 Presidenta, Colegio de Biólogos de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ilea2757@gmail.com  
 <https://orcid.org/0000-0001-9426-0986>
- 4 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: ggarro@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0001-7578-1938>
- 5 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: anaguero@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0002-8538-2321>
- 6 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: kjimenez@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0002-0162-9279>
- 7 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: aabdelnour@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0002-8951-685>
- 8 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>



## Palabras clave

Plantas medicinales; compuestos bioactivos; metabolitos secundarios; fitoquímica.

## Resumen

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), cuenta con un grupo multidisciplinario de profesionales que orientan sus investigaciones en tres diferentes líneas de acción: Biotecnología Vegetal, Ambiental y Biomédica. En el área de Biotecnología Vegetal se desarrollan proyectos que incluyen investigaciones en productos naturales, metabolitos secundarios, compuestos antioxidantes, etnobotánica, bioprocesos, farmacognosia y cultivo de tejidos; todos bajo un mismo objetivo “*el uso de recurso biótico como fuente de compuestos bioactivos con efecto positivo sobre la salud, que puedan ser utilizados como coadyuvante o fitofármaco natural para el hombre*”. En este artículo se presenta un breve resumen de los proyectos y logros que se han obtenido en esta área de investigación en el CIB.

## Keywords

Medicinal plants; bioactive compounds; secondary metabolites; phytochemistry.

## Abstract

The Biotechnology Research Center (CIB) at Costa Rica Institute of Technology (TEC) consists of a multidisciplinary group of researchers performing their research in three different lines of action in Biotechnology: Plants, Environmental and Biomedical Research. The research projects in Plant Biotechnology include investigations on plants with bioactive potential, natural products, secondary metabolites, antioxidant compounds, ethnobotany, bioprocesses, pharmacognosy and tissue culture. Researchers from different fields (biologists, agronomists and biotechnologists) collaborate in search of the same objective: “The use of biological resources as a source of secondary metabolites with a positive effect on health, which can be used as an adjuvant or for developing natural phytopharmaceuticals for humans”. This article presents a brief summary of the projects and achievements that have been obtained in this area of research at CIB.

## Introducción

El trabajo científico con plantas con potencial bioactivo es de vital importancia para la protección de la biodiversidad del país. El grave deterioro que han sufrido los productos no maderables de los bosques por su extracción indiscriminada, generó una fuerte tendencia a buscar sistemas de reproducción y manejo que garantizaran su uso comercial, sin amenazar la riqueza de los bosques. El Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), inició el desarrollo de métodos alternativos de propagación de especies medicinales nativas desde 1988, con una investigación sobre la micropropagación de ipecacuana (la cual es considerada una planta medicinal por sus propiedades eméticas). Las investigaciones con ipecacuana continuaron en el 2007, enfocándose en el manejo agroecológico. Para el 2013 se realizó un perfil fitoquímico a la planta completa y, durante el periodo 2015-2017, se formuló un jarabe emético para animales domésticos, utilizando todos los órganos de la planta (Secreto industrial). En la actualidad, el CIB ha evaluado el potencial bioactivo de más de 20 plantas, desde la clasificación botánica hasta el análisis de su potencial anticancerígeno *in vitro*, y se están iniciando los primeros ensayos en modelos animales, con el fin de traducir estos esfuerzos a la práctica comercial.

## **Programa de Investigación y Extensión en Plantas Medicinales: políticas y lineamientos**

A partir del año 1997, un grupo de investigadores de la Escuela de Biología del TEC conformaron equipos de trabajo en el campo de las plantas medicinales. En el año 2000 se creó el “Programa de Investigación y Extensión en Plantas Medicinales, políticas y lineamientos”, cuyo objetivo ha sido compartir los conocimientos adquiridos con el sector comercial nacional e internacional, dando especial atención al desarrollo de actividades que promuevan el uso sostenible de la biodiversidad, principalmente las plantas medicinales nativas o naturalizadas. Algunos de los ejes de conocimiento que se abarcaron con este Programa incluyen:

- Estudios biológicos (morfología, dinámica poblacional, reproducción, fenología, crecimiento y en general, biología de las especies).
- Propagación masiva y conservación de germoplasma.
- Aplicación de herramientas biotecnológicas (caracterización genética, estudios de actividades biológicas y principios activos).
- Estudios agronómicos y de mercadeo para producción y comercialización.

Unido a esto, en el año 2004 se creó el “Programa Nacional de Plantas Medicinales (PRONAPLAMED)”, con el fin de conocer y potenciar los recursos de la biodiversidad de Costa Rica, adscrito a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y conformado por representantes de todas las universidades Estatales, miembros del Consejo Nacional de Producción (CNP), y la empresa privada (Laboratorios LISAN).

Debido a lo anterior, desde el año 2002 en el TEC se incrementaron las investigaciones en plantas con potencial bioactivo, sumando 28 proyectos de investigación desarrollados hasta la fecha (2019), logrando generar productos de interés comercial, numerosas publicaciones científicas, y la formación de alianzas con investigadores de diferentes instituciones (universidades y centros de investigación nacionales e internacionales, asociaciones y cooperativas de pequeños agricultores, y empresa privada).

## **Investigaciones**

La mayoría de los proyectos realizados involucran a comunidades inmersas en ambientes con altas tasas de desempleo, subempleo, falta de acceso a conocimiento, maquinaria y equipo especializado, inexistencia de canales de comercialización, dependencia del monocultivo y la presión sobre la base de recursos naturales. Por lo tanto, muchos proyectos de investigación se han trabajado en conjunto con organizaciones y cooperativas, permitiendo la implementación de iniciativas para su desarrollo socioeconómico y productivo [1]. Con otras investigaciones, al estar vinculadas a la empresa privada, se ha logrado la futura comercialización del producto generado.

El interés por las investigaciones en plantas o microorganismos con compuestos bioactivos se debe a la gran biodiversidad de Costa Rica, donde la variedad de condiciones climáticas, zonas de cultivo, tipos de suelo y distintas variables bióticas, resultan en la existencia de variedades de especies locales con alto potencial fitoquímico. La mayoría de las investigaciones en este campo han buscado la obtención de extractos de plantas utilizando diversos solventes, técnicas de secado del material y extracción, así como la identificación fitoquímica de los grupos de metabolitos secundarios presentes, haciendo uso de técnicas cualitativas o equipos especializados. También se han realizado pruebas para la comprobación del potencial bioactivo

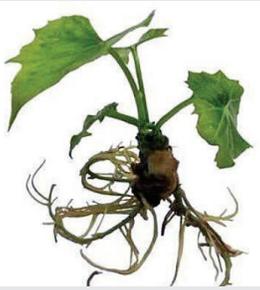
en modelos *in vitro* e *in vivo*, con el uso de cultivos celulares y ensayos con modelos animales, enfocados en la búsqueda de propiedades con potencial en biomedicina.

Entre otros resultados, se han desarrollado tecnologías para la obtención de diversos productos fitoterapéuticos en forma de tinturas, jarabes, cremas, cosméticos, productos alimenticios y cápsulas, obtenidos a partir de extractos elaborados con el material vegetal. Además, se han utilizado las técnicas de cultivo vegetal *in vitro* con el objetivo de micropropagar el material vegetal, ya sea de toda la planta en estudio o partes de ella; por ejemplo, las raíces e incluso la obtención de un conjunto de células no diferenciadas denominada callo, con el fin de extraer los metabolitos secundarios de interés. Por otro lado, se han implementado técnicas moleculares y de ingeniería genética en algunas especies, con la intención de caracterizar genéticamente el material vegetal [2]. Se han obtenido resultados interesantes en estudios de metaboloma, logrando una mejor descripción de las rutas metabólicas, con el fin de poder modificarlas para aumentar la producción de los compuestos de interés [3]. La implementación de técnicas de ingeniería genética han permitido la obtención de cultivos de raíces pilosas, las cuales son un sistema muy promisorio para el escalamiento de la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de importancia farmacológica [4], [5].

En el cuadro 1 se describen cada una de las especies de plantas con compuestos bioactivos estudiadas en el CIB, así como la marcha fitoquímica y pruebas de bioactividad realizadas. El CIB no solo ha centrado sus investigaciones en los metabolitos secundarios de las plantas, sino que también ha ampliado sus estudios con varios géneros de hongos que se consideran especies medicinales. Entre los hongos que se han investigado por sus compuestos bioactivos están: *Rhodotorula sp* y *Pycnoporus sp* (colorantes naturales) [35], *Ganoderma sp* (anticancerígeno y antiinflamatorio) (Tesis doctoral CRL, vigente), y *Schizophyllum sp*, *Candida guilliermondii* y *Ustilago sp* (alérgenos) [36]. Por otro lado, también se ha estudiado el potencial nutricional y bioactivo de sustancias derivadas de microalgas, lo cual está descrito en otro artículo de esta misma edición.

Con el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del CIB cuenta con las facilidades para la caracterización de algunos efectos biológicos en modelos celulares y tisulares *in vitro*, de humanos y animales, incluyendo líneas celulares representativas de distintos tipos de cáncer en humanos, células de piel humana o piel humana reconstruida *in vitro*, modelos de músculo, hueso y células madre mesenquimales de roedores. Algunos de los efectos biológicos que se han evaluado en estos modelos incluyen: pruebas de citotoxicidad para la determinación de potencial anticancerígeno y de bioseguridad *in vitro* de sustancias; análisis de marcadores moleculares de diferenciación, apoptosis, necrosis o proliferación celular; y determinación del potencial regenerativo en modelos de piel. De esta forma, se han confirmado posibles aplicaciones biomédicas (preventivas y terapéuticas) de sustancias bioactivas de diversas plantas nativas de Costa Rica, incluyendo estudios publicados de mora [31] manzana, anona y ciruelo [20], [22] [23], guayaba [24] y varias plantas medicinales (*Phyllanthus*, *Senna reticulata*, *Pettiveria alliaceae*) [9], [23]. Actualmente, se desarrollan también ensayos de actividad biológica y toxicidad en modelos animales (roedores), en colaboración con otras universidades nacionales e internacionales. A futuro, se espera transferir estos resultados hacia la realización de pruebas clínicas y la generación de alimentos funcionales, nutraceuticos, y fitofármacos.

**Cuadro 1.** Especies de plantas medicinales estudiadas por investigadores del Centro de Investigación en Biotecnología del TEC.

Nombre Científico	Nombre Común	Foto	Marcha Fitoquímica	Bioactividad	Uso Tradicional	Ref
<i>Aloe barbadensis</i>	aloe		Identificación y cuantificación acemanann	NA	Cicatrizante y anti inflamatorio	[33]
<i>Annona cherimola</i>	anona		Identificación y determinación de polifenoles.	Actividad antioxidante	Potencial citotóxico, actividad anti-Helicobacter pylori, contra la anemia, fortalecer de huesos, acción ansiolítica y tranquilizadora, antiparasitario y antidiarreico.	[20]
<i>Azadirachta indica</i>	neem		Identificación de azadiractina a nivel celular	NA	Insecticida	[26]
<i>Jatropha curcas</i>	tempate		Micropropagación y crioconservación	NA	Antiséptico, anticoagulante, purgante, insecticida y producción de biodiesel	[34]
<i>Kalanchoe pinnata</i>	kalanchoe		Identificación y cuantificación de polifenos y flavonoides (Quercetina, Kaempherol y Kaempheritrin)	Hipogluceminante en ratas sanas y capacidad antioxidante	Antidiabética	[25]
<i>Malus domestica</i>	manzana		Identificación y determinación de polifenoles	Actividad antioxidante.	Alimenticia, cosmética y medicinal	[22], [23]

Nombre Científico	Nombre Común	Foto	Marcha Fitoquímica	Bioactividad	Uso Tradicional	Ref
<i>Moringa oleifera</i>	moringa		NA	Citotoxicidad	Fuente nutricional por alta concentración de proteínas	[30]
<i>Pettiveria alliaceae</i>	ajillo		Identificación y determinación de diferentes compuestos químicos.	NA	Analgésico, cardiovascular, antiinflamatorio, insecticida, febrífugo, gastrointestinal, dolores de muela, cabeza y musculares, enfermedades de la piel y antibacteriano, entre otros.	[9], [10]
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	chillillo		Identificación de glicósidos: filantostatinas en plantas y cultivos de raíces pilosas. Identificación de flavonoides y otros	Anticancerígena	Antioxidante	[9], [10], [11], [12], [13], [5]
<i>Phyllanthus niruri</i>	chanca piedra		Establecimiento de raíces pilosas. Identificación de flavonoides y otros	NA	Antiviral, diurética, reduce infecciones de boca, garganta y urinarias.	[9], [10], [19]
<i>Plantago major</i>	llantén		Identificación de compuestos verbascósidos e iridoides: aucubina, catalpol en plantas y líneas celulares	Cicatrizante y antimicrobiana	Antioxidante, antiinflamatorio, antiespasmolítico	[27], [28], [29]
<i>Prunus domestica</i>	ciruelo		Identificación y cuantificación de polifenoles.	Actividad antioxidante	Alimenticio, cosmético y medicinal.	[20], [21], [22]

Nombre Científico	Nombre Común	Foto	Marcha Fitoquímica	Bioactividad	Uso Tradicional	Ref
<i>Psidium guajava</i>	guayaba		Identificación y cuantificación de diferentes compuestos químicos y ácido ascórbico	Actividad antioxidante	Alimenticio, cosmético y medicinal	[24]
<i>Psychotria ipecacuanha</i>	raicilla		Identificación y cuantificación de emetina y cefaelina a todas las partes de la planta (hojas, tallo y raíz)	Toxicidad oral aguda y Vomitivo (prueba realizada en perros)	Emético	[10], [18]
<i>Quassia amara</i>	hombre grande		Quassina	NA	Febrífugo, aperitivo, diurético, diarrea, despesia, digestiva y otros	[10]
<i>Rubus adenotrichos</i>	mora		Antocianinas y compuestos fenólicos	Actividad antioxidante		[31], [32]
<i>Senna alata</i>	saragundí		Identificación de diferentes compuestos químicos.	NA	Antiinflamatorio, cardiovascular, dermatológico en infecciones, en problemas gastrointestinales, para combatir la artritis, digestivas	[9], [10], [14]
<i>Smilax domingens</i>	cuculmecca		Identificación de diferentes compuestos químicos.	NA	Depurativo, diurético, antianémico, vigorizador, antehemorragico y otros.	[10]

Nombre Científico	Nombre Común	Foto	Marcha Fitoquímica	Bioactividad	Uso Tradicional	Ref
<i>Stevia rebaudiana</i>	stevia		Identificación de Steviosidos y rebaudiósidos en las hojas	Antimicrobiano	Edulcorante natural	[6], [2], [7], [3], [8]
<i>Tagetes patula</i>	clavel de moro flor de muerto		Identificación de factores de transcripción relacionados con rutas metabólicas de interés	NA	Plaguicida	[6]
<i>Uncaria tomentosa</i>	uña de gato		Cultivo in vitro, elicitación, identificación y cuantificación de alcaloides oxindólicos	Toxicidad y Citotoxicidad	Inmuno regulador	[15], [4], [16], [17]

## Conclusión

El Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica trabaja en asociación con la academia, entidades gubernamentales, instituciones públicas y privadas, y la sociedad en general, para seguir investigando los compuestos bioactivos de los recursos naturales nacionales. Investigadores del CIB unen esfuerzos y capacidades para colaborar con el posicionamiento de Costa Rica en el mapa mundial de las plantas y microorganismos con importancia médica. De esta forma, se promueve el desarrollo del país y el bienestar de su población con el estudio y producción de compuestos bioactivos que permitan la elaboración de medicamentos biotecnológicos.

## Referencias

- [1] I. Moreira y E. Arnáez, "Modelo de desarrollo económico local basado en alternativas de uso de plantas medicinales con componentes bioactivos". *Biocenosis*, vol. 25(1-2), pp. 42-45, 2012.
- [2] G. Garro; K. Jiménez y S. Alvarenga, "Caracterización genética molecular de materiales procesados de *Stevia rebaudiana* utilizando la técnica de microsátélites", *Tecnología en Marcha*, vol. 27 (3), pp. 32-40, 2014.
- [3] K. Jiménez, A. Álvarez, G. Garro, "Identificación de secuencias génicas relacionadas con la ruta metabólica de síntesis de glicósidos en *Stevia rebaudiana*". *Tecnología en Marcha*, vol 29(4), pp. 67-77, 2016.
- [4] G. Garro, K. Ramijan, B. Blanco, K. Lam, S. Alvarenga, "Implementación de un protocolo para la producción de raíces pilosas (hairy roots) de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes*". *Tecnología en Marcha*, vol. 25 (3), pp. 28-38, 2012.



- [5] G. Garro-Monge, K. Jiménez-Quesada, y R. Pérez-Méndez, "Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 31(3), pp. 66-73, 2018.
- [6] K. Jiménez-Quesada, "Identificación de factores de transcripción putativos en *Stevia rebaudiana* y *Tagetes ratula* como herramienta para posterior uso en la descripción de rutas metabólicas de interés", Tesis de grado bachillerato, ITCR-2014.
- [7] S. Alvarenga Venutolo, "Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal". *Cultivos Tropicales*, vol. 36(3), pp. 50-57, 2015.
- [8] C. Rosales, J. Brenes, K. Salas, S. Arce-Solano and A. Abdelnour-Esquivel, "Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method". *Revista Chapingo Serie Horticultura*, vol. 24 (1), pp. 69-84, 2018.
- [9] I. Moreira, E. Arnáez, R. Murillo, S. Quesada, V. Castro, W. Zamora, M. Cordero, J. Loaiza y M. Navarro, "Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 27 (4), pp. 70-77, 2014.
- [10] E. Arnáez, I. Moreira, M. Navarro, "Manual descriptivo de nueve especies de plantas con potencial bioactivo y su manejo agroecológico". Editorial Flaxo, 2016, pp 84.
- [11] M. Navarro, I. Moreira, E. Arnaez, S. Quesada, "Flavonoids and Ellagitannins Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Phyllanthus acuminatus* Vahl." *Plants*, vol.6, pp.62, 2017.
- [12] M.A. Sequeira-Obando, L.A. Calvo-Castro, I. Moreira-González, E. Arnáez-Serrano, M. Navarro, "Cytotoxic effect of an ethanol extract of *Phyllanthus acuminatus* leaves on human epithelial cancer cells". *Pharmacology Online*, vol.12, pp. 92, 2014.
- [13] G. Garro-Monge, K. Jiménez-Quesada, L. Pérez-Méndez, "Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica". *Revista Tecnología en Marcha*, vol.31 (3), pp. 66-73, 2017.
- [14] M. Navarro, I. Moreira, E. Arnaez, S. Quesada, G. Azofeifa, D. Alvarado and M. J. Monagas, "Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna alata* Willd". *Plants*, vol. 6(4), pp.50, 2017. doi:10.3390/plants6040050.
- [15] S. Alvarenga-Venutolo, "Establecimiento *in vitro* y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd.)", *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 23(5), pp.22-24, 2010.
- [16] S. Alvarenga-Venutolo, C. Rosales-López, L. Sánchez-Chinchilla, R. Muñoz-Arrieta and F. Aguilar-Cascante, "Seasonality effect on the composition of oxindole alkaloids from distinct organs of *Uncaria tomentosa* from the Caribbean region of Costa Rica". *Phytochemistry*, vol. 151, pp. 26-31, 2018.
- [17] M. Navarro-Hoyos, D. Alvarado-Corella, I. Moreira-Gonzalez, E. Arnaez-Serrano, and M. Monagas, "Polyphenolic composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts from *Uncaria tomentosa* bark and leaves". *Antioxidants*, vol.7(5), pp.65, 2018.
- [18] C. Rosales-López, R. Muñoz, and A. Abdelnour-Esquivel, "Emetine and cephaeline content in plants of *Psychotria ipecacuanha* in Costa Rica". Submitted at *Revista Colombiana de Química*, 2019.
- [19] M. Jiménez, S. Venutolo and E. A. Fonseca, "Establecimiento del protocolo de micropropagación para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)". *Tecnología en Marcha*, vol. 20(2), pp. 21-31, 2007.
- [20] M. Navarro, I. Moreira, E. Arnáez, R. Murillo, S. Quesada, W. Zamora y M. Cordero, "Estudio preliminar del potencial bioactivo de la *Annona cherimola* (anona) y *Prunus domestica* (ciruelo) cultivadas en Costa Rica". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 27, pp. 37-44, 2014.
- [21] M. Navarro, Y. Zhao, J. Sun, I. Moreira, "Chemical Profiling of Polyphenolic Compounds in the Fruit Skin of *Prunus domestica* Plums from Costa Rica". *J. Res. Anal.*, vol. 3, pp. 42-51, 2017.
- [22] M. Navarro, I. Moreira, E. Arnaez, S. Quesada, "Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica". *Foods*, vol. 7, pp.15, 2018.
- [23] M. Navarro-Hoyos, I. Moreira-González, E. Arnáez-Serrano, R. Murillo-Masis, "Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica". *Rev. Tecnología en Marcha*, vol.30, pp.3-13 2016.

- [24] K. Sánchez-Zúñiga, S. Castro-Piedra, I. Moreira-González, E. Arnáez-Serrano, M. Navarro-Hoyos y F. Vargas-Huertas, "Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba (*Psidium guajava* Var. Tai-Kuo-Bar)". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 30(4), pp.150-156, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v30i4.3424>
- [25] A. Agüero-Hernández, C. Rosales-López, C. Herrera, A. Vargas-Picado, R. Muñoz, and A. Abdelnour-Esquivel, "Antidiabetic effect of *Kalanchoe pinnata* leaf extract". Submitted at *Journal of Ethnopharmacology*, 2019.
- [26] K. Mata, "Optimización del cultivo en suspensión de *Azadirachta indica* A. Juss con miras al escalamiento en biorreactor". Tesis de Bachillerato, Ingeniería en Biotecnología, ITCR. 2014.
- [27] B. Blanco, A. Saborío y G. Garro, "Descripción Anatómica, Propiedades Medicinales y Uso Potencial de *Plantago major* (llantén mayor)". *Tecnología en Marcha*, vol. 21 (2) pp.17-24, 2008.
- [28] G. Garro y S. Alvarenga, "Optimización de un protocolo para el cultivo *in vitro* y la micropropagación masiva del llantén (*Plantago major*)". *Tecnología en Marcha*, vol. 22 (3), pp.25-33, 2009.
- [29] K. Jiménez-Quesada y G. Garro-Monge, "Establecimiento de callogénesis somática en *Plantago major* e identificación de compuestos con actividad biológica". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 30(1), pp.-38, 2017.
- [30] K. Sánchez-Zúñiga, L.A. Calvo-Castro, I. Moreira-González, M.A. Sequeira-Obando, E. Arnáez-Serrano and M. Navarro, "Preliminary evaluation of the cytotoxic capacity of an ethanol extract from *Moringa oleifera* leaves". *Pharmacology*, vol.12, pp.103, 2014.
- [31] L. Calvo-Castro, D.N. Syed, J.C. Chamcheu and F. Vilela, "Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model". *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, pp.1199–1207, 2013.
- [32] A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón-Cerdas, L. Alvarado-Marchena, and D. Flores-Mora, "Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis". *SpringerPlus*, vol. 5(1), pp.1717, 2016.
- [33] G. Garro-Monge, A. Gatica-Arias and M. Valdez-Melara, "Somatic embryogenesis, plant regeneration and Acemannan detection in Aloe (*Aloe barbadensis*, Mill)". *Agronomía Costarricense*, vol. 32(2), pp. 41-52, 2008.
- [34] J. A. Prada, M. E. Aguilar, A. Abdelnour-Esquivel, and F. Engelmann, Cryopreservation of seeds and embryos of *Jatropha curcas* L. *American Journal of Plant Sciences*, vol. 6(01), pp. 172, 2015.
- [35] C. Rosales-López, "Other important use of mushrooms". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 32(2), pp.140-142, 2018.
- [36] C. Rosales-López, K. Valerín-Berrocal, y V. Jiménez-Bonilla, "Crecimiento dimórfico y caracterización molecular de *Candida guilliermondi* aislado de *Panicum maximum*". *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 31(1), pp.121-132, 2018.

# Investigaciones en Cultivos Frutícolas No Tradicionales en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica

## Research in Non-traditional Fruit Crops at the Biotechnology Research Center of Costa Rica Institute of Technology

Alexander Schmidt-Durán<sup>1</sup>, Carlos Alvarado-Ulloa<sup>2</sup>,  
Randall Chacón-Cerdas<sup>3</sup>, Dora Flores-Mora<sup>4</sup>

---

Schmidt-Durán, A; Alvarado-Ulloa, C; Chacón-Cerdas, R; Flores-Mora, D. Investigaciones en Cultivos Frutícolas No Tradicionales en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 22-29.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4623>

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [aschmidt@tec.ac.cr](mailto:aschmidt@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0002-1061-6840>
- 2 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [calvarado@tec.ac.cr](mailto:calvarado@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0002-3739-2701>
- 3 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [rchacon@tec.ac.cr](mailto:rchacon@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0002-5364-4649>
- 4 Ingeniera Agrónoma. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Profesora pensionada. Correo electrónico: [doramariafloresm@gmail.com](mailto:doramariafloresm@gmail.com)



## Palabras clave

Mora; higo; membrillo; tomate de árbol; cultivos frutícolas.

## Resumen

El grupo de investigación de cultivos frutícolas no tradicionales del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) se ha abocado a la tarea de diversificar la oferta agrícola del país, generando conocimiento en ciertos cultivos con potencial de desarrollo. Ante esto, se han realizado investigaciones en los cultivos de higo, mora, membrillo y tomate de árbol, en temas relacionados con el cultivo *in vitro* de las especies, su manejo agronómico, plagas y enfermedades, caracterización molecular de especies y variedades, control biológico, agroindustria y, más recientemente, en el entendimiento de los procesos fisiológicos, patológicos y metabólicos de la planta, relacionados con los mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos y en la producción de compuestos de interés nutraceútico. El grupo de investigación trabaja con el fin de generar paquetes tecnológicos para los agricultores, con el fin de mejorar la producción de estos cultivos en el país.

## Keywords

Blackberry; fig; quency; tamarillo; fruits crops.

## Abstract

The non-traditional fruit crop research team at the Biotechnology Research Center (CIB) of Costa Rica Institute of Technology (TEC) has engaged in the task of diversifying the country's agricultural offer, generating knowledge related to certain crops that have considerable commercial potential. Therefore, research studies related to fig, blackberry, quency, and tamarillo crops have been performed, including *in vitro* culture of the plant species; their agronomical management; plagues and diseases; molecular characterization of the plant species and their varieties; biological control; agroindustry and, most recently, in understanding the physiologic, pathologic, and metabolic processes of the plants, related to the defense mechanisms from pathogen attacks and the production of nutraceutical compounds of interest. The research team works in generating technological packages for farmers, in order to enhance the nationwide production of these crops.

## Introducción

Las nuevas tendencias de los mercados mundiales, así como la dinámica de la reestructuración productiva, han afectado sectores que han sido tradicionalmente la base para la economía nacional y regional, obligando a los pequeños y medianos productores de países en vías de desarrollo, como Costa Rica, a diversificar su oferta productiva. No obstante, para que esto sea una realidad, es necesaria la integración de los sectores industrial, académico y gubernamental, de forma que unan esfuerzos para desarrollar técnicas innovadoras y las incorporen a sus sistemas productivos, con el fin de obtener mayores rendimientos, se incremente la calidad, y se garantice una mayor competitividad en los mercados en donde participen.

El grupo de investigación de cultivos frutícolas no tradicionales, perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), ha trabajado por más de 15 años con diferentes cultivos de esta naturaleza, con el fin de dar alternativas

de desarrollo a los productores y agricultores. Los proyectos de investigación realizados y aquellos que se encuentran en ejecución, se han desarrollado de manera intra-, inter- y transdisciplinariamente, entre miembros de la Escuela de Biología, funcionarios del TEC de otras escuelas y disciplinas, así como investigadores de otras universidades estatales, laboratorios o incluso, con científicos internacionales. Entre los cultivos frutales explorados se encuentran el higo (*Ficus carica*), la mora (*Rubus adenotrichos*), el membrillo (*Cydonia oblonga*) y el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), siendo los dos primeros donde se han centrado los mayores esfuerzos de investigación.

### Cultivo del higo

El higo (*F. carica*) tradicionalmente ha sido propagado por acodos aéreos y estacas, en países como España, Turquía, Portugal y Brasil, donde miles de hectáreas son destinadas al cultivo de esta planta [1]. En Costa Rica, el cultivo del higo se ha venido trabajando como una alternativa productiva para la zona norte de Cartago, en donde se han estudiado temas relacionados con la implementación de técnicas de producción *in vitro* de material, establecimiento de plantaciones, definición de distancias de siembra, fertilización, y manejo de podas, plagas y enfermedades que afectan al cultivo.

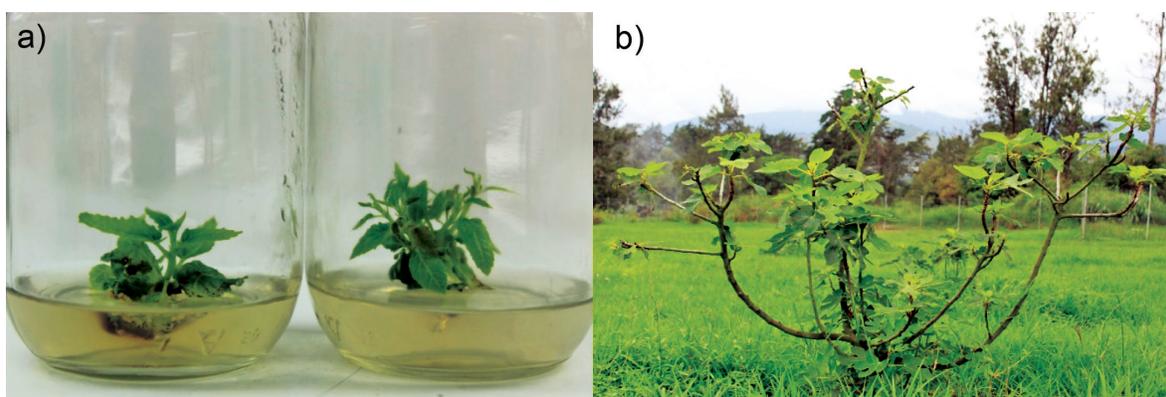
En el 2009 se logró desarrollar el proceso de micropropagación del higo (figura 1a), desarrollando la metodología de establecimiento *in vitro*, micropropagación, enraizamiento y aclimatación de las plantas [2]. Estas técnicas permitieron obtener una gran cantidad de material vegetal de alta calidad, en períodos de tiempo más cortos y libre de enfermedades, las cuales pueden ser utilizada como material de siembra para establecer procesos productivos agrícolas con plantas seleccionadas. Incluso, se investigó sobre el efecto de los nanotubos de carbono aplicados en el medio de cultivo de vitroplantas de higo, con el fin de evaluar el transporte y el acarreo de sustancias al interior de la planta. En este estudio se pudo concluir que los nanotubos de carbono mejoran el crecimiento general de la planta, aumentando la rapidez con que las raíces se producen, sin afectar significativamente la cantidad de raíces totales, en las plantas *in vitro* evaluadas [3] [4].

Posteriormente, en un trabajo multidisciplinario, se evaluó el crecimiento y el desarrollo del cultivo en la zona Norte de Cartago durante dos años de crecimiento de las plantas obtenidas en el laboratorio (figura 1b) [5]. Sin embargo, al realizar la misma evaluación en una zona climática diferente, con altas temperaturas y precipitaciones abundantes, más parecida a las que está el cultivo en los países europeos, como lo es Turrubares, los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en sus respuestas, con plantas con mayor crecimiento, producción y vigor en general; sin embargo, al mismo tiempo, siendo más susceptibles a enfermedades fitopatógenas, especialmente las que atacan raíz y tallo.

Siguiendo con las investigaciones en el cultivo del higo, se realizó un diagnóstico de las principales plagas y enfermedades que lo atacan, en las diferentes zonas de producción del país. En el estudio se lograron encontrar plagas, enfermedades, nematodos y plantas parásitas que afectan al cultivo [6], muchas de las cuales no habían sido previamente reportadas por el Servicio Fitosanitario del Estado costarricense. Este diagnóstico actualiza la información existente sobre las patologías en este cultivo, permitiendo establecer estrategias de control con el fin de aumentar los rendimientos del higo e incrementando el estado de la técnica sobre este frutal en Costa Rica.

Adicionalmente, se lograron identificar bacterias endófitas en el cultivo del higo [7], así como la presencia del Virus del Mosaico de la Higuera en tres variedades foráneas [8]. En el primer estudio, se logró aislar e identificar microorganismos endófitos en el cultivo, los cuales actualmente están siendo estudiados como potenciales biocontroladores de enfermedades que

atacan este cultivo. Por otro lado, se ha demostrado que en el país no existe la presencia del Virus del Mosaico de la Higuera (FMV) ni la del vector de transmisión *Aceria ficus*; además, en Costa Rica sólo se encuentra una variedad de higo, la cual se conoce como “Brown Turkey” [9]. Sin embargo, ante la posibilidad de que nuevas variedades del higo sean introducidas al país con la presencia de este virus, el cual es la principal enfermedad en este cultivo, se realizó un protocolo de detección molecular y microscópica del mismo, con el fin de que sirva de base para estudios posteriores de variedades foráneas que se deseen ingresar al país. Para realizar dicho estudio, el material vegetal se obtuvo de un invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología, el cual contaba con diferentes variedades de higo en estado cuarentenario, infectadas con el FMV.



**Figura 1.** Cultivo del higo (*Ficus carica*) en micropropagación (a) y en campo (b).

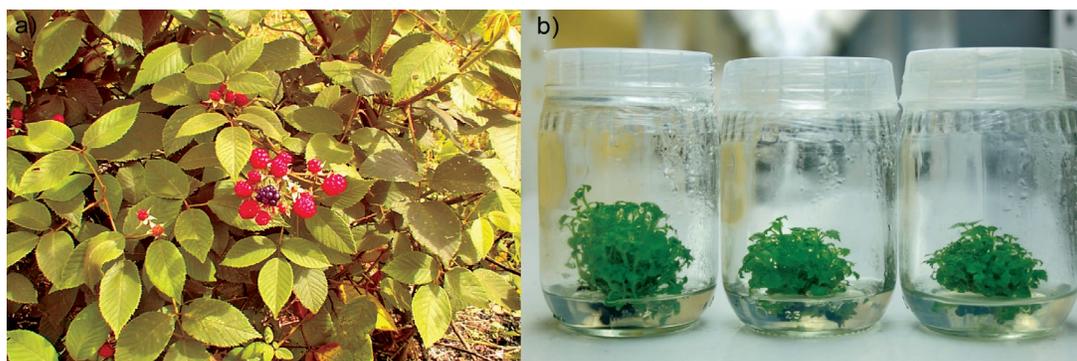
### Cultivo de la mora

En América Central, Costa Rica es uno de los mayores productores de mora, cultivando principalmente las especies *Rubus glaucus* y *Rubus adenotrichos*, en donde sobresale la especie *Rubus adenotrichos* de la zona de Los Santos, por su alto contenido de polifenoles (antocianinas y elagitaninos), flavonoides y otros ácidos fenólicos, caracterizados por eliminar los radicales libres en estudios realizados por las universidades estatales [10] [11]. Bajo esta premisa, se desarrolla actualmente una investigación con el objetivo de generar un bioproceso para obtener estos compuestos bioactivos en biorreactor de tanque agitado, ya que los cultivos celulares permiten obtener altas concentraciones de los compuestos antioxidantes especialmente cuando se emplean biorreactores [12].

El primer paso para generar un escalamiento en este tipo de equipo es la inducción de calogénesis y el establecimiento de suspensiones celulares [12], por lo que el grupo de investigación generó la metodología que le permitiera obtener callos friables y suspensiones celulares a partir de segmentos foliares [13]. En este momento, se continúa con las investigaciones de los compuestos, generando suspensiones de alta densidad, analizando los compuestos de interés e iniciando su producción en biorreactor.

Adicionalmente, en el cultivo mora se ha trabajado con investigadores de la Universidad de Costa Rica (UCR), la Universidad Nacional (UNA) y la Universidad Estatal a Distancia (UNED) en diferentes áreas tales como el manejo agronómico (figura 2a), el cultivo *in vitro*, estabilidad genética, plagas, enfermedades, control biológico, microscopía electrónica, nanotecnología, y agroindustria.

En el área de cultivo de tejidos vegetales de la mora (figura 2b), se desarrollaron todos los procesos que involucra esta tecnología, desde el establecimiento *in vitro* a partir de material de campo seleccionado, hasta la micropropagación, el enraizamiento y aclimatación [4]. Al igual que se hizo con el cultivo del higo, se realizaron ensayos *in vitro*, para evaluar el efecto de nanotubos de carbono en el enraizamiento y el crecimiento de plantas de mora en condiciones *in vitro* [14], obteniendo resultados similares, resultando en plantas de mayor tamaño y más vigorosas, con raíces que emergían más rápidamente y con un desarrollo metabólico celular más avanzado y especializado [4].



**Figura 2.** Mora (*Rubus adenotrichos* Schtdl.) en una planta en campo (a) y en cultivo de tejidos (b).

### Cultivo del membrillo

El membrillo (*Cydonia oblonga*) es un árbol cuyos frutos poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiulcerosas [15]. Es una especie proveniente del sur de Europa y Asia [16]. En el CIB se ha trabajado en el cultivo *in vitro* del mismo, en donde se desarrollaron los protocolos de micropropagación (figura 3), el enraizamiento por medio de un sistema de inmersión temporal automatizada (RITA®), y la aclimatación [17]. Además, se logró realizar una determinación molecular de accesiones, lo que permitió encontrar secuencias altamente específicas de la especie, que presentaran variabilidad genética entre variedades, con el fin de generar una metodología de identificación de nuevas especies [18].



**Figura 3.** Cultivo *in vitro* del membrillo (*Cydonia oblonga*)

### Cultivo del tomate de árbol

En relación con el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), se ha desarrollado el cultivo *in vitro* de una variedad nombrada comúnmente como “fenotipo naranja”, el cual presenta potencial como frutal para su consumo fresco y procesado [19]. Se logró desarrollar el establecimiento *in vitro*, la micropropagación y el enraizamiento de este cultivo (figura 4a). Además, se han podido aclimatar plantas, las cuales han sido evaluadas en el Campo Frutícola del CIB (figura 4b). Sin embargo, se ha visto la gran susceptibilidad de este cultivo a enfermedades del suelo, como es *Phytophthora* sp., lo cual puede ser un problema potencial como alternativa frutícola.



**Figura 4.** Plantas en micropropagación (a) y frutos en campo (b) del tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

### Campo frutícola

El CIB cuenta con un área de campo de 2258 m<sup>2</sup> denominada *Campo Frutícola*, destinada al cultivo de diferentes variedades del cultivo del higo, libres del FMV, la variedad “Vino” de la mora (*Rubus adenotrichos*), el tomate de árbol y el membrillo (figura 5). Dicho campo tiene como objetivo contar con material vegetal para las diferentes investigaciones, así como proveer un sistema de conservación de germoplasma *ex situ* de los materiales investigadores que presentan potencial en el país. El campo frutícola cuenta con un vivero para el material en campo y una bodega. Se espera poder tener una mayor cantidad de frutales no tradicionales y expandir las especies presentes.

### Conclusiones

El grupo de investigación de cultivos frutícolas no tradicionales perteneciente al CIB, ha trabajado con materiales seleccionados de higo, mora, tomate de árbol y membrillo, con miras a generar nuevo conocimiento en las áreas de cultivo *in vitro*, caracterización morfológica y molecular, fitopatología, cultivo celular, metabolitos secundarios y manejo agronómico, con el objetivo de generar publicaciones científicas y paquetes tecnológicos de los que puedan beneficiarse los agricultores de dichos cultivos y aquellos que pertenecen a las cadenas productivas de estos. El trabajo realizado alrededor de los cultivos frutícolas no tradicionales ha permitido relacionar diferentes sectores sociales y ha contribuido con el aporte de tecnologías que mejoran la productividad y la calidad de estos cultivos.



**Figura 5.** Vista aérea del campo frutícola marcada en roja. El edificio ubicado en la esquina superior de la foto es el CIB.

## Referencias

- [1] P. Melgarejo, *El cultivo de la higuera (Ficus carica L)*, Madrid, España: Madrid Vicente Ediciones, 1999.
- [2] D. Flores-Mora, V. Jiménez-Bonilla, y R. Chacón-Cerdas, "Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas", *Agronomía Mesoamericana*, vol. 20 n.º 2, pp. 319-325, 2009.
- [3] D. Flores, J. Chaves, R. Chacón, y A. Schmidt, "A novel technique using SWCNTs to enhance development and root growth of fig plants (*Ficus carica*)", *NSTI-Nanotech*, vol. 3, pp. 167-170, 2013.
- [4] D. Flores, R. Chacón, L. Moreira, J. Argüello, S. Barboza, R. Orozco, H. Villalobos, F. Albertazzi, M. Montero, A. M. Pérez, J. Rosales, A. Segreda, V. Jiménez, R. Buró, y W. Villalobos, *El Cultivo del Higo (Ficus carica) en Costa Rica*, San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, 2011.
- [5] R. Orozco-Rodríguez, R. Chacón-Cerdas, J. Rosales-Flores, F. Arguello-Delgado, A. Schmidt-Durán, L. Alvarado-Marchena, C. Alvarado-Ulloa, y D. Flores-Mora, "Description of the growth and development of the fig tree (*Ficus carica*) and its environmental interaction in Costa Rica", *Acta Horti*, vol. 1173, pp. 221-226, 2017.
- [6] G. Rivera, A. Schmidt, C. Chacón, C. Alvarado, L. Alvarado, y D. Flores, *Guía de las principales plagas y enfermedades que atacan al cultivo del higo en Costa Rica*, Cartago, Costa Rica: Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2016.
- [7] L. Alvarado-Marchena, A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón-Cerdas, y D. Flores-Mora, "Molecular characterization of the endophytic bacteria found in the fig crops (*Ficus carica* var. Brown Turkey) in Costa Rica", *Journal of Agricultural and Biological Science*, vol. 11, n.º 7, pp. 290-297, 2016.
- [8] L. Alvarado-Marchena, R. Chacón-Cerdas, A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, y D. Flores-Mora, "Determining the presence of the Fig Mosaic Virus (FMV) in three varieties of *Ficus carica* L. in Costa Rica", *Journal of Agricultural and Biological Science*, vol. 11, n.º 11, pp. 431-436, 2016.
- [9] L. Moreira, W. Villalobos, y R. Buro, "Enfermedades virales de la higuera", en *El cultivo del higo (Ficus carica) en Costa Rica*, 1ra ed., D. Flores R. Chacón, L. Moreira, F. Argüello, S. Barboza, R. Orozco, H. Villalobos, F. Albertazzi M. Montero, A.M. Pérez, J. Rosales, A.C. Segreda, V. Jiménez, R. Buro y W. Villalobos, Ed. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia, 2011.

- [10] O. Acosta-Montoya, F. Vaillant, S. Cozzano, C. Mertz, A.M. Pérez, y M. Castro, "Phenolic content and antioxidant capacity of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) during three edible maturity stages", *Food Chemistry*, vol. 119, pp. 1497-1501, 2010.
- [11] C. Mertz, A.L. Gancel, Z. Gunata, P. Alter, C. Dhuique-Mayer, F. Vaillant, A.M. Pérez, J. Ruales, y P. Brat, "Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits", *Journal of food composition and analysis*, vol. 22, pp. 381-387, 2009.
- [12] R. Verpoorte, y H. ten Hoopen, *Basic Biotechnology: Plant cell biotechnology*, 3era ed., C. Ratledge, y B. Kristiansen, Ed. Cambridge, Gran Bretaña: Cambridge University Press, 2006.
- [13] A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón-Cerdas, L. Alvarado-Marchena, y D. Flores-Mora, "Callogenesis and cell suspension establishment of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) and its microscopic analysis", *Springer Plus Journal*, vol. 5, pp. 1717, 2016.
- [14] D. Flores, R. Chacón, L. Alvarado, A. Schmidt, C. Alvarado, y J. Chaves, "Effect of using two different types of carbon nanotubes of blackberry (*Rubus adenotrichos*) *in vitro* plant rooting growth and histology", *American Journal of Plant Science*, vol. 5, pp. 3510-3518, 2014.
- [15] J. Postman, "Cydonia oblonga: The unappreciated quince", *Arnoldia*, vol. 67, n.º 1, pp. 2-9, 2009.
- [16] O. Rop, J. Balik, V. Reznicek, T. Jurikova, P. Skardova, P. Salas, J. Sochor, J. Mlcek, y D. Kramarova, "Chemical characteristics of fruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars", *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 29, n.º 1, pp. 65-73, 2011.
- [17] D. Flores-Mora, R. Chacón-Cerdas, L. Alvarado-Marchena, A. Schmidt-Durán, y C. Alvarado-Ulloa, C. "Enraizamiento de vitroplantas de membrillo (*Cydonia oblonga*) por medio de inmersión temporal automatizada y su aclimatación", *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 37, n.º 3, pp. 739-747, 2015.
- [18] L. Alvarado-Marchena, D. Flores-Mora, R. Chacón-Cerdas, A. Schmidt-Durán, y C. Alvarado-Ulloa, "Caracterización molecular de dos accesiones de *Cydonia oblonga*", *Agronomía Mesoamericana*, vol. 26, n.º 2, pp. 351-354, 2015.
- [19] R. Chacón-Cerdas, D. Flores-Mora, L. Alvarado-Marchena, A. Schmidt-Durán, y C. Alvarado-Ulloa, "Cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt.) fenotipo naranja proveniente de Costa Rica", *Tecnología en marcha*, Edición especial IV Encuentro de Investigadores, pp. 45-55, 2014

# Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de embriones de Coyol (*Acrocomia aculeata*)

## Optimization of an *in vitro* culture protocol of Coyol embryos (*Acrocomia aculeata*)

Katherine Sánchez-Zúñiga<sup>1</sup>, Elizabeth Arnáez-Serrano<sup>2</sup>, Ileana Moreira-González<sup>3</sup>, Guillermo Vargas-Hernández<sup>4</sup>

---

Sánchez-Zúñiga, K; Arnaez-Serrano, E; Moreira-González, I; Vargas-Hernández, G. Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de embriones de Coyol (*Acrocomia aculeata*). *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 30-35.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4624>

1 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: katsanchez@tec.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0003-3615-2041>

2 Bióloga. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: earnaez@tec.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0003-4058-4429>

3 Bióloga. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ilea2757@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0001-9426-0986>

4 Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: guillermo.vargas@ucr.ac.cr



## Palabras clave

*Acrocomia aculeata*; coyol; cultivo *in vitro* de embriones de coyol; bioenergía.

## Resumen

El coyol (*Acrocomia aculeata*), es una palma distribuida principalmente en la Región del Pacífico de Costa Rica, su principal uso ha sido la obtención de una bebida conocida como vino de coyol y los frutos como alimento para el ganado. Además, es una especie que tiene un gran potencial, debido a que de los frutos y semillas se puede obtener aceite que puede ser utilizado para producir biodiesel, alimentos y cosméticos, entre otros.

Son pocas las plantaciones comerciales que existen en el mundo, sin embargo, Brasil es uno de los países que está apostando a la siembra de esta especie en mayores extensiones. Uno de los problemas que se tiene al trabajar con esta especie es la alta dormancia de sus semillas y los bajos porcentajes de germinación. Por tal motivo el objetivo del trabajo fue el establecimiento y estandarización de un protocolo de germinación *in vitro* de embriones de coyol (*A. aculeata*).

Se colectaron frutos de plantas de coyol (*A. aculeata*) ubicadas en diferentes sitios de las provincias de Guanacaste, Alajuela, San José y Puntarenas de Costa Rica, durante el año 2018. Se separó el exocarpo y mesocarpo y se desinfectó el endocarpo, posteriormente se extrajeron los embriones y se sembraron en diferentes medios de cultivo *in vitro*. Se logró obtener un protocolo de desinfección y de germinación.

## Keywords

*Acrocomia aculeata*; coyol; *in vitro* culture of coyol embryos; bioenergy.

## Abstract

Coyol (*Acrocomia aculeata*), is a palm distributed mainly in the Pacific Region of Costa Rica, its main use has been to obtain a drink known as coyol wine and the fruits as feed for livestock. In addition, it is a species that has great potential, because of the fruits and seeds you can obtain oil that can be used to produce biodiesel, food and cosmetics, among others.

There are few commercial plantations that exist in the world, however Brazil is one of the countries that is betting on planting this species in larger areas. One of the problems we have when working with this species is the high dormancy of its seeds and the low percentages of germination. For this reason, the objective of the work was the establishment and standardization of an *in vitro* germination protocol of coyol embryos (*A. aculeata*).

Fruits were collected from coyol plants (*A. aculeata*) located in different sites in the provinces of Guanacaste, Alajuela, San José and Puntarenas of Costa Rica, during 2018. The exocarpo and mesocarpo were separated and the endocarpo was disinfected, subsequently embryos were extracted and seeded in different *in vitro* culture media. A disinfection and germination protocol was obtained.

## Introducción

*Acrocomia aculeata* pertenece a la familia Arecaceae, que está ampliamente dispersa por todo América [1]. Entre las palmas oleaginosas, el coyol es la segunda productora de aceite (1500 – 5000 kg ha<sup>-1</sup>), alcanza el pico de producción después de los 4 años y puede producir por más de 100 años, estos atributos le confieren al coyol un gran potencial para la producción de biodiesel [2].

Puede alcanzar hasta los 10 metros de altura, presenta un tronco simple, cubierto de numerosas espinas oscuras. Las hojas son pinnadas, alternas, de 2-3 metros de largo, con apariencia plumosa, tienen segmentos estrechos que salen del raquis en 4 direcciones diferentes [3]. Presenta una inflorescencia en forma de panícula de gran tamaño, aparecen en medio de las hojas, con una espata espinosa de hasta 1m de largo. Los frutos son esféricos, pueden medir hasta 3cm de diámetro y contienen una semilla por fruto [4].

Las plantaciones comerciales a nivel mundial son muy reducidas [5], esta situación está muy relacionada con los problemas de propagación que presenta la especie, las semillas son ortodoxas, presentan una alta dormancia y muy bajos porcentajes de germinación [1]. De los frutos se obtiene aceite y se produce biodiesel [3]. El aceite presenta un alto valor alimenticio, además también se pueden obtener otros productos derivados como harina comestible, forraje y combustible de alto valor calorífico [6]. En Costa Rica además de usarse como bebida, los frutos son mayormente utilizados como alimento para el ganado, siendo esta una fuente de alimentación natural para los animales en pastoreo. Aparte de esto, se es conocido que su savia fermentada puede ser utilizada para hacer el llamado vino de coyol, un tipo de licor común en la zona de Guanacaste. Entre los usos rurales que se le han atribuido a la planta se destacan el uso de sus hojas para poner adentro de estructuras destinadas a la maduración de plátano para evitar que animales como los murciélagos entren [7].

Los procesos de germinación de las semillas en las plantas de la familia Arecaceae pueden verse afectados por factores como la temperatura, el substrato y el estado de maduración de los frutos [3]. La maduración del fruto se puede evaluar mediante la coloración del exocarpo, se han observado mayores porcentajes de germinación cuando los frutos están en estadios más avanzados. Otra característica importante en esta familia está relacionada con los mecanismos de dormancia de las semillas, provocando que la germinación ocurra de forma muy lenta [5]. La hidratación del embrión es esencial para desencadenar los procesos de germinación del mismo. Sin embargo, también se presentan otras barreras físicas que impiden el desarrollo embrionario, como la existencia de un endocarpo pétreo que afecta la emergencia de las plántulas [8].

Para la conservación de la diversidad de los recursos genéticos es necesario el empleo de técnicas biotecnológicas, como lo es el cultivo de tejidos, que permite la reproducción de las plantas de forma más rápida y efectiva [5]. En el caso específico del coyol (*A. aculeata*), el cultivo *in vitro* de embriones permite disminuir los tiempos de germinación de la semilla y aumentar la tasa de germinación mediante el control de las condiciones de laboratorio [3]. Uno de los factores que contribuyen a la maduración de los frutos es la aplicación de reguladores de crecimiento [9].

El objetivo del trabajo fue el establecimiento y estandarización de un protocolo de germinación *in vitro* de embriones de coyol (*A. aculeata*).

## Metodología

### Lugar de estudio y obtención del material vegetal

Los ensayos se realizaron en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, ubicado en Cartago, Costa Rica a 1360 msnm. Los frutos fueron colectados de racimos maduros de plantas de coyol (*A. aculeata*) ubicadas en diferentes sitios de Guanacaste (Abangares, Tilarán, Cañas y Limonal), Alajuela (Atenas y Orotina), San José (Puriscal y Turrubares) y Puntarenas (Chomes y Sardinal). (Licencia de colecta científica/ Académica SINAC-SE-0157-2017. Ministerio de Ambiente y Energía. Costa Rica).

## Desinfección y germinación *in vitro* de embriones

Se secaron los frutos al sol para facilitar la separación del exocarpo - mesocarpo, esto se realizó de forma mecánica, posteriormente en el laboratorio se desinfectó el endocarpo, este se mantuvo en agitación con agua destilada con 5 gotas de tween 20 durante 10 minutos, se hizo un lavado con agua estéril y se preparó una solución de bactericida – fungicida (3 g/L) y se mantuvieron en agitación durante 15 minutos, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3,5% i.a. y se conservaron en agitación durante 25 minutos, luego fueron colocados en una cámara de flujo laminar y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, se dejaron 10 minutos en alcohol de 95%, nuevamente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se procedió a romper el endocarpo para extraer el embrión.

Los embriones se sembraron en un medio de cultivo semi-sólido (Tratamiento 1) con sales y vitaminas M&S al 100%, suplementado con ácido cítrico (3mg/L), cisteína (3mg/L), ácido giberélico (1mg/L), sacarosa (30g/L) y gelificante. También se utilizó un medio control (Tratamiento 2) M&S al 100% sin reguladores y sin suplementos. Los embriones se colocaron en un cuarto de crecimiento a 26°C y se mantuvieron en oscuridad durante dos semanas, posteriormente se expusieron a la luz y se realizaron subcultivos cada cuatro semanas.

Se realizó la prueba Q de Cochran para encontrar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, el estadístico Q de Cochran sigue una distribución de Ji-cuadrado con K-1 grados de libertad y un  $\alpha$  de  $p \leq 0.05$ .

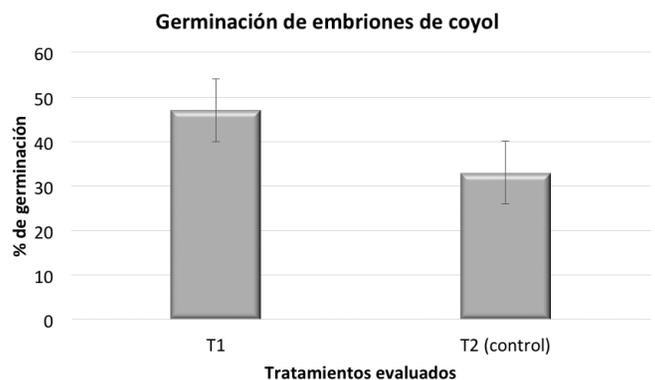
## Resultados y Discusión

### Germinación *in vitro* de embriones

La germinación de los embriones se observó a las 4 semanas de cultivados (Fig. 1), en esta etapa se evaluó la oxidación de los mismos y se subcultivaron en medio nuevo. Se alcanzaron tasas de germinación del 47% aproximadamente con el T1 y del 33% con el T2. En cuanto a los porcentajes de contaminación se tiene una tasa del 10% con ambos tratamientos. Aproximadamente entre las 8 y 10 semanas aparecen los cotiledones y algunas plántulas empiezan la formación de raíces adventicias muy pequeñas. Se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento T1 y el control sin reguladores de crecimiento (T2), según la prueba Q de Cochran con un  $\alpha$  de  $p \leq 0.05$ , por lo tanto, de acuerdo con los porcentajes de germinación obtenidos se observó que los embriones presentaron un mayor desarrollo en el medio suplementado con reguladores de crecimiento (Fig.1). La mayoría de los embriones que no germinaban, provenían de frutos que fueron colectados del suelo y que tenían un exocarpo muy seco o el endocarpo expuesto, por lo que se procedió a utilizar únicamente embriones de frutos que aún estaban en el racimo. En este caso se notó que la germinación depende de la adecuada madurez del fruto.

Resultados similares fueron reportados por Angulo *et al* (2006) [10] y otros autores [11]; [12] en donde la utilización de reguladores de crecimiento no influye en la germinación de los embriones, sin embargo, la aplicación de compuestos antioxidantes combinado con la ausencia de luz durante al menos 20 días, sí presenta un efecto significativo en la reducción de la oxidación y por ende el aumento en la viabilidad de los embriones. Dias *et al* (2013) [13] también resaltan que el uso de ácido giberélico en el medio de cultivo no presenta diferencias significativas con respecto a la germinación de los embriones aislados, sin embargo, sí tiene influencia en el desarrollo del embrión cuando se siembra la semilla completa con el opérculo [13]. La utilización de antioxidantes en el medio de cultivo se basa en el principio de que estos

compuestos son donadores de electrones, con lo cual inhiben la oxidación de sustratos porque pueden remover oxígeno de otras moléculas. La oxidación de los compuestos fenólicos en cultivo de tejidos son catalizados por la enzima polifenol oxidasa, la cual produce quinonas. En la mayoría de los casos los compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido hacia el medio o por la acción de la activación de algunas rutas metabólicas como la del ciclo sikimico, esto puede reducirse o evitarse cuando se mantienen los embriones en condiciones de oscuridad [14]; [11]. Una vez exudados los compuestos fenólicos, quedan atrapados en el medio, acumulándose alrededor del explante, causando la inhibición del crecimiento y la necrosis. Con respecto a los problemas causados por la liberación de fenoles, existen una serie de compuestos utilizados en el cultivo de tejidos como antioxidantes, de los que mayormente se agregan al medio y que a la vez presentan los mejores resultados resalta el carbón activado, L-cisteína y el ácido cítrico [14]. La combinación de antioxidantes utilizada en el medio T1 permitió controlar completamente la oxidación. La adición de ácido giberélico al medio T1 se dio por cuanto las giberelinas regulan los procesos de crecimiento y desarrollo de las semillas. Naturalmente las giberelinas se sintetizan en los tallos jóvenes y propiamente en las semillas, por lo que se promueve aumentar la concentración de estas sustancias para acortar los tiempos de dormancia de las semillas [15]. Naturalmente las semillas de *A. aculeata* pueden presentar largos períodos de dormancia aproximadamente entre 5-10 años (se consideran como ortodoxas), esta limitante dificulta el establecimiento comercial del mismo, de tal forma que la aplicación de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos contribuyó a disminuir significativamente la latencia de las semillas [8]; [16]. Mediante el cultivo *in vitro* de embriones se logró obtener una germinación en aproximadamente 56 días, las plántulas aún se encuentran en fase de laboratorio, falta estandarizar el medio de cultivo de enraizamiento para proceder a la fase de aclimatación.



**Figura 1.** Porcentaje de germinación de los embriones de coyol (*Acrocomia aculeata*) en dos medios diferentes. T1: M&S al 100% suplementado con ácido giberélico, antioxidantes y vitaminas M&S. T2: M&S al 100% con vitaminas M&S.

## Conclusiones

La técnica de cultivo *in vitro* aceleró el proceso de germinación de los embriones. Además, el protocolo de desinfección permitió el establecimiento de las semillas en un 100%. Aproximadamente entre las 8 – 10 semanas se observó la aparición de cotiledones, por otro lado, la adición de ácido giberélico al medio de cultivo aumentó el porcentaje de germinación, obteniéndose un 47% de semillas germinadas con el medio T1.

Se encontraron diferencias estadísticas en cuanto al tratamiento suplementado con reguladores de crecimiento (T1) y el tratamiento control (T2) según la prueba Q de Cochran con un  $\alpha$  de  $p \leq 0.05$ . Se observó que los embriones presentaron un mejor desarrollo en el medio T1, por lo tanto, la adición de reguladores de crecimiento tiene una influencia positiva en la germinación y el desarrollo de los mismos.

La aplicación de antioxidantes en el medio de cultivo junto con la ausencia de luz durante un período de al menos 4 semanas, presentó un efecto significativo en la reducción de la oxidación y por ende se produjo un mayor aumento en la viabilidad de los embriones. También se realizaron subcultivos periódicos para renovar el medio y reducir la necrosis ocasionada por la oxidación.

## Referencias

- [1] C. B. Sorol, D. I. Haupenthal y M. E. Reckziegel, «Caracterización de la germinación, la plantula y el crecimiento inicial de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) ex Mart.,» *Rojasiana*, vol. 11, 2012.
- [2] E. Ferreira, M. Contin y S. Yoshimitsu, «Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata*,» *Scientia Agricola*, vol. 67, n° 4, 2010.
- [3] A. Rubio Neto, F. Guimaraes Silva, J. De Fatima Sales, L. Leandro Pires, B. Silva Moraes de Freitas y A. Lorryne Souza, «Effects of drying temperature on viability of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) zygotic embryos,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, n° 4, 2015.
- [4] N. Zamora, J. González y L. Poveda, Árboles y arbustos del bosque seco de Costa Rica, San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, 1999.
- [5] A. Velazquez Mendez, «Caracterización Fitoquímica, molecular y evaluación de respuestas del cultivo *in vitro* de coyol (*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti),» Chapingo, Mexico, 2013.
- [6] M. Díaz, R. Navarro y F. Ruíz, «Morfoanatomía de embriones de *Acrocomia aculeata* Lodd. ex. Mart.,» *Chapingo Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol. 24, n° 1, pp. 91 - 100, 2018.
- [7] A. Masis, R. Espinoza, D. Perez, F. Chavarria y A. Guadamuz, «Área de Conservación Guanacaste,» 1998. [En línea]. Available: [https://www.acguanacaste.ac.cr/paginas\\_especie/magnoliophyta/arecaceae/acrocomia\\_aculeata/a\\_aculeata30jun98/a\\_aculeatas30jun98.html](https://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/magnoliophyta/arecaceae/acrocomia_aculeata/a_aculeata30jun98/a_aculeatas30jun98.html). [Último acceso: 7 Marzo 2019].
- [8] A. Rubio, F. Guimaraes, J. de Fatima, E. Fialho, L. Queiroz y R. Candido, «Dormancy breaking in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds,» *Acta Scientiarum Agronomy*, vol. 36, n° 1, pp. 43 - 50, 2014.
- [9] M. Viñas y V. Jiménez, «Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae),» *Colombiana de Biotecnología*, vol. 13, n° 1, pp. 229 - 242, 2011.
- [10] V. Ángulo Gonzalez, R. Vázquez Ortega, F. Gutiérrez Miceli y T. Ayora Talavera, Escritores, *Germinación in vitro de embriones cigóticos inmaduros de coyol (Acrocomia mexicana KART. EX MART)*. [Performance]. IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, 2006.
- [11] C. Fiori Fernández, M. Díaz Lezcano y L. González Segnana, «Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.,» *Colombia Forestal*, vol. 19, n° 1, pp. 67 - 78, 2015.
- [12] L. Monteiro Ribeiro, D. Trombert Oliveira y Q. de Souza Garcia, «Structural evaluation of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination,» *Trees*, vol. 26, pp. 851-863, 2012.
- [13] D. Dias, P. Lopes, L. Ribeiro, L. Oliveira, E. Mendes y V. Carvalho, «Effects of seed structures, sucrose and gibberellic acid on the germination of *Butia capitata* (Arecaceae),» *Seed Science and Technology*, vol. 41, n° 3, pp. 371 - 382, 2013.
- [14] R. Ancansi Espejo, J. Montero Tonconi, N. Ferreira Castedo y I. Muñoz Guzmán, «Determinación de un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L.),» *Journal of the Selva Andina Research Society*, vol. 7, n° 2, 2016.
- [15] M. Jordán y J. Casarretto, «Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas,» *Fisiología Vegetal*, pp. 806 - 834, 2006.
- [16] A. Goncalves, T. Soares, P. Pereira y L. Monteiro, «Water uptake and pre-germination treatments in macaw palm (*Acrocomia aculeata* - Arecaceae) seeds,» *Journal of seed Science*, vol. 35, n° 1, 2013.

# Contribuciones al Desarrollo Forestal de Costa Rica

## Contributions to Forest Development of Costa Rica

Elizabeth Arnáez-Serrano<sup>1</sup>, Ileana Moreira-González<sup>2</sup>

---

Arnaez-Serrano, E; Moreira-González, I. Contribuciones al Desarrollo Forestal de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 36-40.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4625>

1 Bióloga. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [earnaez@tec.ac.cr](mailto:earnaez@tec.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0003-4058-4429>

2 Bióloga. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [ilea2757@gmail.com](mailto:ilea2757@gmail.com)

 <https://orcid.org/0000-0001-9426-0986>



## Palabras clave

Especies forestales; semillas forestales; anatomía vegetal; autoecología.

## Resumen

El presente artículo muestra una revisión histórica de un grupo de funcionarios de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), en conjunto con investigadores de la Escuela de Ingeniería Forestal del TEC y de las universidades estatales de Costa Rica, que incluyeron estudios relacionados con el manejo de semillas forestales, manejo en vivero rescate de especies, anatomía vegetal, autoecología, y establecimiento en campo. Estos proyectos permitieron establecer una línea de trabajo creciente en otros campos del estudio de las especies con uso forestal.

## Keywords

Forest species; forest seeds; plant anatomy; autoecology.

## Abstract

This article shows a historical review of a group of officials from the School of Biology of the Technological Institute of Costa Rica (TEC), in conjunction with researchers from the Forest Engineering School of TEC and other state universities of Costa Rica, which included studies related to the management of forest seeds, nursery management, rescue of species, plant anatomy, autoecology, and establishment in the field. These projects allowed to establish a growing line of work in other fields of the study of species with forest use.

## Introducción

En el año 1985, el área de Biología adscrita a la Escuela de Química, se incorporó a una serie de estudios en el tema de especies forestales con las investigaciones de Silvana Alvarenga en el tema de *Swietenia macrophylla* (Caoba), Benjamín Mora en *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) y posteriormente en los que ya se realizaban en la Escuela de Ingeniería Forestal con un aporte biológico al tema de la investigación en semillas de especies forestales, gracias a la experiencia generada por las Biólogas Elizabeth Arnáez en el estudio de *Cedrela odorata* (cedros amargo) [1] e Ileana Moreira en los estudios de germinación de *Vochysia guatemalensis* (palo de mayo).

Esto permitió establecer una línea de trabajo sólida en estos temas considerando que la semilla es el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de la mayoría de las especies y constituye hasta el momento, la estructura menos conocida de las plantas superiores y que estudios en este tema darían pie a la obtención de financiamiento con mayor facilidad.

En un primer proyecto en conjunto con los ingenieros Freddy Rojas y Gustavo Torres de la Escuela de Ingeniería Forestal, se utilizaron semillas de diez especies forestales nativas de altura (1200-2900 m.s.n.m.), a las cuales se les describió la morfología en donde se consideraron algunos aspectos como germinación, desarrollo de plántula, fenología y manejo en general, las especies estudiadas fueron: *Brunellia costarricensis* (cedrillo), *Prumnopitys standleyi* (ciprecillo), *Ulmus mexicana* (tirá), *Cornus disciflora* (lloró), *Cedrella tonduzii* (cedro), *Alfaroa costarricensis* (gaulín), *Quercus costarricensis* (roble), *Prunus annularis* (duraznillo), *Magnolia poasana* (Magnolia) y *Alnus acuminata* (jaul) [3], [4], [5].

También se trabajó con especies de las zonas bajas de Costa Rica, las cuales fueron: *Calophyllum brasiliensis* (Guttiferae), *Cordia alliodora* (Boraginaceae), *Goethalsia meiantha* (Tiliaceae), *Hieronyma oblonga* (Euphorbiaceae), *Stryphnodendron microstachyum* (Leguminosae), *Terminalia amazonia* (Combretaceae), *Vochysia ferruginea* (Vochysiaceae), *Vochysia guatemalensis* (Vochysiaceae) y *Zanthoxylum mayanum* (Rutaceae) [6]. Se realizaron disecciones para analizar las características morfológico-anatómicas internas y externas de las diferentes especies. La descripción se hizo del material recién colectado, así como del procesado en microscopía de luz (con parafina) y microscopía electrónica de barrido en [7].

Para entonces se vinculó la Escuela de Biología con el proyecto a nivel país COSEFORMA-GTZ donde participaron además de Moreira y Arnáez, otros investigadores de la Escuela de Ingeniería Forestal tales como Olman Murillo, Marvin Castillo, Lucía Rodríguez y Dagoberto Arias. Los resultados de las investigaciones de este período 1990-1997 quedaron plasmadas en material didáctico elaborado para talleres con productores en el tema de plantaciones mixtas y domesticación de especies nativas maderables tales como: *Almendro amarillo* (*Dipteryx panamensis*) [8], *Botarrama* (*Vochysia ferruginea*), *Cebo* (*Vochysia guatemalensis*), *Lagarto amarillo* (*Zanthoxylum mayanum*), *Pilón* (*Hieronyma oblonga*) y *Vainillo* (*Stryphnodendron excelsum*). Los trabajos comprendían no solo estudios morfológicos de semillas, sino además se incorporó la metodología para determinar el comportamiento fenológico de las especies. Lo que permitió comenzar a medir el impacto del cambio climático en el comportamiento de las especies forestales nativas.

Se incorporaron después los estudios relacionados con la distribución de las raíces y su vinculación con factores ambientales, como temperatura, humedad relativa, precipitación y radiación solar, tipo, textura y composición química del suelo, entre otros. Todos estos parámetros básicos para poder hacer uso de especies nativas en modelos de plantación. Específicamente para especies como el pilón (*Hieronyma alchornoides*) [9], [10], botarrama (*Vochysia ferruginea*) [11] y cebo (*Vochysia guatemalensis*) [12]. Otros estudios más específicos fueron realizados en la Biología Reproductiva de especies forestales nativas de la Zona Huetar Norte de Costa Rica en *Ficus insipida* (Chilamate); *Sclerolobium costarricense* (tostao) y *Brosimum costaricanum* (ojoche).

Los resultados obtenidos mostraron que la metodología desarrollada tenía un gran potencial para el rescate de la variación genética y reproducción de especies forestales en peligro de extinción, haciendo posible su reintroducción en ecosistemas donde hayan sufrido una fuerte erosión genética o se hayan extinguido. También sirve de base para programas de domesticación y conservación mediante su cultivo en diversos agroecosistemas y programas de mejora genética.

El estudiar la biología estructural de las semillas es importante para comprender aspectos como por ejemplo los síndromes de dispersión, la depredación de las mismas, la manipulación de las semillas para sus diferentes usos, entre otros. El describir las semillas aporta un criterio más amplio para elegir un tratamiento pregerminativo adecuado, así como un manejo óptimo en vivero de especies de las cuales se conocía muy poco y que ahora se pueden manipular para la mejora del material vegetal que se usa para reforestación [6].

El CIB desde sus inicios aportó a la problemática del desarrollo forestal de Costa Rica desde dos puntos de vista, uno es la tasa de deforestación anual que tiene el país (entre el 2005 y el 2015 Guanacaste perdió 63.050 hectáreas de bosque) [13] y por otro los planes de reforestación que a su vez involucran la elección de especies, zonas óptimas de plantación, manejo de las especies en plantación y obtención del material para cumplir estos fines [3], [4], [6]. Su papel permitió, por lo tanto, contribuir a mejorar los procesos de selección de especies forestales y apoyar en los planes de reforestación en Costa Rica.

Otra novedad en la que el CIB participó fue con la interpretación de los estudios empleando diferentes instrumentos tales como: microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz con inmersión del material en parafina, así como estudiar el proceso de germinación y desarrollo de plántula, lo que brindó nuevos aportes en aspectos de comportamiento de las diferentes especies [3], [4], [5], [6], [7], [14]. En Costa Rica, son pocos los estudios realizados en este campo; sin embargo, son las instituciones de educación superior las que más han colaborado en este aspecto, entre ellas: Universidad de Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y Organización para Estudios Tropicales.

Después de mucho esfuerzo, con base en las investigaciones demostradas por la Escuela de Biología (CIB) y la Escuela de Ingeniería Forestal (CIIBI), llevaron al sector forestal a organizarse, debido a la necesidad inminente de una solución a mediano y largo plazo que permitiera a las diferentes zonas, recuperarse del deterioro ambiental que habían sufrido, al deterioro de la calidad de las fuentes de agua para las zonas urbanas, la erosión del suelo, pérdida de bancos de germoplasma, así como de sus bellezas escénicas naturales visitadas por otros sectores como el turismo, la academia universitaria, etc. La domesticación de las especies forestales nativas se vio como una opción para impulsar el desarrollo forestal del país.

El CIB siguió participando en proyectos con especies forestales donde se incluían ya técnicas novedosas como la crioconservación en especies ya estudiadas en los que a comportamiento se refiere, en donde la PhD. Ana Abdelnour fue la investigadora que le ha permitido figurar como un Centro de Investigación con un gran valor en este tema.

Entre las alianzas de Centros de Investigación, las investigadoras Arnáez y Moreira unieron esfuerzos en un proyecto interuniversitario (UNA, ITCR, UNED, CONARE, 2007-2009), propuesto y coordinado por el INISEFOR, que tuvo como objetivo contribuir a la supervivencia y conservar la diversidad genética de seis especies en peligro crítico (*Cedrela salvadorensis*, *Platymiscium yucatanum*, *Paramachaerium gruberi*, *Cedrela fissilis*, *Ruagea insignis* y *Gamanthera herrerae* [14], [15], mediante la aplicación métodos de conservación y reproducción *ex situ*. Como actividad adicional del proyecto, se estableció un rodal de conservación genética de *Swietenia macrophylla* (caoba) mediante la donación por parte del CATIE de una colección de semillas de varias poblaciones de América Latina, trabajo liderado por el Ingeniero Eugenio Corea.

Actualmente el CIB participa en los estudios forestales que se están realizando en el Área de Conservación OSA (Costa Rica) educando en temas de su competencia a las asociaciones que funcionan en este lugar en pro de lograr un manejo forestal consciente y atinente a las demandas actuales del mercado protegiendo la biodiversidad, coordinado por el Ing. Marvin Castillo de la Escuela de Ingeniería Forestal.

## Conclusiones

Se pudo comprobar en campo las importantes limitantes reproductivas en varias especies y poblaciones, como por ejemplo la ausencia de floración, que pocos árboles producen semilla viable, algunos en muy pequeñas cantidades o solamente en algunos años. Es notoria la escasez casi total de individuos árboles jóvenes en muchos de los individuos estudiados. Entre las posibles razones de esta situación están: cambio climático, erosión genética, aislamiento y endogamia, ausencia de polinizadores y/o de dispersores de las semillas, falta de hábitat adecuado para las plántulas, etc.



## Referencias

- [1] Arnáez, E. y Flores, E. 1988. Características de la madera de *Cedrela odorata* L. (cedro amargo), Meliaceae., en Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 36 (1): 67-75.
- [2] Moreira, I. y Arnáez, E. 1990. Estudio preliminar sobre la autoecología de *Vochysia hondurensis*. *Rev. Tecnología en Marcha*, 10 (3): 29-34.
- [3] Rojas, F.; Torres, G.; Arnáez, E. y Moreira, I. 1992. Especies Forestales Tropicales. Cuadernos Científicos y Tecnológicos 1-10. Editorial Tecnológica, Costa Rica.
- [4] Arnáez, E. y Moreira, I. 1992. Estudio morfológico de semillas de especies forestales de altura. *Tecnología en Marcha* 11(3): 67-72.
- [5] Bozo, J. (editor). 2002. *Tropical Tree, seed manual*. United States Department of Agriculture Forest Service.
- [6] Moreira, I. y Arnáez, E. 1994. Morfología de las estructuras reproductoras y germinación de nueve especies forestales nativas de Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 42 (2): 73-82
- [7] Moreira, I y Arnáez, E. 2000. Estudio morfológico de semillas de especies forestales nativas. *Rev. Tecnología en Marcha (ITCR)* 13(Especial):76-80
- [8] Baltazar H. ; Moreira, I. ; Arnáez, E. ; Sánchez, E. 2001. Estudio morfológico de diferentes estadios ontogénicos de flor, fruto y semilla de *Dipteryx panamensis* (almendro) *Tecnología en Marcha* 14(1): 124-132.
- [9] Arnáez, E. y Moreira I. 2004. Estudio de raíces en *Hieronyma alchorneoides* Allemao (pilón) en Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. *Kurú* 3(9) 31 diciembre .
- [10] Moreira, I. y Arnáez, E. 2008. Algunos aspectos de la morfología radicular de *Hieronyma alchorneoides* (pilón). *Revista Tecnología en Marcha* 22(1): 66-76.
- [11] Arnáez, E. y Ortiz, R. 2010. Estudio radicular de *Vochysia ferruginea* (botarrama) en plantación y condiciones naturales. Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*. 23(1): 9-18.
- [12] Moreira, I. y Arnáez, E. 2007. Estudio radicular de *Vochysia guatemalensis* en Sarapiquí Heredia, CR. *Tecnología en Marcha* 20(1): 3-12.
- [13] Méndez, A. Logros en la cobertura forestal enfrentan nuevas amenazas Programa Estado de la Nación. 2018. <https://www.estadonacion.or.cr>
- [14] Corea Arias, E.; Arnáez-Serrano, E., Moreira-González , I., Castillo-Ugalde, M. 2016. Situación de nueve especies forestales en peligro crítico de extinción en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 13(33): 36-46
- [15] Moreira, I; Arnáez, E., Sánchez, E. 2015. Algunos aspectos del desarrollo ontogénico de *Platymiscium pinna-tum var. polystachium* (Jacq.) Dugand (Cristóbal). *Tecnología en Marcha* 17(2): 3-12.

# Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial

Bioprocesses in biotechnology: use of bioreactors for the production and scaling of products of commercial interest

Catalina Rosales-López<sup>1</sup>

---

Rosales-López, C. Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 41-46.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4626>



<sup>1</sup> Ing. Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: crosales@itcr.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0001-8336-0498>

## Palabras clave

Bioprocesos; biorreactor; microorganismos; células vegetales.

## Resumen

Entre los laboratorios con que cuenta el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), está el Laboratorio de Bioprocesos. Esta área involucra todas las líneas de acción del CIB, ya que con el uso biorreactores o sistemas de inmersión temporal se pueden poner a crecer microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), células vegetales, microalgas y células animales, con un objetivo en común: la producción masiva de células o de compuestos bioactivos, convirtiéndose en una herramienta eficaz para la micropropagación, ya que incrementa el coeficiente de multiplicación y produce el mejoramiento en la calidad del material regenerado *in vitro*. El empleo de estos sistemas incide en la reducción de los costos de producción en el cultivo a escala, ampliamente documentado en gran número de especies de valor comercial. Por otra parte, se controlan varias condiciones de cultivo como lo son pH, agitación, oxígeno disuelto y la producción de espuma. El CIB cuenta con cuatro biorreactores para investigación, que van desde 250 ml, 3 L y hasta 7 L. En este artículo se presenta una descripción de los bioprocesos realizados en el CIB con diferentes microorganismos y células vegetales.

## Keywords

Bioprocesses; bioreactor; microorganisms; plant cells.

## Abstract

Amongst the laboratories at the Biotechnology Research Center (CIB) of Costa Rica Institute of Technology (TEC), is the Bioprocesses Laboratory. This area involves all the lines of action of CIB, using bioreactors or temporary immersion system to grow microorganisms (bacteria, fungi and yeasts), plant cells, microalgae and animal cells with a common goal: the mass production of cells or bioactive compounds, becoming an effective tool for micropropagation, since it increases the multiplication coefficient and improves the quality of the material regenerated *in vitro*. The use of these systems reduces the costs in scale farming, which has been widely documented in a large number of species of commercial value. On the other hand, several culture conditions can be controlled in these systems, such as pH, agitation, dissolved oxygen and foam production. The CIB has four bioreactors for research, ranging from 250 mL, 3 L and up to 7 L. This article summarizes some of the projects which have studied plants and microorganisms in bioreactors at CIB.

## ¿Qué son los bioprocesos?

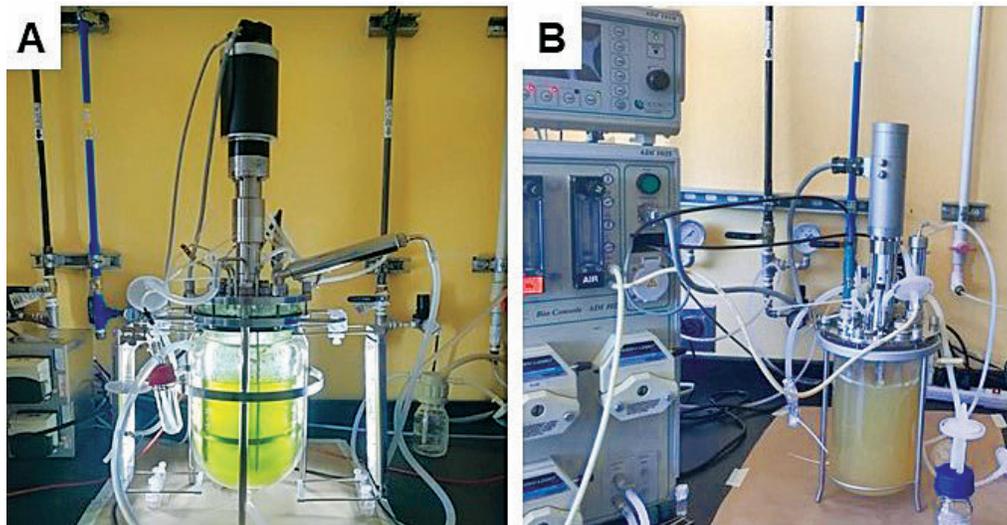
La definición de bioprocesos se encuentra dentro del concepto de Biotecnología: “*Biotecnología es el uso de organismos vivos o parte de ellos para obtener un producto o servicio útil para el hombre*”. Mientras tanto, un bioproceso es “*un proceso que involucra métodos de la ingeniería química a los procesos biotecnológicos*” [1].

Se pueden aplicar bioprocesos para obtener productos que serán utilizados por los seres humanos en salud humana y animal (antioxidantes, antiinflamatorios), industria química (enzimas), las industrias de las fermentaciones (alcoholes), en la agricultura y alimentación

(biocontroladores, colorantes), en el medio ambiente (degradadores de contaminantes) o para obtener energía (biocombustibles) y en la industria farmacéutica (antibióticos). Para, ello requiere de la aplicación de distintas técnicas biotecnológicas: biología molecular, biología celular, bioquímica, microbiología, ingeniería de procesos, cultivo de tejidos, química y biología.

La figura principal de un bioproceso es un fermentador o biorreactor, el cual es un sistema de contención apropiado, que debe diseñarse para brindar el mejor medio ambiente para el crecimiento celular y actividad metabólica [2]. En otras palabras, es un pequeño ecosistema totalmente controlado que le permite al organismo vivo crecer adecuadamente. Existen diferentes tipos, pero la diferencia principal en el diseño se da dependiendo de los requerimientos para el cultivo, el tipo de microorganismo y el tipo de fermentación. La desventaja principal de dichos equipos son los altos costos que representa la adquisición de un biorreactor comercial.

El CIB, cuenta con cuatro biorreactores comerciales (tres de marca Applikon y uno marca Bioengineering) utilizados para la investigación, dos ubicados en el Laboratorio de Bioprocesos (figura 1) y dos en el Laboratorio de Biocontrol. Además, otros fermentadores de bajo costo que se utilizan para el crecimiento de microalgas en el Laboratorio de Bioenergía. En el área de tejidos vegetales también se utilizan los Sistemas de Inmersión Temporal para la micropropagación, ya que incrementan el coeficiente de multiplicación y producen el mejoramiento en la calidad del material regenerado *in vitro* [3, 4].



**Figura 1.** Biorreactores del Laboratorio de Bioprocesos del Centro de Investigación en Biotecnología. A) Biorreactor Marca Bioengineering 7 L con cultivo de microalgas (proyecto a cargo del PhD. Andrés Sánchez Kooper) y B) Biorreactor marca Applikon 3 L con crecimiento del hongo *Ganoderma* sp (proyecto doctoral de MSc Catalina Rosales López).

En Costa Rica son pocos los laboratorios especializados en bioprocesos, entre ellos se puede mencionar al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), el Instituto Clodomiro Picado y el CIB-TEC. E igualmente son pocas o casi nulas las empresas que utilizan equipos tan sofisticados. Muchas empresas obtienen sus productos con el uso de fermentadores, los cuales son equipos caseros de bajo costo que funcionan como contenedores para el desarrollo de una fermentación, pero en ellos, a diferencia de los biorreactores comerciales, no se puede controlar la agitación, el pH del medio, la aireación y mucho menos se puede tomar una muestra periódicamente porque se contamina el sistema.

## Investigaciones en bioprocesos

La estrategia empleada en las investigaciones en esta área dentro del CIB, involucra el diseño de experimentos en pequeña escala, donde se emplean técnicas de optimización con el objetivo de reducir problemas y costos a la hora de escalar o reproducir un proceso, aumentando a la vez la precisión de los parámetros estimados y disminuyendo el esfuerzo experimental [2]. Seguido, se miden las cinéticas (determinación y cuantificación de las reacciones bioquímicas dentro del sistema), para predecir el transcurso de la fermentación, evaluar velocidades de consumo y producción, rendimientos y productividades. Toda esta información, al final es útil para establecer estrategias de producción al escalar un proceso optimizado, y ser implementado para generar productos. En síntesis, las investigaciones en las que se implementa el uso de un biorreactor, es porque ya se ha optimizado previamente las condiciones de cultivo en volúmenes más pequeños.

El CIB cuenta con un laboratorio especializado para trabajar, acondicionado con tuberías de distintos gases y agua potable en la pared que permiten inyectarle a los biorreactores, así como espacio suficiente para colocar los equipos, sus consolas y computadoras. Entre los proyectos realizados en el CIB se pueden mencionar:

- 2012. Obtención de líneas celulares de *Uncaria tomentosa* superproductoras de alcaloides, cultivadas en biorreactor, para su posterior regeneración y multiplicación masiva para su utilización a mediano plazo, como parte de la cadena productiva de obtención del extracto [5]
- 2014. Optimización del cultivo en suspensión de *Azadirachta indica* con miras al escalamiento en biorreactor.
- 2015. Producción de carotenoides a partir de dos cepas de hongos: *Pycnoporus sanguineous* y *Rhodotorula sp*, para su empleo en productos veterinarios de consumo animal.
- 2016. Escalamiento del cultivo de células en suspensión de *Azadirachta indica* en biorreactor de tanque agitado para la producción de azadiractina.
- 2017. Diseño de un proceso para la obtención de compuestos funcionales con capacidad antioxidante a partir de cultivos celulares de mora (*Rubus adenotrichos Schlttdl.*) en biorreactor [6].
- 2017. Análisis de flujos metabólicos como línea base para ingeniería metabólica de especies de microalgas productoras de aceite.
- 2018. Análisis de flujos metabólicos compartimentalizados en microalgas autóctonas de Costa Rica.
- 2018. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Ganoderma spp.* en medio líquido para su posterior escalamiento a biorreactores tipo tanque agitado.

Ha sido tanta la utilidad de los bioprocesos y los logros obtenidos con las investigaciones realizadas en el CIB, que se formularon dos cursos para los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del TEC. A partir del 2012, se imparte por primera vez el curso de Ingeniería Bioquímica (V Semestre), en el cual se les proporciona a los estudiantes una introducción sobre los biorreactores, cómo y en qué utilizarlos, además de todo lo sucede dentro del sistema. En este cursos como proyecto final, los estudiantes diseñan y arman un equipo funcional de bajo costo. Al siguiente año, los estudiantes reciben el curso Sistemas Biotecnológicos de Producción (VII Semestre), un curso más aplicado en la obtención de productos y de mayor dificultad. Se espera que, al transmitir estos conocimientos entre los estudiantes, a futuro se amplíen las investigaciones en ésta área.

Al mismo tiempo, este tema ha sido un campo para el desarrollo y capacitación de estudiantes asistentes, así como para realizar sus trabajos finales de graduación (cuadro 1) tanto de bachillerato como licenciatura, dentro y fuera del CIB y del país, y varios de ellos han querido continuar estudiando y experimentando con estos equipos, para lo cual han tenido que salir del país a especializarse más en el tema, aplicando en posgrados.

**Cuadro 1.** Muestra de tesis de grado de estudiantes de Ingeniería en Biotecnología (Escuela de Biología, TEC) que se han realizado en el tema de Bioprocesos.

Año	Estudiante	Título de tesis	Lugar
2011	Karol Jiménez Quesada	Evaluación del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni con el empleo de sistemas de micropropagación semi-sólido, inmersión temporal RITA y biorreactor de burbujeo [7]	CIB
2012	Ariana Montero Quirós	Optimización del medio de cultivo en matraz para la producción por fermentación líquida de los hongos <i>Trichoderma sp</i> y <i>Beauveria sp.</i>	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot)
2012	Asdrúbal José Mayorga Lamas	Cultivos heterotróficos de <i>Chlorella sp.</i> en biorreactores airlift para la producción de biodiesel	Laboratorio de Fermentaciones Universidad Nacional Santa Fe, Argentina
2014	Kevin Mata	Optimización del cultivo en suspensión de <i>Azadirachta indica</i> con miras al escalamiento en biorreactor"	CIB
2015	José Pablo Cerdas Velásquez	Elaboración de un protocolo para la producción de bioetanol a partir de residuos de madera de <i>Gmelina arborea</i> mediante digestión química-enzimática y fermentación no alimentada utilizando de una cepa transformada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos del ITCR
2015	Valmore Guevara Manzanares	Producción de ácidos ganodéricos y $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanos en el cultivo líquido sumergido de <i>Ganoderma sp</i> de interés medicinal en la industria alimenticia de Costa Rica	CIB-CENIBiot
2016	Judith Cervantes Solano	Diseño experimental del proceso de fermentación de la Galleta Soda	Empresa Pozuelo
2016	Jorge Madrigal Rueda	Escalamiento de cultivos celulares de <i>Morinda citrifolia</i> a un biorreactor de tipo tanque agitado de 7 litros, para la producción de Antraquinona Roja como alternativa para tinte de origen natural	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot)
2017	Ulises Andrés Salas Villalobos	Caracterización de la hidrodinámica y coeficiente de transferencia de masa de un reactor tipo airlift	Departamento de Bioingeniería, del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Estado de México
2017	Cristian Chavarría Araya	Evaluación del proceso de fermentación de la cerveza artesanal de la empresa Hoppy ideas Craft Brewing Company y la determinación de los puntos críticos en el proceso.	Empresa Hoppy ideas Craft Brewing Company, Cervecería artesanal
2017	Karla Salas Arias	Producción de <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> variedad silvestre en dos diferentes Sistemas de Inmersión Temporal bits y setis	CIB-CENIBiot
2017	Tania María Gómez Bolívar	Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de <i>Trichoderma</i> mediante fermentación en líquido y sólida	ICAFE



## Conclusión

El contar en el CIB con el área de investigación en Bioprocesos ha abierto las puertas al escalamiento de los procesos, y ha creado acceso a otra disciplina para que los estudiantes e investigadores en Biotecnología generen conocimiento, obteniendo productos libres de contaminantes, con potencial para producir metabolitos secundarios y productos innovadores a partir de organismos vivos para la comercialización.

## Referencias

- [1] Diccionario de la Real Academia Española, consultado Marzo, 2019
- [2] F. Gódia y J. López, "Ingeniería Bioquímica. Ciencias Químicas: Tecnología bioquímica y de los alimentos". Ed. SINTESIS, Barcelona, España, 2005.
- [3] M.P. Watt, "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation". *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 76, pp. 14025-14035, September 2012. DOI 10.5897/AJB12.1693
- [4] M. Berthouly and H. Etienne, "Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation" In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, edit. Springer Netherlands, pp. 165-195, 2005. Disponible en: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5_11)>
- [5] S. Alvarenga, C. Rosales-López and F. Aguilar, "Herramientas biotecnológicas para el manejo sostenible del cultivo y la comercialización de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en Costa Rica". Resumen de Congreso SILAE, 2014.
- [6] A. Schmidt-Durán, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón-Cerdas, L.F. Alvarado-Marchena and D. Flores-Mora, "Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) and its microscopic analysis". *SpringerPlus*, vol. 5, no. 1, pp. 1717, December, 2016.
- [7] K. Jiménez-Quesada, "Evaluación del desarrollo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni con el empleo de sistemas de micropropagación semi-sólido, inmersión temporal RITA y biorreactor de burbujeo". Tesis de graduación, bachillerato en Ing. en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2011.

# Implementación de las técnicas de RMN y cristalografía de macromoléculas para la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico

Implementation of NMR and macromolecular crystallography techniques for structural characterization of proteins of biomedical interest

Silvia Arce-Solano<sup>1</sup>, Erick Hernández-Carvajal<sup>2</sup>

Arce-Solano, S; Hernández-Carvajal, E. Implementación de las técnicas de RMN y cristalografía de macromoléculas para la caracterización estructural de proteínas de interés biomédico. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 47-55.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4627>



- 1 Investigadora Instructora. Ing. Licenciada en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología, Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: smarce@tec.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0003-4357-3661>
- 2 Investigador Asociado. Doctor en Biomedicina. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Escuela de Biología, Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: erhernandez@tec.ac.cr  
 <https://orcid.org/0000-0002-5585-9125>

## Palabras clave

Macromoléculas; RMN; cristalización; difracción de rayos X; cristalografía; estructura 3D de proteínas; FVIII; trombina; fosfolipasas; metaloproteasas.

## Resumen

La implementación de novedosas técnicas biofísicas para análisis de proteínas a escala atómica, tales como la resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN) y la cristalografía de rayos X, permiten el estudio de los mecanismos moleculares de interacción entre proteínas de interés y, -en algunos casos-, permite explorar mecanismos alternativos para el diseño de nuevos fármacos. Nuestro grupo ha desarrollado dos líneas de investigación buscando implementar y consolidar dichas técnicas biofísicas, con el objetivo de comprender mejor las interacciones entre sustratos, -como el factor VIII y el receptor de plaquetas PAR1- con la trombina, en los procesos de coagulación sanguínea; y, por otra parte, conocer mejor la actividad funcional de algunas proteínas provenientes de venenos de serpientes. La interacción de regiones conectoras del FVIII humano con la trombina fue estudiada utilizando la técnica de RMN, a través de ensayos mono, bi y tri-dimensionales, donde los conectores del FVIII humano fueron marcados con los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  empleando sobreexpresión heteróloga en cepas de *Escherichia coli*. Mediante la técnica de cristalografía de rayos X se ha logrado obtener cristales a partir de la generación de complejos de las proteínas recombinantes humanas con la trombina, y se han desarrollado una serie de mutantes del FVIII y PAR1, para favorecer complejos intermedios más estables con la trombina. Por último, se ha trabajado con una metaloproteinasa del veneno de la serpiente *Crotalus simus* y una fosfolipasa de *Botriechis schelegelii*. De esta última se obtuvo una estructura 3D a una alta resolución ( $\sim 2.5$  Å).

## Keywords

Macromolecules; NMR; crystallization; X-ray diffraction; crystallography; protein 3D structure; FVIII; thrombin; phospholipases; metalloproteases.

## Abstract

The implementation of cutting-edge biophysics techniques to analyze proteins at atomic-scale, such as nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography, allows the study of molecular interaction's mechanisms between proteins of interest and, -in some cases-, allows exploring alternative mechanisms for new drug design. Our research group has developed two lines of research seeking to implement and consolidate the biophysical techniques mentioned above, with the aim of better understanding the interactions between substrates, such as factor VIII and platelet receptor PAR1, with thrombin, in the processes of blood coagulation; and on the other hand, to better understand the functional activity of some proteins from snake venoms. The interaction between connectors of the human FVIII with thrombin was studied through NMR mono-, bi- and tri-dimensional assays. For these experiments, the human FVIII connectors were labelled with  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  isotopes using heterologous overexpression in *Escherichia coli* strains. Through X-ray crystallography technique, crystals of complexes between recombinant proteins and thrombin have been grown, and a series of FVIII and PAR1 mutants have been developed to favor more stable intermediate complexes with thrombin. On the other hand, a metalloproteinase from the snake venom of *Crotalus simus* and a phospholipase from *Botriechis schelegelii* have also been analyzed. From the latter, a 3D structure was obtained at a high resolution ( $\sim 2.5$  Å).

## ¿Qué es la Biología Estructural de proteínas?

La Biología Estructural de proteínas se basa en el principio de que la función de una proteína depende, de manera crítica, de la estructura tridimensional de la misma. Es por este motivo que, para comprender el funcionamiento y el mecanismo de acción de una proteína, se estudia su estructura tridimensional. Durante las últimas dos décadas, dos de las técnicas mayormente utilizadas para la determinación de estructuras de proteínas han sido la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos X [1].

La técnica de RMN se basa en que los núcleos atómicos al ser expuestos a un campo magnético externo pueden absorber energía en forma de radiación electromagnética a una determinada frecuencia, según el tipo de núcleo y su entorno químico. Esto va a provocar que los núcleos se alineen al campo magnético externo bajo una diferente frecuencia de resonancia, la cual proporciona información detallada de la estructura molecular en la que los átomos se encuentran [2], [3]. Esta técnica permite obtener información de la estructura y propiedades dinámicas de las proteínas en solución, e incluso ayuda a determinar la estructura tridimensional en proteínas que no son cristalizables. Núcleos como el  $^1\text{H}$ , el  $^{13}\text{C}$  y el  $^{15}\text{N}$  son muy utilizados en la técnica de RMN, debido a que su número atómico impar les permite tener un momento magnético que favorece la resonancia en un campo magnético.

Por otra parte, la cristalografía de rayos X es una técnica que permite el estudio del ordenamiento de los átomos en diferentes estructuras cristalinas por la manera en que estas dispersan un haz de rayos X; fenómeno descubierto por el alemán von Laue en 1912 [4]. Requiere de una proteína purificada homogéneamente en una solución soluble para, a partir de esta, obtener un cristal formado mayormente por proteína. Dicho cristal es expuesto a un haz de rayos X y como resultado se obtienen patrones de difracción que son procesados para, en primer lugar, obtener información sobre la simetría del empaquetamiento del cristal y el tamaño de la celda unidad que se repite a lo largo del cristal. Posteriormente, las intensidades de los puntos obtenidos en el patrón de difracción dan información que permite determinar algunos factores estructurales que se utilizan para calcular un mapa de densidad electrónica [5] y finalmente modelar la estructura de la proteína.

## Biología Estructural de Macromoléculas en Costa Rica

### Historia del Laboratorio de Biología Estructural de Proteínas

El grupo de Biología Estructural de Proteínas es parte del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), fue fundado por el Dr. Erick Hernández-Carvajal en enero del 2014 tras la aprobación del proyecto “Expresión heteróloga, purificación, caracterización y cristalización de factores proteicos que participan en los procesos de coagulación sanguínea”, que permitió la continuación de las líneas de investigación que desarrolló durante sus estudios de doctorado en Biomedicina en el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona, España.

Las labores iniciaron en el Laboratorio de Biología Molecular en las antiguas instalaciones del CIB (edificio G7). Durante el 2014 se contó con cuatro asistentes estudiantiles y para el segundo semestre del primer año, se desarrolló el primer trabajo final de graduación de bachillerato universitario enmarcado dentro del proyecto vigente.

Empezando el 2015, se estrenaron las instalaciones actuales del CIB, las cuales permitieron crecer en espacio y equipos. Esto ha permitido al grupo desarrollar cinco proyectos nuevos de investigación, seis trabajos finales de graduación, dos proyectos estudiantiles de investigación

y realizar un curso de capacitación hasta la fecha. En el año 2016, se logró la contratación de una segunda investigadora dentro del grupo de trabajo, la Ing. Silvia Arce-Solano, quien previamente había sido asistente estudiantil desde el inicio de los proyectos y había realizado su trabajo final de graduación enmarcado dentro de los proyectos, además, posteriormente, ella realizó su tesis de licenciatura dentro de nuestras líneas de trabajo.

A lo largo de los años, también se ha dado un crecimiento en cuanto a la cantidad de asistentes estudiantiles que han tenido la oportunidad de colaborar en los proyectos de investigación y ampliar su conocimiento en el área de la Biología Estructural de Proteínas, actualmente suman 18 estudiantes de grado de Ingeniería en Biotecnología. Muchos de estos estudiantes ya son profesionales, y algunos de ellos han tenido la oportunidad de realizar sus trabajos finales de graduación en el mismo laboratorio como tal, e incluso en el extranjero (ej. Laboratorio Biomolecular de Resonancia Magnética Nuclear (Bio-RMN) del Instituto Científico del Hospital de San Raffaele (Milán, Italia), Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (Barcelona, España), y el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) (Barcelona, España)), así como en instituciones nacionales de prestigio como el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica, gracias a los contactos del grupo de investigación con dichas instituciones.

Actualmente, el grupo está conformado por dos investigadores y seis asistentes estudiantiles; se han desarrollado cinco proyectos, de los cuales dos están en curso (VIE 1510103: “Estudios estructurales de proteínas provenientes de venenos de serpientes de importancia biomédica para la búsqueda de posibles moléculas terapéuticas inhibitorias mediante difracción de rayos X” y FEES 1510108: “Bases moleculares de la interacción y la degradación de la membrana basal vascular por metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpiente”); y han contado con la colaboración de múltiples instituciones nacionales: el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y la Escuela de Química, de la Universidad de Costa Rica; el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteínas (LBBP) de la Universidad Nacional de Costa Rica; el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CeniBiot) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT); y la Escuela de Física del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Asimismo, en todos los proyectos se ha contado con la cooperación internacional por parte del Dr. Pablo Fuentes-Prior, de la Unidad Bases Moleculares de las Enfermedades del Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau) de Barcelona, España.

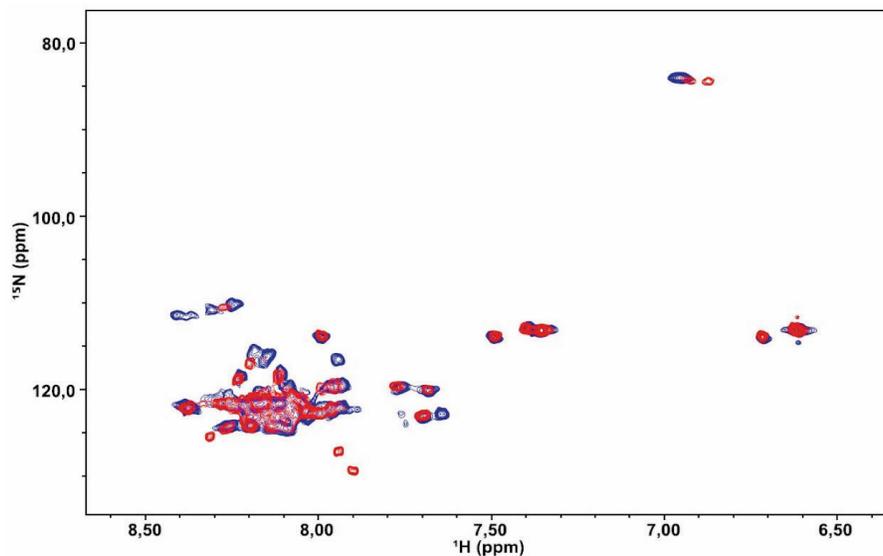
## Principales logros

### Implementación de ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas en solución

Uno de los logros más importantes fue realizar los primeros ensayos de Resonancia Magnética Nuclear de proteínas en Costa Rica, gracias al trabajo conjunto con el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica (UCR).

A pesar de que el equipo de espectrometría de resonancia magnética nuclear con el que cuenta el CIPRONA (Bruker Ascend 600 MHz) fue adquirido desde el 2011, no es hasta los ensayos realizados durante el segundo semestre del 2014, que el equipo es utilizado en medición de macromoléculas como las proteínas para la obtención de datos en una, dos y tres dimensiones, empleando una sonda especial para la detección de la triple resonancia. Anterior a esto, se había utilizado únicamente con moléculas orgánicas pequeñas, y para ensayos de una y dos dimensiones únicamente.

En los ensayos de RMN de macromoléculas en solución se trabajó con regiones conectoras inter-dominio del factor VIII humano que participa en los procesos de coagulación sanguínea. Estos conectores se proponen como las regiones que interactúan con la proteasa serínica, trombina, una de las principales proteínas implicadas en el proceso de formación del coágulo sanguíneo. Sin embargo, los mecanismos moleculares de esta interacción se desconocen, por ello, los ensayos de RMN se vuelven fundamentales para comprender de mejor manera las interacciones de proteínas solución. Los ensayos de RMN mono, bi y tri-dimensionales permitieron observar y determinar la interacción entre la trombina y los fragmentos del FVIII en estudio (figura 1). Para estos los experimentos se debió sobreexpresar heterológicamente los conectores del FVIII humano marcado con los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y el  $^{15}\text{N}$  en cepas de *Escherichia coli* en medio de cultivo especiales.



**Figura 1.** Superposición de los espectros HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del fragmento FVIIIa3- $^{15}\text{N}$  libre y en presencia de trombina. Se representa de color azul el espectro de resonancia del fragmento libre y en color rojo el espectro de resonancia del complejo.

### Apoyo en el desarrollo de capacidades a nivel centroamericano con cooperación internacional

Durante el 2015, el grupo de investigación tuvo la oportunidad de organizar un curso internacional teórico-práctico financiado por la Universidad de las Naciones Unidas dentro del Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC) y por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC; con el apoyo del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y del Programa de Investigación en Bioingeniería del TEC. El curso “Aplicaciones de PCR cuantitativo y técnicas de expresión heteróloga de proteínas como enfoques moleculares para la comprensión de mecanismos biológicos” contó con la participación de doce estudiantes de todos los países de Centroamérica y República Dominicana, seleccionados de un total de 120 postulantes de toda América Latina; más ocho estudiantes de Costa Rica, para un total de veinte participantes (figura 2). En este curso, los participantes recibieron conferencias magistrales (figura 2A) y sesiones de laboratorio (figura 2B) en las que se contó con la participación de profesores invitados internacionales: la Dra. Elena de Mendoza-Barberà, investigadora en el Departamento de Microbiología, Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (España); la Dra. María Ángeles Corral-Rodríguez, investigadora en

el Laboratorio Biomolecular de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del Instituto Científico del Hospital de San Raffaele (Milán, Italia) (figura 2A); y con el Dr. Fabián Arenas-Ríos, investigador en el Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (Barcelona, España) (figura 2B); así como el Dr. Erick Hernández-Carvajal, investigador del Centro de Investigación en Biotecnología del TEC.



**Figura 2.** Curso internacional de aplicaciones de PCR cuantitativo y técnicas de expresión heteróloga de proteínas como enfoques moleculares para la comprensión de mecanismos biológicos. A) Conferencia magistral a cargo de la Dra. María Ángeles Corral-Rodríguez. B) Sesión de laboratorio a cargo del Dr. Fabián Arenas-Ríos. C) Foto grupal con los estudiantes, profesores y organizadores del curso.

## Investigación conjunta con institutos de investigación nacional e internacional

### *Experiencias exitosas con el ICP*

En Costa Rica se ha hecho un esfuerzo considerable durante las últimas décadas, por estudiar y atender los envenenamientos por mordeduras de serpientes. Este es un tema muy importante a nivel nacional debido a la biodiversidad de serpientes con la que cuenta el país, siendo las regiones rurales las que normalmente son más afectadas y en donde, además, los índices de desarrollo humano son comúnmente más bajos y el acceso a los centros de salud es más limitado debido a las distancias, los caminos de esas zonas y el bajo número de centros de salud disponibles [6]. Una respuesta a esta iniciativa fue la creación del Instituto Clodomiro Picado en 1970, asociado a la Universidad de Costa Rica (UCR), que se ha encargado de mapear las especies de serpientes en el país, estudiar sus venenos y generar sueros antiofídicos disponibles para la población en general.

Los venenos de las serpientes se caracterizan por una enorme complejidad bioquímica y están compuestos por una gran cantidad de proteínas como proteasas serínicas, metaloproteasas, L-aminoácido oxidasas, fosfolipasas, desintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas y proteínas CRISP [7]. Comprender mejor la relación entre estructura y función de proteínas clave en los venenos de las serpientes, así como conocer los mecanismos de inhibición de estas, es importante para el futuro desarrollo de estrategias farmacológicas complementarias para el tratamiento en casos de mordeduras de serpientes, traduciéndose en un beneficio para los pacientes disminuyendo así las discapacidades, la morbilidad y la mortalidad.

Es por lo expuesto anteriormente, que desde el año 2016 hemos iniciado las investigaciones en conjunto con el ICP, en búsqueda de caracterizar a nivel estructural proteínas de interés en los venenos de las serpientes y sumar esta información a la caracterización bioquímica que se realiza por parte de dicho instituto.

### Ensayos de cristalografía de proteínas en Costa Rica con vinculación internacional

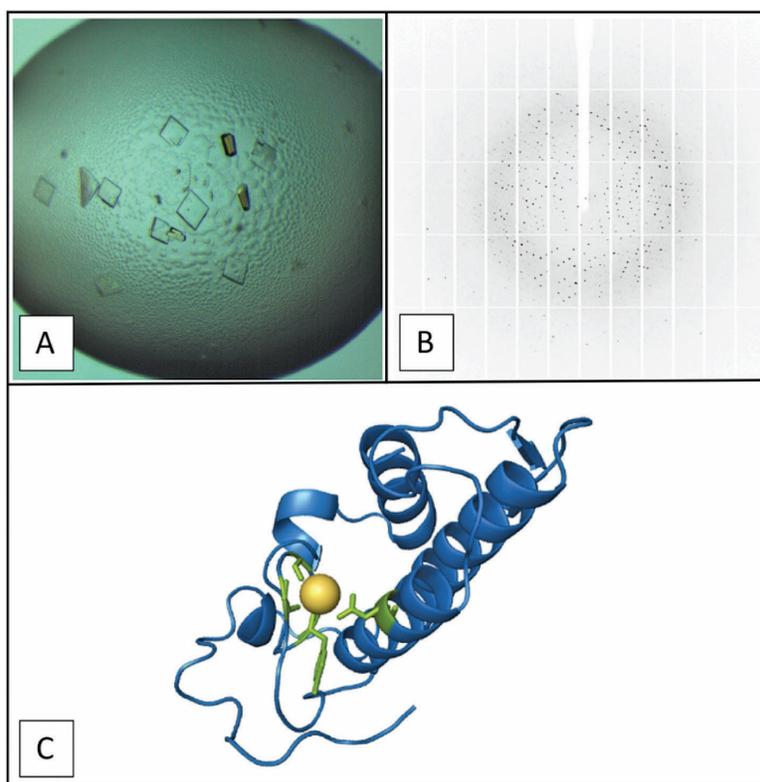
A pesar de que sólo se necesitan unos pocos cristales de buena calidad para resolver una estructura por medio de la cristalografía de rayos X, uno de los cuellos de botella de esta técnica es obtener cristales de alta calidad, dado que al ser la cristalización un proceso pluriparamétrico se dificulta determinar las condiciones ideales para que una proteína cristalice de forma ordenada [8]. La obtención de cristales de alta calidad es fundamental para que la información de difracción colectada sea fiable para la resolución de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que la búsqueda de las condiciones de cristalización adecuadas es fundamental. En este sentido, se ha trabajado con complejos proteicos de trombina con diferentes fragmentos del factor VIII humano de la coagulación sanguínea (conectores interdominio  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ , y mutantes de estos) y con el receptor de plaquetas PAR1; así como con variantes de una metaloproteinasa de la serpiente *Crotalus simus* y una fosfolipasa tipo  $A_2$  de la serpiente *Botriechis schelegelli*.

La estrategia de cristalización que se ha empleado con las proteínas mencionadas ha sido la difusión de vapor, específicamente la modalidad de gota colgante (*hanging-drop*). Se han estudiado cerca de 628 condiciones empleando los kits de cristalización: *JCSG-plus<sup>TM</sup>*, *Morpheus@*, *Morpheus@ II*, *PACTpremier<sup>TM</sup>*, *ProPlex<sup>TM</sup>*, *Structure Screen I*, *Structure Screen II*, *Structure Screen 3D*; todos de la empresa *Molecular Dimensions*.

Para visualizar estructuras a nivel atómico, es requerido utilizar radiaciones electromagnéticas que tengan longitudes de onda similares a las distancias de los enlaces atómicos (cercasas a 1 Å o 0.1 nm), las cuales pueden conseguirse con la radiación X [9]. Los rayos X se producen cuando un haz de electrones acelerados a alto voltaje, chocan con un blanco metálico que provoca que sean rápidamente desacelerados por la colisión [10]. Un sincrotrón es un acelerador de partículas en forma de anillo donde los electrones son acelerados radialmente, dentro de un campo magnético [11]. Estas instalaciones permiten generar rayos X altamente energéticos y colimados para la generación de datos muy detallados de muestras de diferentes disciplinas. Algunas de las numerosas ventajas de utilizar radiación sincrotrónica son la rapidez en la colecta de datos al procesar más cristales por unidad de tiempo, la posibilidad de utilizar cristales más pequeños que con fuentes convencionales de rayos X, y permitir realizar mediciones en múltiples longitudes de onda en momentos diferentes según la necesidad [12].

Gracias a la cooperación internacional con el Instituto de Investigación Biomédica-Sant Pau (IIB-Sant Pau), se ha logrado el acceso al sincrotrón ALBA en Barcelona, España. El acceso a este sincrotrón ha permitido colectar datos cristalográficos de cerca de 150 cristales, de diferentes complejos proteicos, así como proteínas obtenidas de venenos de serpientes. Esto ha permitido obtener cerca de veinte conjuntos de datos cristalográficos de mediana calidad.

Posteriormente, a partir de datos cristalográficos de alta calidad se ha logrado resolver la estructura de una fosfolipasa de veneno de la serpiente *Botriechis schlegelii* (bocaracá tica) a alta resolución ( $\sim 2.5 \text{ \AA}$ ) no reportada previamente (figura 3). Dichos datos se encuentran en proceso de publicación en conjunto con el Instituto Clodomiro Picado. Estos ensayos cristalográficos ponen a la vanguardia a Costa Rica como el primer país en Centroamérica en implementar la cristalografía de proteínas, siguiendo los esfuerzos de países Latinoamericanos con mayores recursos económicos y acercándonos al avance científico y tecnológico de países de primer mundo.



**Figura 3.** Cristalografía de rayos X de macromoléculas proteicas. A. Cristales obtenidos a partir de la fosfolipasa  $A_2$  purificada del veneno de la serpiente *Botriechis schelegelli*. B. Imagen de un espectro de difracción de rayos X obtenido a partir de uno de los cristales de la fosfolipasa  $A_2$ . C. Representación gráfica de la estructura 3D obtenida de la fosfolipasa  $A_2$  a una resolución  $\sim 2.5 \text{ \AA}$ . Se resalta en *sticks* verdes los residuos que participan en la coordinación del ión calcio, característico de las fosfolipasas tipo  $A_2$  catalíticamente activas, así como el ión calcio representado con una esfera amarilla.

## Conclusiones

Por medio del grupo de Biología Estructural de Proteínas en el CIB y del apoyo del Instituto Tecnológico de Costa Rica para el desarrollo de proyectos de investigación, se han logrado implementar -por primera vez en Costa Rica- técnicas biofísicas utilizadas a nivel mundial para el estudio de los mecanismos moleculares de proteínas de interés. Estos proyectos han permitido albergar el entrenamiento de dieciocho estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, favoreciendo sus habilidades en el laboratorio y aprendizaje en el área de la Biología Estructural de Proteínas, permitiendo vincular la docencia con la investigación

como respuesta al esfuerzo de financiamiento de investigación y asegurando la transferencia del conocimiento a los estudiantes, a la industria, y a la sociedad. Por último, se espera próximamente reportar la primera estructura cristalina resuelta en Costa Rica, de una fosfolipasa del veneno de la serpiente bocaracá tica (*Botriechis schlegelii*) no reportada anteriormente. Este logro, colocará al TEC y a Costa Rica a la vanguardia en el área de la Biología Estructural en la región.

## Referencias

- [1] M. Kainosho *et al.*, "Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations," *Nature*, vol. 440, pp. 52-57, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04525>
- [2] G. Rule and T. Hitchens, "Fundamentals of protein NMR spectroscopy" Springer, Netherlands, pp. 542, 2006.
- [3] N. Jacobsen, "NMR Spectroscopy explained: Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology," Wiley, New Jersey, USA, pp. 685, 2007.
- [4] W. Bragg, "British achievements in X-ray crystallography," *Science*, vol. 131, pp. 1870-1874, 1960, DOI: <https://doi.org/10.1126/science.131.3417.1870>
- [5] M.S. Smyth and J.H.J. Martin, "X ray crystallography," *Mol Pathol*, vol. 58, pp. 8-14, 2000, DOI: <http://doi.org/10.1136/mp.53.1.8>
- [6] J.M. Gutiérrez, "Envenenamiento por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional," *Bol. Malariol. y Sal. Amb.*, vol. 52, no. 1, pp. 1-16, 2011.
- [7] J.J. Calvete, "Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming," *Expert Rev Proteomic*, vol. 8, no. 6, pp. 739-58, 2011, DOI: <https://doi.org/10.1586/epr.11.61>
- [8] N.E. Chayen and E. Saridakis, "Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal," *Nature Methods*, vol. 5, pp. 147-153, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>
- [9] M.W. Parker, "Protein structure from X-ray diffraction," *J Biol Phys*, vol. 29, no. 4, pp. 341-362, 2003, DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1027310719146>.
- [10] H.L. Monaco and G. Artioli, "Experimental methods in X-ray and neutron crystallography," in "Fundamentals of Crystallography (Third edition)," Oxford University Pres. Inc., Nueva York, Estados Unidos, pp. 301-406, 2011.
- [11] H. Gavaghan, "What is a synchrotron?," *Nature*, vol. 410, no. 6829, pp. 722, 2001, DOI: <https://doi.org/10.1038/35070715>.
- [12] W. Minor *et al.*, "Strategies for macromolecular synchrotron crystallography," *Structure*, vol. 8, no. 5, pp. 105-110, 2000, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00139-8)

# Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina

## Cell Culture and Tissue Engineering: Biomedical Applications

Johan Morales-Sánchez<sup>1</sup>, Andrea Ulloa-Fernández<sup>2</sup>, Silvia Castro-Piedra<sup>3</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>4</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>5</sup>

Morales-Sánchez, J; Ulloa-Fernández, A; Castro-Piedra, S; Centeno-Cerdas, C; Calvo-Castro, L. Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 56-65.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jmorales@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-2383-5516>
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: aulloa@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-3071-9564>
- 3 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: scastro@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-0689-8336>
- 4 Ingeniera en Biotecnología. ccenteno@tec.ac.cr. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ancalvo@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>



## Palabras clave

Medicina regenerativa; piel; músculo; células madre mesenquimales de tejido adiposo; cáncer; fitoquímicos.

## Resumen

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) nació en el 2005 con el objetivo de desarrollar terapias celulares para aplicaciones en medicina regenerativa. Actualmente, el LAINTEC aloja más de una decena de proyectos multidisciplinarios, realizados en colaboración con otros centros de investigación y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas investigaciones se enfocan en el desarrollo y evaluación de implantes, biomateriales y terapias regenerativas de piel, músculo y hueso, incluyendo el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo. Además, se han establecido modelos celulares y tisulares para la evaluación del potencial bioactivo de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

## Keywords

Regenerative medicine; skin; muscle; mesenchymal adipose stem cells; cancer; phytochemicals.

## Abstract

The Tissue Engineering Laboratory (LAINTEC) at the Biotechnology Research Center (CIB) of the Biology School at Costa Rica Institute of Technology (TEC) began in 2005, aiming towards the development of cell-based therapies for applications in regenerative medicine. Currently, LAINTEC accommodates more than a dozen multidisciplinary research projects, carried out in collaboration with other research centers as well as with other national and international universities. These investigations focus on the development and evaluation of implants, biomaterials and regenerative therapies of skin, muscle and bone tissues, including the isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue. In addition, cellular and tissue models are used for the evaluation of the bioactive potential of natural and synthetic agents with potential applications in biomedicine.

## Introducción

El *cultivo celular* es la técnica mediante la cual una muestra de algún tejido es procesada para extraer las células que lo componen y se colocan en un medio de alimentación bajo las condiciones ambientales adecuadas que les permiten sobrevivir e incluso dividirse. Además de dividirse (usualmente por mitosis), las células cultivadas pueden especializarse en otros tipos celulares con funciones específicas (proceso conocido como diferenciación), con lo cual son capaces de desempeñar funciones análogas a las que tendrían en distintos tejidos u órganos del cuerpo [1].

El cultivo y propagación de células animales son fundamentales para diversos ensayos en la investigación biomédica y preclínica. El rápido crecimiento en áreas como la terapia génica, la genómica y la proteómica ha dado lugar a un aumento notable en las actividades de cultivo celular [2]. Las técnicas de cultivo celular pueden ser utilizadas para estudiar el impacto biológico de sustancias químicas en condiciones controladas de laboratorio y así determinar

efectos tales como citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis en tipos específicos de células. Además, los cultivos celulares se pueden usar como hospederos de virus y bacterias para estudiar su mecanismo de infección o bien, para buscar posibles agentes antivirales o antibacterianos. Los cultivos celulares también pueden ser utilizados como modelos para el estudio de diversas enfermedades y su desarrollo, y son base para la elaboración de vacunas, desarrollo de medicamentos, terapias celulares y otros [2]. De interés para este artículo, destaca la *Ingeniería de Tejidos*, un área directamente relacionada al desarrollo que se ha dado en medicina y biología durante las últimas décadas [3].

El término “ingeniería de tejidos”, fue creado para representar un campo de la ciencia enfocado en la regeneración de tejidos, utilizando células en conjunto con biomateriales, andamios y factores de crecimiento [4]. Hasta mediados de la década de 1980, ese término fue utilizado de manera regular para describir únicamente el uso de dispositivos prostéticos y biomateriales; a partir de 1987 se utiliza la definición actual, refiriéndose de manera más clara, a la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y de ciencias de la vida, hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en mamíferos, y al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren esa función [3]. Por el tipo de aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos, esta disciplina a su vez está enlazada con la cirugía reconstructiva, trasplantes, microcirugía, biología celular, bioquímica, genética, entre otros [3].

### Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) inició en el 2005 con el proyecto “Implementación de un sistema de producción de piel humana *in vitro* para mejorar la recuperación de pacientes con afecciones epidérmicas en Costa Rica”, el cual fue financiado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y el TEC, e implementado por el Dr. Miguel Rojas Chaves, la M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes y la M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo. Esta iniciativa permitió construir y equipar un espacio de laboratorio especializado para el cultivo celular en el CIB, el cual fue inaugurado en el 2006 y donde se iniciaron los primeros cultivos de células humanas con el objetivo de desarrollar terapias celulares para afecciones de la piel. Otros seis proyectos, desarrollados de forma consecutiva entre el 2006 y el 2014, permitieron establecer, optimizar y evaluar, mediante marcadores moleculares y en modelos animales, el cultivo de piel humana con fines regenerativos [5]–[7].

De forma complementaria, se realizaron dos proyectos (2007-2011) en conjunto con la Universidad Nacional (UNA), donde se evaluó el uso de membranas de biomateriales (elaboradas a partir de desechos de quitosano de camarón y colágeno de tilapia) como andamio para el cultivo de células de piel y con miras a desarrollar apósitos biológicos con potencial regenerativo [8]. Además, se ejecutaron dos proyectos (2009-2014) para el establecimiento de procedimientos e instalaciones de irradiación con miras a la creación de Bancos de Tejidos en la región, también con apoyo del OIEA y como parte de un programa de colaboración latinoamericano [9].

El desarrollo de estos proyectos impulsó la consolidación del área de investigación “Área de Biomedicina” en el CIB, la cual se transformó en el área de “Aplicaciones Biomédicas” (2014), enmarcada dentro del eje de conocimiento estratégico “Salud” del TEC y una de las tres áreas formales de investigación del CIB (junto con Biotecnología Vegetal y Biotecnología Ambiental).

A partir del 2012, las áreas de investigación en el LAINTEC se han diversificado considerablemente, incluyendo proyectos multidisciplinarios con otros centros de investigación del TEC y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas iniciativas se han enfocado en proyectos de ingeniería de tejidos, con miras al desarrollo de implantes, biomateriales y terapias regenerativas

de piel, músculo y hueso en humanos, además de continuar con estudios en regeneración de heridas, incorporando el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo y la evaluación de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

En el LAINTEC también se cuenta con un pequeño banco de líneas celulares de distintos tipos de cáncer y algunas líneas de tejidos normales, y se han establecido modelos de cultivos tisulares tridimensionales de piel humana, los cuales se utilizan como modelos de estudio para realizar ensayos de citotoxicidad y de determinación de la actividad biológica (basado en marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular) de sustancias de origen natural. En estos modelos se ha evaluado –mayoritariamente– el potencial anticancerígeno de diversos extractos de plantas, incluyendo plantas medicinales (moringa, tempate, chilillo) y especies frutales (mora, mango, manzana, guayaba) [10]–[17]. En el caso de los modelos tisulares, al tratarse de reconstrucciones 3D, los constructos de piel recrean de forma más cercana el tejido *in vivo*, por lo que permiten generar información pre-clínica de alta calidad y de mayor potencial predictivo.

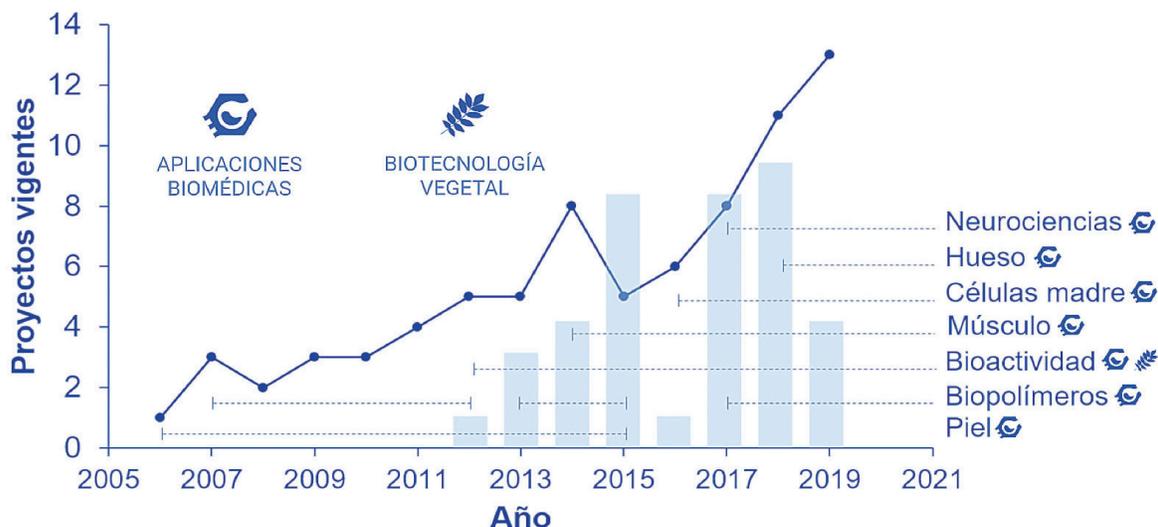
A la fecha, estos proyectos han permitido capacitar a más de diez investigadores, quienes han recibido entrenamiento con expertos en centros médicos y de investigación especializados en Argentina, Uruguay, España, Estados Unidos, Inglaterra y Alemania. Gracias a esto, el equipo de trabajo ha crecido para incorporar a la Dra. Laura A. Calvo Castro (Ingeniería de Tejidos y Biología Celular y Molecular, 2008), M.Sc. Carolina Centeno Cerdas (Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, 2009), M.Sc. Montserrat Jarquín Cordero (Mejoramiento genético y Biotecnología, 2012), Ing. María Inés Chaves Rodríguez (Biotecnología, 2013-2018), M.Sc. Andrea Ulloa Fernández (Ingeniería de Tejidos, 2014), Ing. Johan Morales Sánchez (Ingeniería de Tejidos, 2014), M.Sc. Silvia Castro Piedra (Ingeniería de Tejidos, 2014), y María Clara Soto Bernardini (Neurociencias, 2017). El LAINTEC también ha alojado numerosos trabajos de graduación de estudiantes de la carrera de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología (TEC), varios proyectos y pasantías de estudiantes nacionales e internacionales, así como tesis de maestría.

En la actualidad, el LAINTEC cuenta con tres laboratorios especializados: un laboratorio dedicado para la docencia –debido al incremento en la demanda de personal científico calificado con experiencia en el manejo de cultivo de células humanas y animales *in vitro*–, y dos laboratorios utilizados para actividades de investigación, en donde se desarrollan 12 proyectos (figura 1) relacionados con ingeniería de tejidos y bioactividad, en los que se utilizan cultivos celulares de piel, células madre mesenquimales, músculo, hueso, y líneas celulares de distintos tipos de cáncer, y experimentos con biomateriales como insumos primarios.

### **Cultivo de piel *in vitro***

Las experiencias de cultivo de piel humana *in vitro* y de ingeniería de tejidos de piel realizadas en el LAINTEC, así como recomendaciones para la crioconservación de piel cadavérica, fueron reportadas previamente en esta misma revista [5]–[9]. Estas prácticas permitieron establecer las condiciones y técnicas generales para el cultivo primario de células de piel de origen humano y animal, escalando hacia la reconstrucción de modelos tridimensionales de este tejido. Actualmente, en el LAINTEC se estudia el potencial quimioterapéutico de diversos agentes bioactivos en modelos de piel *in vitro*.

Por otro lado, mediante colaboraciones internacionales (Universidad Técnica de Múnich, y Universidad Ludwig Maximilliam, Alemania), se han estudiado métodos alternativos para la regeneración de la piel, garantizando su apropiada oxigenación y promoviendo su vascularización mediante el uso de microalgas genéticamente modificadas para la liberación de oxígeno y factores de crecimiento humano como VEGF, PDGF y SDF-1 alfa [18], [19].



**Figura 1.** Cantidad de proyectos por año (línea continua) realizados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) desde su creación (2006) a la actualidad (2019). La línea punteada indica el área de investigación de los proyectos vigentes por período. Las columnas indican la cantidad de publicaciones científicas por año. El área de neurociencias se describe en otro artículo de esta misma edición.

## Células madre mesenquimales

Otra de las líneas de investigación del LAINTEC está relacionada al uso de células madre. En las últimas dos décadas, el tejido adiposo ha pasado de ser considerado un tejido de reserva energética, a uno mucho más dinámico con numerosas cualidades, entre las que destaca el ser materia prima para determinadas terapias celulares [1].

Cuando el tejido adiposo es disgregado en el laboratorio, libera una mezcla de células que se conocen como la Fracción Estromal Vascular (FEV) [2]. Este coctel de células incluye células madre mesenquimales (CMM), células precursoras endoteliales, células endoteliales, macrófagos, células de músculo liso, linfocitos, pericitos y preadipocitos. Bajo las condiciones adecuadas, las CMM son capaces de adherirse y proliferar en condiciones de cultivo celular [20].

Tanto la FEV como las CMM han mostrado tener gran potencial en la regeneración de heridas cutáneas, por lo que están siendo estudiados a nivel internacional con el fin de obtener todas las evidencias científicas necesarias para demostrar su inocuidad y eficacia [21]. Costa Rica no es la excepción, ya que desde el 2015 en el TEC, se ha venido estableciendo el aislamiento y caracterización molecular de estas células, con miras a ofrecer opciones terapéuticas alternativas a quienes sufran de heridas agudas o crónicas en la piel y otras patologías.

A la fecha, se ha logrado exitosamente establecer los protocolos que permiten obtener tanto la FVE como las CMM y se ha demostrado su potencial de diferenciación en varios tipos celulares. Por otro lado, se han realizado pruebas en animales con el fin de observar su efecto regenerativo *in vivo*. El próximo paso consiste en realizar pruebas en seres humanos, para lo cual el TEC busca alianzas estratégicas con el sector salud, que permitan desarrollar de forma responsable y ética cada una de las fases de investigación correspondientes, de manera que se pueda transferir estas estrategias como una terapia para atender diversas afecciones de la piel.

## Músculo Esquelético

El músculo esquelético estriado es el tejido más abundante del cuerpo y presenta el potencial de ser regenerado tras una herida o enfermedad [22]. Sin embargo, la pérdida masiva de tejido muscular, así como el padecimiento de diferentes distrofias, hace que esta regeneración se vea comprometida, pues se requiere de técnicas especializadas para su reconstrucción, muchas de ellas basadas en terapia celular e ingeniería de tejidos [23]. No obstante, los tratamientos actuales basados en trasplante autólogo de músculo esquelético o la inyección de células en suspensión o vía intravenosa han sido poco exitosos [24].

Las células encargadas de la regeneración muscular reciben el nombre de células satélite. A partir del año 2014, se inició la investigación en el CIB para establecer el aislamiento de este tipo de células, a través de técnicas de cultivo celular. El objetivo que se busca es la creación de modelos tridimensionales *in vitro* de las distrofias musculares más comunes en el país, así como mejorar la calidad de vida de pacientes con grandes pérdidas de tejido muscular a través de terapia celular. La recreación *in vitro* de tejido muscular requiere de un esfuerzo multidisciplinario y la utilización de biomateriales que simulen la arquitectura del tejido, además de la generación de estímulos mecánicos y eléctricos, lo cual es fundamental para lograr el desarrollo de fibras musculares funcionales [24].

De esta manera, se ha trabajado en conjunto con el Centro de Investigación y Extensión de Ingeniería de los Materiales (CIEMTEC) y las escuelas de Física y Química del TEC, así como con otros centros de investigación nacionales como el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Estas colaboraciones se han enfocado en diferentes factores que contribuirán a reproducir en el laboratorio las condiciones bajo las cuales este tejido se regenera *in vivo*. Dentro del trabajo actualmente en desarrollo, se incluye un biorreactor que realiza estímulos mecánicos a cultivos celulares inoculados sobre matrices de policaprolactona (PCL) y un sistema de generación de impulsos eléctricos; ambos permitirían incrementar la diferenciación muscular sobre andamios tridimensionales.

Estos proyectos se desarrollan con miras a generar constructos de músculo esquelético tridimensionales que permitan el estudio del mecanismo de acción y reparación del tejido muscular ante la exposición a toxinas que destruyen el músculo esquelético, así como para modelar las distrofias musculares más comunes en Costa Rica, y su uso como modelo de estudio para generar terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes con distintas afecciones del tejido músculo esquelético.

## Hueso

El tejido óseo comprende cerca del 15% del peso corporal y es el responsable de brindarle estructura al cuerpo y proteger los órganos internos, además de almacenar nutrientes y producir otros tejidos como la sangre [25]. Al igual que el resto del cuerpo, este tejido puede sufrir lesiones, fracturas, enfermedades que dificulten la movilidad e incluso conlleven a la pérdida de un segmento óseo. Tradicionalmente, cuando algún segmento es severamente dañado, este se reemplaza por algún material que simule la estructura perdida, pero no los componentes biológicos. En la actualidad, se tiende a la utilización de materiales más bioactivos y reabsorbibles que puedan ser recolonizados por las células que componen el tejido óseo y reestablecer la funcionalidad completa de la zona dañada [25], [26].

En conjunto con instituciones del campo de la Salud como el Hospital del Trauma del Instituto Nacional de Seguros, el Laboratorio de Entrenamiento e Investigación en Cirugía Mínimamente Invasiva (LEICIMI), la Universidad Técnica de Múnich y la Escuela de Física, el TEC está desarrollando el área de investigación en tejido óseo. A la fecha, se trabaja en la validación

preclínica de las condiciones de irradiación y esterilización de tejido óseo para su uso en banco de tejidos, así como en el desarrollo de andamios hechos a partir de biomateriales reabsorbibles, que permitan simular la biología celular del tejido óseo bajo condiciones *in vitro*.

El desarrollo de la ingeniería de tejidos de hueso conlleva un proceso altamente dinámico y complejo que implica el reclutamiento, proliferación, migración y diferenciación de células osteoprogenitoras, las cuales, además de estar embebidas en un material poroso, este debe tener las propiedades mecánicas adecuadas que permitan un comportamiento lo más similar al hueso real [27]. Debido a lo anterior, junto con el CIEMTEC, se están desarrollando diferentes mezclas de biomateriales y recubrimientos para la creación de estructuras porosas por medio de impresión 3D, que permitan simular la estructura tridimensional de tejido óseo.

Una de las premisas para el correcto desarrollo de andamios biocompatibles para la regeneración ósea, como se menciona anteriormente, es que el material debe poseer propiedades mecánicas altamente equivalentes al hueso nativo [27]. Con este fin, en el mismo biorreactor mencionado en la sección anterior, se pretende inocular células osteogénicas embebidas en andamios que simulen la estructura porosa del hueso, a fin de estudiar las propiedades mecánicas del material bajo condiciones similares a lo que ocurre *in vivo*, además de estudiar el comportamiento celular ante diferentes estímulos mecánicos y cómo estos inciden sobre la diferenciación celular.

## Biocompatibilidad con otros materiales

Se denomina biomateriales a aquellas sustancias que han sido diseñadas como estructura de soporte o como intermediarios para mediar la interacción con componentes de sistemas vivos en procedimientos terapéuticos o de diagnóstico [28]. Los andamios generados con biomateriales deben de cumplir una serie de propiedades mecánicas, tales como biodegradabilidad controlada y la habilidad de imitar las estructuras biológicas y la función de la matriz extracelular [29].

En ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, los andamios juegan un papel crítico, por lo que son diseñados para ser biocompatibles con cierto grado de porosidad y una superficie que permita la adhesión, migración, proliferación, diferenciación e infiltración de las células [29]. Mediante diferentes técnicas biomecánicas, de microscopía, de cultivo celular y biología molecular, todas estas características son analizadas en los diferentes biomateriales que se estudian en el laboratorio.

En el pasado, se realizaron en el CIB pruebas con quitosano (obtenido a partir de exoesqueleto de camarón) y colágeno (obtenido de piel de tilapia), para generar un apósito con miras a su aplicación clínica en afecciones de la piel, por lo que fue necesario asegurarse de que tuviera las características necesarias para que células epiteliales pudieran interactuar con él [8]. De la misma manera, se ha trabajado además una serie de materiales de origen biológico que funcionan como soporte para el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos (células de la piel) o bien CMM, todos ellos con miras a la aplicación clínica.

Actualmente, tanto en los estudios que se realizan a nivel de tejido óseo como en los estudios que utilizan células musculares, LAINTEC realiza ensayos de biocompatibilidad para verificar la interacción que se da entre los materiales y el componente biológico. Otro de los biomateriales que se encuentra en estudio es una aleación metálica nanoestructurada con recubrimientos biofuncionales, producida por CIEMTEC, y con la cual se busca generar dispositivos médicos o parte de ellos.

## Modelos celulares y tisulares para análisis de actividad biológica

Los cultivos de piel humana *in vitro*, tanto a nivel de monocapa como en constructos tridimensionales de piel completa (dermis-epidermis), han resultado útiles como modelo en pequeña escala para el estudio del efecto de sustancias naturales y de materiales con características bioactivas, con miras al desarrollo de alimentos funcionales, nutraceuticos y fitofármacos. Los análisis realizados incluyen: determinación de efecto antioxidante (método de DPPH), concentración de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu), citotoxicidad en líneas celulares de distintos tipos de cáncer en humanos (cuantificación de viabilidad celular por medio del reactivo MTT y de células totales por tinción de DAPI), evaluación del potencial regenerativo (ensayo de migración celular), y análisis de marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular (mediante Western Blot, inmunocitoquímica, e inmunofluorescencia). Esto permite proporcionar herramientas clave para facilitar la medicina personalizada, al tiempo que ahorra dinero y reduce la cantidad de animales utilizados para la investigación. A la fecha, estos estudios han permitido confirmar el potencial biomédico de sustancias bioactivas presentes en extractos de diversas plantas en Costa Rica, tales como la mora [10], manzana, anona y ciruelo [13]–[15], [30], guayaba [11] y varias plantas medicinales (*Phyllanthus*, *Senna reticulata*, *Pettiveria alliaceae*, *Moringa*) [12], [16], [17], [31], [32].

## Conclusión

La investigación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa ofrece soluciones novedosas en el área de Biomedicina, tanto para la generación de evidencia preclínica, así como para la creación de nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas. Con una trayectoria de más de 10 años, los proyectos desarrollados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del CIB en el TEC han contribuido a la capacitación de recurso humano en técnicas de cultivo y expansión de células humanas y reconstrucción de tejidos humanos *in vitro*, con miras a aplicaciones prácticas en el área de la salud. La perspectiva a futuro que se ha planteado el LAINTEC es contribuir además al establecimiento y desarrollo en el país de la medicina traduccional, un concepto reciente que busca el traslado de los avances alcanzados en el laboratorio a la práctica clínica diaria, con el beneficio directo para los pacientes y la sociedad en general.

## Referencias

- [1] D. E. Lynn, "Cell culture" in *Encyclopedia of Insects*, Segunda ed. Burlington: Academic Press, 2009.
- [2] C. Helgason and C. Miller, Eds., *Basic Cell Culture Protocols*. Totowa: Humana Press, 2013.
- [3] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H. P. Wiesmann, Eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [4] F. Akter, *What is tissue engineering? in Tissue Engineering Made Easy*. Cambridge, UK: Academic Press Inc. (London) Limited, 2016.
- [5] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, C. Centeno-Cerdas, M. I. Chaves-Rodríguez, N. Chaves-Solano, and M. Rojas-Chaves, "Cultivo in vitro de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 33–45, 2015.
- [6] M. I. Chaves-Rodríguez, L. A. Calvo-Castro, R. Alvarado-Meza, O. Madrigal-Monge, A. Ulloa-Fernández, and C. Centeno-Cerdas, "Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 46–57, 2015.
- [7] A. Ramírez-Téllez, C. Centeno-Cerdas, M. Conejo-Solís, and L. A. Calvo-Castro, "Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 15–26, 2015.

- [8] S. E. Castro-Piedra *et al.*, "Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas : evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 58–68, 2015.
- [9] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, A. Ulloa-Fernández, R. Portuguese-Barboza, C. Centeno-Cerdas, and M. Rojas-Chaves, "Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 62–82, 2015.
- [10] L. Calvo-Castro *et al.*, "Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model," *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1199–1207, Sep. 2013.
- [11] K. Sánchez-zúñiga, S. Castro-piedra, I. Moreira-, E. Arnáez-serrano, and M. Navarro-hoyos, "Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba ( *Psidium* Cytotoxic evaluation of properties in guava fruit," 2017.
- [12] I. Moreira-González *et al.*, "Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, pp. 69–77, 2014.
- [13] M. Navarro *et al.*, "Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica," *Foods*, vol. 7, p. 15, 2018.
- [14] M. Mirtha Navarro *et al.*, "Estudio preliminar del potencial bioactivo de la *Annona cherimola* (anona) y *Prunus domestica* (ciruelo) cultivadas en Costa Rica," *Rev. en Marcha*, vol. 27, no. 2, pp. 37–44, 2014.
- [15] M. Navarro *et al.*, "Chemical Profiling of Polyphenolic Compounds in the Fruit Skin of *Prunus Domestica* Plums from Costa Rica," *J. Res. Anal.*, vol. 3, pp. 42–51, 2017.
- [16] M. Navarro *et al.*, "Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd.," *Plants*, vol. 6, p. 50, 2017.
- [17] M. Navarro *et al.*, "Flavonoids and Ellagitannins Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Phyllanthus acuminatus* Vahl.," *Plants (Basel, Switzerland)*, vol. 6, p. 62, 2017.
- [18] T. Ludwig *et al.*, "Biomaterials Towards autotrophic tissue engineering : Photosynthetic gene therapy for regeneration Tom a," vol. 75, pp. 25–36, 2016.
- [19] C. Centeno-cerdas *et al.*, "Acta Biomaterialia Development of photosynthetic sutures for the local delivery of oxygen and recombinant growth factors in wounds," *Acta Biomater.*, vol. 81, pp. 184–194, 2018.
- [20] C. Tremolada, V. Colombo, and C. Ventura, "Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells : State of the Art and Lipogems ® Technology Development," *Curr. Stem Cell Reports*, vol. 2, pp. 304–312, 2016.
- [21] P. Bora and A. S. Majumdar, "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine : a brief review on biology and translation," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, p. 145, 2017.
- [22] F. S. Tedesco, A. Dellavalle, J. Diaz-manera, G. Messina, and G. Cossu, "Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 1, pp. 11–19, 2010.
- [23] M. Juhas *et al.*, "Incorporation of macrophages into engineered skeletal muscle enables enhanced muscle regeneration," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 942–954, 2018.
- [24] B. J. Kwee and D. J. Mooney, "Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 47, pp. 16–22, 2017.
- [25] T. T. Madanagopal, S. V. Agarwalla, and V. Rosa, *Carbon nanocomposites for implant dentistry and bone tissue engineering*. Elsevier Inc., 2019.
- [26] P. Wolff *et al.*, "Oxygen-distribution within 3-D collagen I hydrogels for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 95, pp. 422–427, 2019.
- [27] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [28] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009.
- [29] Y. H. Murugan Ramalingam, Ziyad Haidar, Seeram Ramakrishna, Hisatoshi Kobayashi, Ed., *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*. Scrivener Publishing LLC, 2012.
- [30] M. Navarro-Hoyos *et al.*, "Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, vol. 30, no. 1, pp. 3–13, 2017.

- [31] M. Sequeira-Obando, L. Ca, Ivo-Castro, I. Moreira-González, E. Arnáez-Serrano, and M. Navarro, "Cytotoxic effect of an ethanol extract of *Phyllanthus accuminatus* leaves on human epithelial cancer cells," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 22, 2014.
- [32] K. Sánchez-Zúñiga, L. Calvo-Castro, I. Moreira-González, M. Sequeira-Obando, E. Arnáez-Serrano, and M. Navarro, "Preliminary evaluation of the cytotoxic capacity of an ethanol extract from *Moringa oleifera* leaves," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 103, 2014.

# Biotecnología para el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas y la búsqueda de nuevos tratamientos: caso de las neuregulinas

## Biotechnology for the study of neuropsychiatric diseases and the search for new treatments: case of neuregulins

María Clara Soto-Bernardini<sup>1</sup>

---

Soto-Bernardini, MC. Biotecnología para el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas y la búsqueda de nuevos tratamientos: caso de las neuregulinas. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 66-76.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4629>

<sup>1</sup> Profesora/Investigadora. Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB). Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: masoto@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-2266-787X>



## Palabras clave

Neuregulinas; ErbB4; esquizofrenia; neurociencias.

## Resumen

Las neuregulinas (NRGs) son factores de crecimiento tipo epidérmicos (EGF), que actúan como ligandos para receptores transmembrana tirosin quinasa de la familia ErbB. La señalización de NRG1 y su principal receptor en el cerebro, ErbB4, participa en procesos del desarrollo embrionario, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. Existe evidencia de que distintas isoformas de NRG1 desempeñan funciones específicas, pero la medida de como estas participan en los procesos mencionados no está clara. *Nrg1* se ha asociado a la esquizofrenia (EZ) en distintas poblaciones. Además, se ha reportado un incremento en la expresión de este gen en cerebros *post mortem* de pacientes con EZ, así como hiperfosforilación de ErbB4. Esto sugiere que la hiperestimulación de NRG1/ErbB4 puede representar un componente de la etiología de la EZ. Los mecanismos patológicos asociados aún no se conocen.

En el Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB), se está desarrollando una línea de investigación que se enmarca dentro del área de ciencias biomédicas, específicamente las neurociencias. Estos estudios cuentan con colaboradores en el Instituto Max Planck para Medicina Experimental (Göttingen) y cuentan con líneas únicas de ratones sobreexpresores de NRGs. Estas valiosas herramientas nos permitirán realizar estudios *in vivo* sobre las consecuencias de hiperestimular NRG1/ErbB4 en circuitos corticales, relevante para las enfermedades neuropsiquiátricas. Se espera que la nueva línea de investigación contribuya a establecer/fortalecer redes de colaboración científica inter-institucional e internacional y al mismo tiempo, incremente la cantidad y la calidad del Capital Humano en la investigación de neurociencias en Costa Rica.

## Keywords

Neuregulins; ErbB4; schizophrenia; neuroscience.

## Abstract

Neuregulins (NRGs) are epidermal growth factor (EGF)-like and differentiation factors, which serve as ligands for transmembrane receptor tyrosine kinases of the ErbB family. NRG1/ErbB4 signaling in the brain, has been involved in processes of embryonic development, neurotransmission and synaptic plasticity. Evidence suggests that different isoforms of NRG1 perform specific functions, but the extent to which they participate in the mentioned processes is not clear. *Nrg1* has been associated with schizophrenia (SC) in different populations. Furthermore, an increased expression of this gene in post-mortem brains of SC patients and hyperphosphorylation of ErbB4 has been reported. Thus, hyperstimulation of NRG1/ErbB4 signaling may represent a component of the etiology of SC. The associated pathological mechanisms are not yet known.

A research line is being developed at the Center for Research in Biotechnology (CIB) which is part of the biomedical sciences, specifically neuroscience. These studies have collaborators at the Max Planck Institute for Experimental Medicine (Göttingen) and have available unique mouse lines for overexpression of NRGs. These invaluable tools will allow us to carry out *in vivo* studies on the consequences of hyperstimulation of NRG1/ErbB4 in cortical circuits, relevant in the context of neuropsychiatric diseases. Besides, these investigations will be an

important contribution for the development of neuroscience in Costa Rica. It is also expected that the new line of research will establish/strengthen inter-institutional and international scientific collaboration networks and will significantly increase the quantity and quality of Human Capital in neuroscience research in Costa Rica.

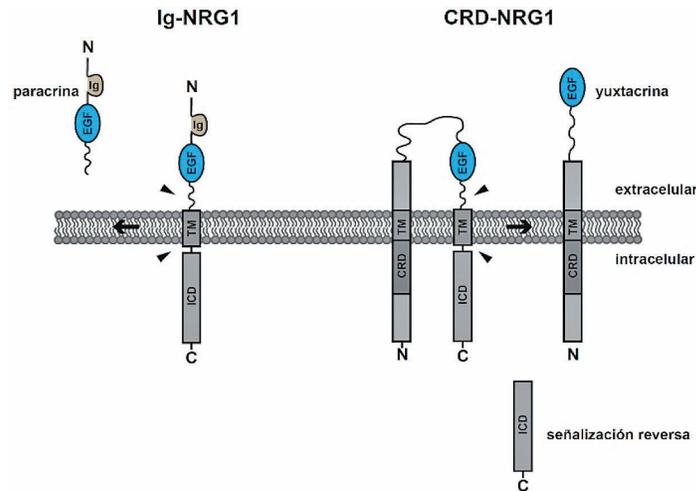
## Neuregulina 1 (NRG1)

Las NRGs son una familia de factores de crecimiento y diferenciación codificados por cuatro genes (*Nrg1-4*). NRG1, corresponde a la NRG más representativa y mejor estudiada. Mediante procesos de corte y empalme alternativo y el uso diferencial de promotores, el gen *Nrg1*, puede dar origen a más de 30 isoformas que pueden agruparse en 6 tipos de proteínas. Las NRG1 tipo I-VI difieren en sus dominios N-terminal, sin embargo todas estas proteínas contienen un dominio tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico), el cual es necesario y suficiente para activar receptores tirosina quinasa de la familia ErbB. Además, las NRG1 tipo I, II, IV y V poseen un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) hacia el extremo N-terminal, razón por la cual son referidas como Ig-NRG. Por otro lado, la NRG1 tipo III contiene un dominio rico en cisteínas (CRD) que funciona como un segundo dominio transmembrana y son referidas como CRD-NRGs [1]–[3] NRG2, NRG3, and NRG4.

La mayoría de las isoformas de NRG1 son sintetizadas como precursores transmembrana, que posteriormente sufren una escisión proteolítica. Como consecuencia de ese procesamiento, las isoformas Ig-NRG1 tienen un fragmento N-terminal difusible, que incluye los dominios EGF y tipo Ig. Por lo tanto, estas isoformas actúan mayoritariamente por señalización paracrina (figura 1), uniéndose a receptores ErbB en células vecinas. La CRD-NRG1 es una excepción debido a que después del procesamiento proteolítico, esta permanece unida a la membrana mediante el dominio CRD y actúa mediante señalización yuxtacrina (figura 1) [1].

Las formas más abundantes de NRG1 en cerebro humano y de rata son la tipo III y la tipo II, seguidas por las tipo I y tipo V. Por otro lado, las diferentes isoformas de NRG1, exhiben perfiles de expresión dinámicos, con mayor expresión en etapas tempranas del desarrollo embrionario (alrededor E13) y pocos días después del nacimiento, hacia el día posnatal (P)5. Además, estas isoformas se expresan en neuronas de proyección tanto en la corteza como en el hipocampo de humanos y ratas. También se han encontrado en interneuronas GABAérgicas y astrocitos [4], [5]. Esto sugiere que ejercen funciones importantes en el neurodesarrollo.

La complejidad y diversidad de la biología de NRG1 se ha evidenciado también mediante estudios que demuestran funciones específicas para distintas isoformas. Por ejemplo, migración de interneuronas en la corteza en desarrollo [6]–[8]. Adicionalmente, la complejidad de la señalización de NRG1 se ve incrementada por modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones [9] y procesamiento por proteasas como TACE/ADAM17 (tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme [10], [11]), BACE ([12], [13]) y ADAM19 (-meltrin beta, [14]). Además, la expresión y el procesamiento de las isoformas de NRG1 parecen estar distintamente regulados temporal y espacialmente por la actividad neuronal [1], [5].



**Figura 1.** NRG1: corte y empalme alternativo, estructura de proteínas y procesamiento proteolítico. Estructura de Ig-NGR1 y CRD-NGR1. Las isoformas de NRG1 se sintetizan como pre-proteínas transmembrana (pro-NGR1s). En CRD-NGR1, los dominios N y C-terminal están localizados en el citoplasma. La escisión proteolítica genera Ig-NGR1 solubles maduros que actúan mediante señalización paracrina; en el caso de CRD-NGR1, el dominio de tipo EGF permanece unido a la membrana después del procesamiento, funciona principalmente por señalización yuxtacrina. También puede producirse señalización reversa a través del ICD (dominio intracelular). Las flechas indican sitios de procesamiento proteolítico.

Por otro lado, NRG1 también podría actuar como un “receptor” de ErbB, posterior al procesamiento proteolítico por la  $\gamma$ -secretasa del dominio intracelular (ICD). Después del procesamiento y su traslocación al núcleo, el ICD podría actuar como un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la sobrevivencia neuronal, así como en el mantenimiento y la maduración sináptica. Se ha sugerido que la señalización reversa, mediada por el ICD, regula el crecimiento y la ramificación de dendritas corticales [15], [16].

## Esquizofrenia, una enfermedad multifactorial

La esquizofrenia (EZ) es una enfermedad mental severa que se presenta en alrededor del 1% de la población mundial. Este trastorno está caracterizado por la presencia de síntomas positivos (alucinaciones y delirios), síntomas negativos (alogia, abulia) y déficit cognitivo. La enfermedad se manifiesta usualmente en los últimos años de la adolescencia o adultos jóvenes. Esta condición es sumamente incapacitante para los pacientes y resulta en altos costos financieros para las familias y los sistemas de salud. Se ha estimado que en Costa Rica los trastornos neuropsiquiátricos contribuyen al 26.3% de la carga por enfermedad del país [17], [18].

Algunas anomalías morfológicas son frecuentemente encontradas en pacientes con EZ. Entre ellas reducción en el volumen cerebral y agrandamiento de ventrículos [19], [20]. Además, se han encontrado alteraciones sinápticas, así como en la organización de axones y dendritas, por lo que esta enfermedad es considerada un trastorno sináptico. Además, en cerebros postmortem de pacientes con EZ se han observado cambios funcionales en circuitos tanto excitatorios como inhibitorios [21]–[23]. Aparentemente, el desbalance entre la actividad excitatoria e inhibitoria juega un papel importante en la fisiopatología de la EZ [24]. Asimismo, se ha reportado actividad aberrante en circuitos corticales y subcorticales, lo cual sugiere que existe una desconectividad entre esas regiones del cerebro [25].

Esta enfermedad es considerada multifactorial, en donde múltiples genes con efecto menor en combinación con factores ambientales, desencadenan el trastorno. Entre los factores ambientales que se cree que son relevantes para la EZ están las complicaciones obstétricas pre- y peri-natales como bajo peso al nacer, incompatibilidad Rh, hipoxia, deficiencias nutricionales de la madre en el primer trimestre del embarazo, exposición al virus de la influenza en el segundo trimestre, estrés en la madre. Adicionalmente, la residencia en zonas urbanas y el abuso de sustancias como anfetaminas, cocaína, alucinógenos y marihuana, son considerados factores de riesgo para la EZ [26], [27].

La contribución genética a la etiología de la EZ se ha puesto en evidencia mediante estudios con gemelos y se ha estimado una heredabilidad de alrededor del 85% [28]. Por otro lado, los resultados de estudios de ligamiento y asociación para EZ no han sido siempre consistentes. Esto parece deberse a la participación combinada de distintos factores ambientales, con loci de susceptibilidad con un riesgo asociado desconocido, heterogeneidad genética y gran cantidad y complejidad de síntomas que presentan los pacientes con EZ, así como el traslape de síntomas que existe entre la EZ y otras enfermedades neuropsiquiátricas [29], [30].

Estudios genómicos y meta-análisis han reportado resultados significativos para el cromosoma 8p. En esta región está localizado el gen que codifica para la NRG1 (*Nrg1*), el cual es uno de los genes candidatos para la EZ con mayor reproducibilidad. Distintas variantes de este gen han sido asociadas a la EZ en distintas poblaciones (aunque no todas). Entre ellas se incluye a la población del Valle Central de Costa Rica. Asimismo, estudios genómicos de asociación (GWAS) también han reportado resultados positivos para *Nrg1* y su receptor *ErbB4* con la EZ [31]–[35]. Por estas razones, ambos genes se encuentran en la lista de los genes candidatos del Schizophrenia Gene Resource (SZGR) en la Universidad de Vanderbilt (<http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/SZGR>). Sin embargo, al igual que para la mayoría de los factores de riesgo genético, no está claro cómo variantes de los genes de NRG1 o ERBB4 pueden conferir una mayor susceptibilidad para desarrollar la enfermedad.

Debido a que la mayoría de las variantes están localizadas en regiones no codificantes del gen [36]–[39], se sugiere que cambios en los niveles de expresión de NRG1 causan funciones anormales. En apoyo a este concepto, se ha observado aumento y disminución en la expresión de NRG1. Asimismo, se ha reportado una fosforilación de ErbB4 incrementada, en muestras de cerebros *post mortem* de pacientes con EZ [40]–[43]. Estos hallazgos indican efectos de “ganancia de función” tras la hiperestimulación de la señalización de NRG1/ErbB4, los cuales podrían desencadenar alteraciones, corriente abajo en otros eventos de señalización. En última instancia, esto podría conducir a alteraciones a nivel de las redes corticales. Lo descrito anteriormente, indica que los genes *Nrg1* y *ErbB4* son candidatos interesantes y los mecanismos patológicos asociados a la señalización NRG1/ErbB4 son un blanco de estudio importante, en el contexto de enfermedades neuropsiquiátricas como la EZ.

## Señalización de NRG1/ErbB4 en el cerebro

Las moléculas de señalización y los receptores que se encuentran en la superficie celular sirven como importantes reguladores para la formación de la red neural durante el desarrollo y de la plasticidad de red en el cerebro maduro. La evidencia sugiere que alteraciones funcionales en tales módulos de señalización podrían provocar disfunciones en las redes neuronales, que podrían conducir al desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia.

Específicamente, NRG1 y su principal receptor en el cerebro, ErbB4, están involucrados en procesos del neurodesarrollo que afectan el establecimiento y la función adecuada de los circuitos neuronales, como la migración neuronal. Adicionalmente, la señalización de NRG1/

ErbB4 regula el desarrollo de axones y dendritas de neuronas GABAérgicas y promueve la formación y maduración de sinapsis GABAérgicas sobre neuronas piramidales. NRG1/ErbB4 también puede ser necesaria para la maduración de las sinapsis GABAérgicas en las interneuronas del hipocampo. Varios estudios sugieren que la eliminación de ErbB4 de las interneuronas que expresan Parvalbumina (Parv<sup>+</sup>) también tiene un efecto indirecto en las sinapsis excitatorias. Por lo tanto, las funciones de ErbB4 en la población de interneuronas donde mayoritariamente se expresa, pueden afectar indirectamente a las funciones de la red excitadora [7], [44]–[51].

Estudios *in vitro* sugieren que la señalización NRG1/ErbB4 también participa en la modulación de las funciones sinápticas y la neurotransmisión en redes maduras [52]–[55]. Adicionalmente, análisis *in vitro* e *in vivo* han sugerido que NRG1/ErbB4 también está involucrada en la plasticidad sináptica [53], [56]–[60]. Estos estudios sugieren que este módulo de señalización está involucrado en el equilibrio de la relación excitatoria/inhibitoria (E/I) en los circuitos corticales. Además, las isoformas NRG1 participan de manera diferente en la modulación de los circuitos corticales. Por esta razón, son necesarios nuevos estudios *in vivo* para analizar las funciones de isoformas específicas.

Algunos procesos en los que NRG1/ErbB4 está involucrada, se han observado afectados en EZ, incluyendo número reducido de interneuronas inhibitorias [61]–[63], expresión reducida de GAD67 en interneuronas Parv<sup>+</sup> de la corteza prefrontal dorsolateral y funciones inhibitorias perturbadas [64]–[69], alteraciones en las espinas dendríticas [70] y déficits en la sincronización cortical, como alteraciones en gama-oscilaciones [71]–[73].

Asimismo, investigaciones en ratones mutantes también han revelado similitudes con los pacientes con EZ. Los ratones mutantes convencionales (ErbB4<sup>-/-</sup>) y mutantes de ErbB4 específicos para interneuronas (ErbB4<sup>-/-</sup>\*Parv-Cre) manifestaron hiperactividad inducida por la novedad y déficits en la inhibición prepulso (PPI), en línea con los hallazgos en pacientes con EZ. Además, mutantes condicionales posnatales de NRG1 exhibieron hipoactividad y deterioro del aprendizaje condicionado por el miedo. Mientras que el aumento de la expresión de NRG1 fue asociado con un deterioro del PPI [56], [74], [75]. Por otro lado, la sobreexpresión pan-neuronal de CRD-NRG1 en ratones conduce al agrandamiento ventricular, el endofenotipo más replicado en pacientes con EZ que también se asoció con variantes del gen *Nrg1* [56], [76]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la alteración de la actividad de señalización de NRG1/ErbB4 puede ser relevante para la etiopatología de la EZ.

## Herramientas biotecnológicas para estudios de la señalización de NRG1/ErbB4

El modelaje de la pérdida o la ganancia de funciones del módulo de señalización de NRG1/ErbB4 en cultivos neuronales y en modelos de ratones transgénicos se han convertido en herramientas valiosas para estudiar sus funciones *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Estos enfoques han brindado información importante sobre la participación de NRG1/ErbB4 en la formación y mantenimiento de circuitos corticales bajo condiciones normales y de enfermedad.

La mayoría de los estudios que analizan las funciones de señalización de NRG1 en el cerebro han empleado una versión recombinante del dominio soluble de tipo EGF de NRG1 (NRG1 $\beta$ ), pero no está claro hasta que medida éste enfoque recapitula las funciones de señalización de las formas completas de isoformas de NRG1, en su contexto natural. Por lo tanto, los modelos de ratón, que poseen similitudes genéticas y fisiológicas con los humanos, son herramientas necesarias para estudios de mecanismos biológicos y fisiopatológicos, así como para la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento. En el área de las neurociencias, los modelos genéticos de ratones son herramientas invaluable para investigar el impacto de alteraciones moleculares específicas

en los procesos cerebrales *in vivo*. En este contexto, en el Departamento de Neurogenética del Max Planck para Medicina Experimental (MPI-em) en Göttingen, Alemania, se han generado varios modelos de ratones transgénicos en los que isoformas de NRG1 (Ig y CRD) están sobre-expresadas neuronalmente (bajo el control del promotor Thy 1.2; [77], [78]). Actualmente, en el CIB del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), se desarrollan proyectos de investigación en colaboración con el MPI-em. Una característica única de estos proyectos es la disponibilidad de estas líneas de ratones transgénicos establecidas y bien caracterizadas, que permiten examinar las (dis)funciones de la red cortical en respuesta a la señalización hiperestimulada de NRG1/ErbB4. Es importante destacar que, ya se ha demostrado que el aumento de expresión NRG1 en estos ratones transgénicos está asociado con la hiperfosforilación crónica de ErbB4, como se ha observado en pacientes con EZ [41], [56].

Asimismo, y en el marco de esta colaboración, contamos con la disponibilidad de otras líneas de ratones transgénicos que permiten la sobreexpresión condicional de NRG1 de manera específica en diferentes tipos celulares y etapas del desarrollo. Adicionalmente, contamos con una novedosa línea de ratones, que generamos recientemente y que es única en el mundo, para la sobreexpresión condicional de NRG2. Esta proteína de la familia de las NRGs, es un factor de crecimiento altamente relacionado, cuya expresión en cerebro es mucho mayor en etapas postnatales y durante la adultez comparada con la de NRG1 [79], que también se une y activa a ErbB4 [80]. Además, estudios genéticos han sugerido que NRG2 es un candidato atractivo para regular distintos procesos de señalización mediados por el receptor ErbB4 en el cerebro, con relevancia para los trastornos neuropsiquiátricos [35], [81], [82]. Mediante el modelaje *in vivo* de mecanismos patológicos de señalización que involucran a proteínas asociadas a la EZ, estos estudios pretenden generar una mejor comprensión de la etiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos y proporcionar nuevos blancos para el desarrollo de estrategias de tratamiento más potentes y selectivas.

## Perspectivas

Con estos estudios se comienza a desarrollar en el CIB una nueva línea de investigaciones dentro del área biomédica, específicamente las neurociencias. Se espera que estos, complementen los estudios sobre genética de enfermedades neuropsiquiátricas, que empezaron a desarrollarse en Costa Rica desde la década de los 90s [27]. Estas investigaciones pretenden aportar significativamente al entendimiento de las funciones biológicas y patológicas de proteínas cuyos genes son candidatos para enfermedades como la EZ.

Asimismo, se pretende que estos estudios propicien la introducción y desarrollo en el país de la tecnología para la generación y utilización de organismos transgénicos, para modelar *in vivo* distintos procesos patológicos en humanos. Esto es indispensable tanto para la comprensión de los mecanismos biológicos y fisiopatológicos asociados, como para la búsqueda de tratamientos adecuados. Esta tecnología proporciona herramientas necesarias para investigaciones científicas, incluyendo el área biomédica.

Además, aprovechando el intercambio científico y tecnológico con el MPI-em, se espera colaborar con el desarrollo de las neurociencias en Costa Rica. Para cumplir este objetivo y por las características del país con respecto a Institutos de investigación que se dediquen a este tema, disponibilidad de financiamiento, laboratorios y capital humano capacitado en el área, es necesaria además, la colaboración interinstitucional. Lo anterior se desea fomentar mediante los proyectos de investigación vigentes y en futuras propuestas de investigación. Por último, pero no menos importante, se tiene como objetivo la formación de profesionales en esta área, lo cual es el principal propósito de las Universidades y que aporta enormemente al desarrollo científico y tecnológico del país.

## Referencias

- [1] L. Mei and W. C. Xiong, "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia Lin," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 9, pp. 437–452, 2008.
- [2] V. Steinhorsdottir *et al.*, "Multiple novel transcription initiation sites for NRG1," *Gene*, vol. 342, no. 1, pp. 97–105, 2004.
- [3] D. L. Falls, "Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies," in *The EGF Receptor Family: Biologic Mechanisms and Role in Cancer*, 2003, pp. 15–31.
- [4] A. J. Law, C. Shannon Weickert, T. M. Hyde, J. E. Kleinman, and P. J. Harrison, "Neuregulin-1 (NRG-1) mRNA and protein in the adult human brain," *Neuroscience*, vol. 127, no. 1, pp. 125–136, 2004.
- [5] X. Liu *et al.*, "Specific regulation of NRG1 isoform expression by neuronal activity.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 23, pp. 8491–8501, 2011.
- [6] E. S. Anton, M. A. Marchionni, K. F. Lee, and P. Rakic, "Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex," *Development*, vol. 124, pp. 3501–3510, 1997.
- [7] N. Flames *et al.*, "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1," *Neuron*, vol. 44, no. 2, pp. 251–561, 2004.
- [8] C. Rio, H. I. Rieff, P. Qi, T. S. Khurana, and G. Corfas, "Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration.," *Neuron*, vol. 19, pp. 39–50, 1997.
- [9] T. L. Burgess, S. L. Ross, Y. Qian, D. Brankow, and S. Hu, "Biosynthetic processing of neu differentiation factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 19188–19196, 1995.
- [10] J. A. Loeb, E. T. Susanto, and G. D. Fischbach, "The neuregulin precursor proARIA is processed to ARIA expression of the cell surface by a protein kinase C-enhanced mechanism," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 91, pp. 77–91, 1998.
- [11] J. C. Montero *et al.*, "The extracellular linker of pro-Neuregulin-a2c is required for efficient sorting and juxtacrine function," *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. December, pp. 380–393, 2007.
- [12] X. Hu *et al.*, "Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system.," *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 12, pp. 1520–1525, 2006.
- [13] M. Willem *et al.*, "Control of peripheral nerve myelination by the  $\beta$ -secretase BACE1.," *Science*, vol. 314, no. 5799, pp. 664–666, 2006.
- [14] T. Yokozeki, S. Wakatsuki, K. Hatsuzawa, R. A. Black, I. Wada, and A. Sehara-Fujisawa, "Meltrin  $\beta$  (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin  $\beta$ 1 in the Golgi apparatus: Fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells," *Genes to Cells*, vol. 12, no. 3, pp. 329–343, 2007.
- [15] Y. Chen, M. L. Hancock, L. W. Role, and D. A. Talmage, "Intramembranous valine linked to schizophrenia is required for neuregulin 1 regulation of the morphological development of cortical neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 27, pp. 9199–9208, 2010.
- [16] J. Bao, D. Wolpowitz, L. W. Role, and D. A. Talmage, "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 6, pp. 1133–1141, 2003.
- [17] T. R. Insel, "Rethinking schizophrenia.," *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 187–193, 2010.
- [18] J. Contreras, H. Raventós, G. Rodríguez, and M. Leandro, "Call for a change in research funding priorities: the example of mental health in Costa Rica.," *Rev. Panam. Salud Publica*, vol. 36, no. 4, pp. 266–9, Oct. 2014.
- [19] A. Vita, L. De Peri, C. Silenzi, and M. Dieci, "Brain morphology in first-episode schizophrenia: A meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies," *Schizophr. Res.*, vol. 82, no. 1, pp. 75–88, 2006.
- [20] I. C. Wright *et al.*, "Meta-Analysis of regional brain volumes in schizophrenia," *Am. J. Psychiatry*, vol. 157, no. 1, pp. 16–25, Jan. 2000.
- [21] B. Chattopadhyaya and G. Di Cristo, "GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders," *Front. Psychiatry*, vol. 3, no. MAY, p. 51, 2012.
- [22] A. Hayashi-Takagi, "Synapse pathology and translational applications for schizophrenia," *Neurosci. Res.*, vol. 114, pp. 3–8, 2017.
- [23] C. E. Moyer, M. A. Shelton, and R. A. Sweet, "Dendritic spine alterations in schizophrenia," *Neurosci. Lett.*, vol. 601, pp. 46–53, 2015.

- [24] R. Gao and P. Penzes, "Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders," *Curr. Mol. Med.*, vol. 15, no. 2, pp. 146–67, 2015.
- [25] P. J. Harrison, "The neuropathology of schizophrenia: A critical review of the data and their interpretation," *Brain*, vol. 122, no. 4, pp. 593–624, 1999.
- [26] B. Stepniak *et al.*, "Accumulated environmental risk determining age at schizophrenia onset: A deep phenotyping-based study," *The Lancet Psychiatry*, vol. 1, no. 6, pp. 444–453, 2014.
- [27] A. Pacheco and H. Raventós, "Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos," *Revista de biología tropical internacional*, vol. 52, pp. 467–473, 2004.
- [28] A. G. Cardno and I. I. Gottesman, "Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics," *Am. J. Med. Genet. - Semin. Med. Genet.*, vol. 97, no. 1, pp. 12–17, 2000.
- [29] M. J. Owen, N. Craddock, and M. C. O'Donovan, "Schizophrenia: Genes at last?," *Trends Genet.*, vol. 21, pp. 518–525, 2005.
- [30] J. Lee *et al.*, "Deconstructing bipolar disorder and schizophrenia: A cross-diagnostic cluster analysis of cognitive phenotypes," *J. Affect. Disord.*, vol. 209, pp. 71–79, 2017.
- [31] Z. S. Agim *et al.*, "Discovery, validation and characterization of Erbb4 and Nrg1 haplotypes using data from three genome-wide association studies of schizophrenia," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e53042, 2013.
- [32] C. Walss-Bass *et al.*, "A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia," *Biol. Psychiatry*, vol. 60, no. 6, pp. 548–553, 2006.
- [33] M. S. Mostaid *et al.*, "Meta-analysis reveals associations between genetic variation in the 5' and 3' regions of Neuregulin-1 and schizophrenia," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 7, no. 1, pp. e1004-5, 2017.
- [34] P. F. Sullivan *et al.*, "Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1.," *Mol. Psychiatry*, vol. 13, no. 6, pp. 570–584, 2008.
- [35] C. M. Lewis *et al.*, "Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 73, no. 1, pp. 34–48, 2003.
- [36] L. Athanasiu *et al.*, "Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort," *J. Psychiatr. Res.*, vol. 44, no. 12, pp. 748–753, 2010.
- [37] M. R. Munafò, D. L. Thiselton, T. G. Clark, and J. Flint, "Association of the NRG1 gene and schizophrenia: a meta-analysis.," *Mol. Psychiatry*, vol. 11, no. 6, pp. 539–546, 2006.
- [38] T. L. Petryshen *et al.*, "Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology.," *Mol. Psychiatry*, vol. 10, no. 4, pp. 366–374, 2005.
- [39] H. Stefansson *et al.*, "Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 71, no. 4, pp. 877–892, 2002.
- [40] I. Bertram *et al.*, "Immunohistochemical evidence for impaired neuregulin-1 signaling in the prefrontal cortex in schizophrenia and in unipolar depression.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1096, no. 1, pp. 147–156, 2007.
- [41] C.-G. Hahn *et al.*, "Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia.," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 7, pp. 824–828, 2006.
- [42] A. J. Law *et al.*, "Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 17, pp. 6747–6752, 2006.
- [43] C. S. Weickert, Y. Tiwari, P. R. Schofield, B. J. Mowry, and J. M. Fullerton, "Schizophrenia-associated HapICE haplotype is associated with increased NRG1 type III expression and high nucleotide diversity," *Transl Psychiatry*, vol. 2, no. 4, p. e104, 2012.
- [44] K.-X. Li *et al.*, "Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy.," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 2, pp. 267–273, 2012.
- [45] J. Neddens, D. Vullhorst, D. Paredes, and A. Buonanno, "Neuregulin links dopaminergic and glutamatergic neurotransmission to control hippocampal synaptic plasticity," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 261–264, 2009.
- [46] I. del Pino *et al.*, "Erbb4 Deletion from Fast-Spiking Interneurons Causes Schizophrenia-like Phenotypes," *Neuron*, vol. 79, no. 6, pp. 1152–1168, 2013.
- [47] P. Fazzari *et al.*, "Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling.," *Nature*, vol. 464, no. 7293, pp. 1376–1380, 2010.
- [48] D. Krivosheya *et al.*, "ErbB4-neuregulin signaling modulates synapse development and dendritic arborization through distinct mechanisms," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 47, pp. 32944–32956, 2008.

- [49] C. S. Barros *et al.*, "Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 11, pp. 4507–4512, 2009.
- [50] B. Li, R. S. Woo, L. Mei, and R. Malinow, "The neuregulin-1 receptor ErbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity," *Neuron*, vol. 54, no. 4, pp. 583–597, 2007.
- [51] D.-M. Yin *et al.*, "Regulation of spine formation by ErbB4 in PV-positive interneurons.," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 49, pp. 19295–19303, 2013.
- [52] Z. Gu, Q. Jiang, A. Fu, N. Ip, and Z. Yan, "Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 20, pp. 4974–4984, 2005.
- [53] O.-B. Kwon, M. Longart, D. Vullhorst, D. A. Hoffman, and A. Buonanno, "Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses.," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 41, pp. 9378–9383, 2005.
- [54] A. K. Ting *et al.*, "Neuregulin 1 promotes excitatory synapse development and function in GABAergic interneurons.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 1, pp. 15–25, 2011.
- [55] R. S. Woo *et al.*, "Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release," *Neuron*, vol. 54, no. 4, pp. 599–610, 2007.
- [56] A. Agarwal *et al.*, "Dysregulated expression of neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity," *Cell Rep.*, vol. 8, no. 4, pp. 1130–1145, 2014.
- [57] Y.-J. Chen *et al.*, "ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 50, pp. 21818–21823, 2010.
- [58] Y. Z. Huang *et al.*, "Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses.," *Neuron*, vol. 26, no. 2, pp. 443–455, 2000.
- [59] G. M. Pitcher, S. Beggs, R.-S. Woo, L. Mei, and M. W. Salter, "ErbB4 is a suppressor of long-term potentiation in the adult hippocampus.," *Neuroreport*, vol. 19, no. 2, pp. 139–143, 2008.
- [60] A. Shamir *et al.*, "The importance of the NRG-1/ErbB4 pathway for synaptic plasticity and behaviors associated with psychiatric disorders," *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 9, pp. 2988–2997, 2012.
- [61] S. A. Chance, M. Walker, and T. J. Crow, "Reduced density of calbindin-immunoreactive interneurons in the planum temporale in schizophrenia," *Brain Res.*, vol. 1046, no. 1–2, pp. 32–37, 2005.
- [62] D. J. Holt *et al.*, "Reduced density of cholinergic interneurons in the ventral striatum in schizophrenia: an in situ hybridization study," *Biol. Psychiatry*, vol. 58, no. 5, pp. 408–416, 2005.
- [63] P. Levitt, "Disruption of interneuron development," *Epilepsia*, vol. 46, no. SUPPL. 7, pp. 22–28, 2005.
- [64] S. Akbarian *et al.*, "Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics," *Arch Gen Psychiatry*, vol. 52, no. 4, pp. 258–266, Apr. 1995.
- [65] F. Farzan *et al.*, "Evidence for gamma inhibition deficits in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia," *Brain*, vol. 133, no. 5, pp. 1505–1514, 2010.
- [66] T. Hashimoto *et al.*, "Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 15, pp. 6315–6326, 2003.
- [67] D. a Lewis, T. Hashimoto, and D. W. Volk, "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 312–324, 2005.
- [68] D. Ongür, A. P. Prescott, J. McCarthy, B. M. Cohen, and P. F. Renshaw, "Elevated gamma-aminobutyric acid levels in chronic schizophrenia.," *Biol. Psychiatry*, vol. 68, no. 7, pp. 667–670, 2010.
- [69] J. H. Yoon *et al.*, "GABA concentration is reduced in visual cortex in schizophrenia and correlates with orientation-specific surround suppression.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 10, pp. 3777–3781, 2010.
- [70] P. Penzes, M. E. Cahill, K. A. Jones, J.-E. VanLeeuwen, and K. M. Woolfrey, "Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders.," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 285–293, 2011.
- [71] J. S. Kwon *et al.*, "Gamma frequency-range abnormalities to auditory stimulation in schizophrenia," *Arch. Genet. Psychiatry*, vol. 56, no. 11, pp. 1001–1005, 1999.
- [72] P. J. Uhlhaas and W. Singer, "Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 100–113, 2010.
- [73] J. K. Wynn, G. A. Light, B. Breitmeyer, K. H. Nuechterlein, and M. F. Green, "Event-related gamma activity in schizophrenia patients during a visual backward-masking task," *Am. J. Psychiatry*, vol. 162, pp. 2330–2336, 2005.

- [74] I. H. Deakin *et al.*, "Transgenic overexpression of the type i isoform of neuregulin 1 affects working memory and hippocampal oscillations but not long-term potentiation," *Cereb. Cortex*, vol. 22, no. 7, pp. 1520–1529, 2012.
- [75] D. M. Yin *et al.*, "Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1," *Neuron*, vol. 78, no. 4, pp. 644–657, 2013.
- [76] I. Mata *et al.*, "A neuregulin 1 variant is associated with increased lateral ventricle volume in patients with first-episode schizophrenia," *Biol. Psychiatry*, vol. 65, no. 6, pp. 535–540, 2009.
- [77] V. Velanac *et al.*, "Bace1 processing of NRG1 type III produces a myelin-inducing signal but is not essential for the stimulation of myelination," *Glia*, vol. 60, no. 2, pp. 203–217, 2012.
- [78] G. V. Michailov *et al.*, "Axonal Neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness," *Science*, vol. 304, pp. 700–703, 2004.
- [79] M. Longart, Y. Liu, I. Karavanova, and A. Buonanno, "Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons," *J. Comp. Neurol.*, vol. 472, no. 2, pp. 156–172, 2004.
- [80] K. L. Carraway *et al.*, "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases.," *Nature*, vol. 387, pp. 512–516, 1997.
- [81] B. Konte *et al.*, "A genome-wide association study of early gamma-band response in a schizophrenia case-control sample," *World J. Biol. Psychiatry*, vol. 19, no. 8, pp. 602–609, Nov. 2018.
- [82] I. Benzel *et al.*, "Interactions among genes in the ErbB-neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia," *Behav. Brain Funct.*, vol. 3, no. 1, p. 31, 2007.

# Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico *Brucella abortus* realizados en el CIB

Interuniversity and multidisciplinary research projects about the zoonotic pathogen *Brucella abortus* developed in the CIB

Olga Rivas-Solano<sup>1</sup>

---

Rivas-Solano, O. Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico *Brucella abortus* realizados en el CIB. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 77-84.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4630>



<sup>1</sup> Ingeniera en Biotecnología, Máster en Microbiología. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo Electrónico: orivas@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-0990-149X>

## Palabras clave

*Brucella* spp.; identificación; virulencia; especificidad de hospedero.

## Resumen

Desde el año 2009, el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del TEC ha venido desarrollando varios proyectos de investigación interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con la bacteria *Brucella abortus*. Estos proyectos se hicieron en conjunto con el Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA) y el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR). La mayoría de estos proyectos contaron principalmente con financiamiento de los Fondos Especiales para la Educación Superior (FEES) del Consejo Nacional de Rectores (CONARE). Durante la última década, el financiamiento recibido del FEES, permitió crear y equipar el Laboratorio de Bacteriología en el CIB; realizar trabajos finales de graduación y tesis de licenciatura, maestría y doctorado, en las áreas de biotecnología, microbiología, medicina veterinaria y ciencias biomédicas. También se han publicado artículos científicos en revistas indexadas y se están elaborando manuscritos, como resultado de las tesis doctorales en ejecución.

## Keywords

*Brucella* spp.; identification; virulence; host specificity.

## Abstract

Since 2009, the “Centro de Investigación en Biotecnología” (CIB) of “TEC”, has carried out several interuniversity and multidisciplinary research projects about the bacterium *Brucella abortus*. CIB has collaborated with the “Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET)” from “Escuela de Medicina Veterinaria” of “Universidad Nacional (UNA)” and the “Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales” from “Facultad de Microbiología” of “Universidad de Costa Rica”. Most of the projects received funding from “Fondos Especiales para la Educación Superior (FEES)” of “Consejo Nacional de Rectores (CONARE)”. During the last decade, FEES-funding allowed the creation and equipment of a bacteriology laboratory, as well as the development of several bachelor, master and doctoral thesis in the fields of biotechnology, microbiology, veterinary medicine and biomedical sciences. All that work was accompanied with the publication and writing of scientific articles.

## *Brucella* y brucelosis

La enfermedad causada por *Brucella* spp. se denomina brucelosis y es endémica en países de Centro y Suramérica, la cuenca mediterránea, el Norte y el Este de África, el Medio Oriente y Asia [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la brucelosis como una de las siete zoonosis más extendidas a nivel mundial y menos priorizada por los sistemas de salud [2], con aproximadamente 500 000 casos al año [3].

El género *Brucella* está constituido por doce especies que infectan mamíferos: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. paponis* y *B. vulpis*. La mayoría de ellas presenta alta especificidad de hospedero

y algunas pueden también infectar a los humanos con mayor o menor grado de virulencia según la especie. Recientemente se han reportado aislamientos atípicos de *Brucella* sp en anfibios [4].

*Brucella abortus* es un patógeno zoonótico, intracelular facultativo que afecta principalmente al ganado vacuno. En las hembras, la bacteria ocasiona abortos, retención de placenta, infertilidad y disminución en la producción de leche. En los machos causa epididimitis y orquitis o atrofia testicular. La transmisión de animal a animal ocurre por consumo del feto abortado. La transmisión de animal a humano se da por exposición a los animales infectados con *B. abortus* y por consumo de leche y derivados lácteos contaminados con la bacteria. El personal de fincas y mataderos, así como el personal de laboratorios que manipulan muestras contaminadas, puede contraer la enfermedad al exponerse a la bacteria durante la realización de sus labores, por lo que la brucelosis en humanos se considera una enfermedad ocupacional. La brucelosis humana se conoce también con el nombre de “Fiebre de Malta” y presenta inicialmente una fase aguda que se caracteriza por síntomas inespecíficos como fiebre ondulante, fatiga, anorexia y postración, entre otros. En ausencia de tratamiento, estos síntomas pueden persistir por semanas o meses, de manera que la infección puede volverse crónica y evolucionar a complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, pulmonares, genitourinarias, cardiovasculares y neurológicas, entre otras consecuencias potencialmente mortales [1], [5].

### Brucelosis en Costa Rica: ¿por qué es pertinente la investigación en este tema?

En Costa Rica, se han reportado aislamientos de *B. abortus* en ganado bovino y en humanos, *B. suis* en cerdos, *B. canis* en perros, *B. neotomae* en humanos y *B. ceti* en delfines. Se considera que la brucelosis bovina está diseminada por todo el territorio y la brucelosis humana es endémica desde principios del siglo XX [6].

El primer caso de brucelosis humana en Costa Rica fue diagnosticado en 1940 por hemocultivo y seroaglutinación. Sin embargo, los primeros aislamientos en humanos datan de 1915 y se le atribuyen al Dr. Clodomiro Picado Twright, aunque dichos aislamientos no fueron formalmente identificados como *Brucella*, ya que en esa época aún no se conocía que la brucelosis animal se transmitía a los humanos [7].

El pasado 25 de julio 2018, el Gobierno de la República reformó el Reglamento para la Intervención de la Brucelosis Bovina, decreto N°-34858- MAG, para reforzar las medidas de control, con miras a mejorar el combate de la enfermedad y así lograr su erradicación. Dicho reglamento establece en su artículo 1 que “se declara la brucelosis bovina como una enfermedad de combate oficial obligatorio, bajo normativa, protocolos específicos y fiscalización del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) (...) en coordinación con otras instituciones públicas”. Por otro lado, el artículo 10 menciona que “el destino de los animales positivos será únicamente el sacrificio en un matadero oficialmente reconocido” y que además “no existirá ninguna responsabilidad indemnizatoria por parte del SENASA”. El artículo 20 indica que todo resultado positivo debe ser notificado de forma obligatoria a SENASA y el artículo 32 establece que “la venta de leche y sus derivados sólo será permitida si se demuestra que proviene de hatos en saneamiento o libres de Brucelosis”. El Programa Nacional de Brucelosis Bovina del SENASA tiene como objetivo controlar la enfermedad mediante el diagnóstico y eliminación de animales positivos para continuar con la fase de erradicación y declarar el país libre de brucelosis bovina [8]. En América Central, la prevalencia de brucelosis bovina oscila entre un 4% y 8%, con pérdidas económicas de aproximadamente US\$25 millones por año. Costa Rica no escapa de esta situación y posee las prevalencias más altas de la región [9].

Desde 1980, la Universidad Nacional (UNA) ha sido pionera en desarrollar investigaciones científicas con *B. abortus* a cargo del Dr. Edgardo Moreno. El Dr. Moreno realizó su doctorado

en la Universidad de Wisconsin, bajo la tutoría del Dr. David Berman, un experto en brucelosis e inmunología que fue uno de los responsables de erradicar la brucelosis en el estado de Wisconsin y en los Estados Unidos. Cuando el Dr. Moreno regresó al país trabajó en la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA y en el INCIENSA. Antes de su llegada, en Costa Rica se realizaba solamente diagnóstico serológico de la brucelosis. El Dr. Moreno realizó la primera identificación de aislamientos de *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* en Costa Rica y su primer proyecto de investigación científica consistió en estudiar las actividades biológicas y las características químicas del lipopolisacárido de *Brucella* (E. Moreno, comunicación personal).

Posteriormente, la UNA comenzó a realizar proyectos conjuntos con otros centros de investigación a nivel nacional e internacional. A nivel nacional destacan el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR) y más recientemente el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del TEC, el cual incursionó en este tema hace una década. A nivel internacional destacan la Universidad de Navarra en España, el Centro de Inmunología de Marseille-Luminy en Francia, el Instituto Sanger de la Wellcome Trust (WTSI) en Inglaterra y la Universidad de Namur en Bélgica, entre otros.

Debido a que la enfermedad aún no ha sido erradicada y dada su importancia económica, aún sigue siendo pertinente desarrollar investigaciones científicas sobre brucelosis en Costa Rica.

## Proyectos de investigación desarrollados en el TEC en conjunto con la UNA y la UCR durante la última década

### Elaboración de un protocolo para la identificación de bacterias del género *Brucella* que representan un riesgo para la salud pública, veterinaria y la vigilancia epidemiológica en Costa Rica: 2009-2011

El género *Brucella* ha representado un reto desde el punto de vista taxonómico, debido a que las especies que lo conforman poseen alrededor de un 98% de identidad a nivel de secuencia de ADN. La principal característica que distingue a una especie de otra es la preferencia por su hospedero natural [10]. Sin embargo, para efectos clínicos y epidemiológicos, es necesario contar con una identificación precisa a nivel de género y especie, ya que dicha información orienta al personal de salud a tomar las medidas necesarias para controlar la infección, ya sea desde el punto de vista del tratamiento para el paciente, para la instauración de medidas sanitarias efectivas e incluso para prevenir la propagación de la enfermedad. El objetivo de este proyecto fue elaborar, estandarizar y validar un protocolo que permitiera identificar, a nivel de especie, bacterias de este género en nuestro país. El protocolo de identificación generado permitió identificar, como *B. abortus*, *B. canis* y *B. ceti*, aislamientos de *Brucella* existentes en las universidades públicas. Los aislamientos de *B. ceti* provenían del Pacífico costarricense y representaron un nuevo genotipo a nivel mundial que no se había reportado antes [11]. El protocolo de identificación fue transferido a SENASA. Este proyecto generó dos Trabajos Finales de Graduación para optar por el grado de Bachillerato Universitario en Ingeniería en Biotecnología del ITCR, una Tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la UCR; tres Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria de la UNA, una Tesis de Maestría Académica en Enfermedades Tropicales de la UNA y cuatro publicaciones en revistas indexadas. Además, permitió crear y equipar el Laboratorio de Bacteriología del CIB. Como parte de este proyecto de investigación, también se organizaron talleres dirigidos a profesionales de la salud, líderes comunales y autoridades locales para capacitarlos en el diagnóstico de la enfermedad y el adecuado manejo de los encallamientos de cetáceos en el país. Se realizaron dos talleres, uno en el Refugio de Vida Silvestre en Playa Dominical y otro en

el Hospital Monseñor Sanabria, en Puntarenas. Para lograr una mayor participación, se coordinó con los responsables del Refugio de Vida Silvestre, con la Fundación Keto y con el encargado de Salud Ambiental del Hospital Monseñor Sanabria. Además, se elaboró material divulgativo y se publicó un artículo en Investigatec [12] y otro en Tecnología en Marcha [13].

#### **Estudio de la regulación de genes implicados en la virulencia, estructura e inmunogenicidad de *Brucella abortus*: 2012-2013**

Este proyecto contó con financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del TEC. El objetivo general fue estudiar la regulación de genes implicados en la virulencia, estructura e inmunogenicidad de la bacteria *B. abortus*, con el fin de contribuir al entendimiento del proceso de invasión y vida intracelular de la bacteria. La virulencia de *Brucella* spp., radica en su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células infectadas [14]. Por lo tanto, una caracterización más profunda de las interacciones entre los factores de transcripción de la bacteria y los genes esenciales para su virulencia, estructura e inmunogenicidad, podría contribuir a contar con mejores herramientas terapéuticas y preventivas [15]. Los resultados son parte de la tesis doctoral de la autora y serán publicados próximamente en una revista indexada. Además, se escribió un artículo divulgativo en Investigatec [16] y un artículo de revisión en Tecnología en Marcha [5].

#### **Terapia génica para el tratamiento de las enfermedades infecciosas: 2013-2014**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte a nivel mundial [17]. Sin embargo, el combate de las mismas se ha retrasado por la aparición de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos [18]. La OMS reconoce esta situación como un problema de salud pública y ha dictaminado pautas generales a seguir para evitar la propagación y aparición de nuevos microorganismos resistentes [19]. El proyecto “Terapia génica para el tratamiento de las enfermedades infecciosas” pretendió desarrollar, a manera de prueba de concepto, un modelo de terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas como una alternativa al uso de antibióticos. Para ello se utilizó como modelo microbiano *B. abortus*, ya que para esta bacteria se conocían con cierto detalle los mecanismos de regulación génica de la virulencia, por lo que se diseñaron moléculas capaces de interrumpir la expresión de genes de virulencia, mediante competencia con las moléculas reguladoras. Para el transporte de estas moléculas dentro de la bacteria, se diseñaron oligonucleótidos mutados y se generaron nanopartículas de sílica mesoporosa en suficiente cantidad para acoplar los oligonucleótidos mutados. Este proyecto generó nueve ponencias en congresos y simposios a nivel nacional e internacional; una estancia corta de investigación en la Universidad de Madrid, España; dos Trabajos Finales de Graduación de Ingeniería en Biotecnología; una tesis de Licenciatura en Microbiología; Parasitología y Química Clínica de la UCR, una tesis de Maestría Académica en Microbiología de la UCR y un artículo divulgativo en la revista Investigatec [20].

#### **Mecanismos moleculares de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*: 2014-2015**

Como se mencionó, la virulencia de *Brucella* spp., radica en su habilidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células infectadas, para lo cual resultan fundamentales el sistema de dos componentes (TCS) BvrR/BvrS y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) VirB. Las bacterias con mutaciones en el primero son muy atenuadas pues no logran entrar ni transitar dentro de la célula hospedera; mientras que las bacterias con mutaciones en el segundo no pueden llegar al nicho replicativo de *Brucella* spp., que es el retículo endoplásmico. En este proyecto se estudiaron los eventos moleculares que tienen lugar en las bacterias durante las primeras horas de la infección y se encontró que, *in vitro*, el TCS BvrR/BvrS regula transcripcionalmente el T4SS

VirB y su regulador positivo VjbR. Se confirmó que el TCS BvrR/BvrS es un regulador maestro que detecta el cambio de medio ambiente desde el medio extracelular hasta el interior de la célula hospedera. Este evento culmina con la activación por fosforilación del TCS BvrR/BvrS. Seguidamente aumenta la expresión de VirB, lo cual se acompaña de la secreción de efectores que modulan el tráfico intracelular de las bacterias. También se determinó que las señales que activan al TCS BvrR/BvrS son la limitación de nutrientes y la acidificación. Adicionalmente se demostró que una vez activado, BvrR forma un homodímero que es el que funcionalmente se une a las secuencias promotoras para regular la expresión génica [21]. Este proyecto generó una tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, dos ponencias en congresos internacionales, dos artículos científicos en revistas indexadas y un artículo de divulgación en la revista Investigatec [22].

### Regulación transcripcional de la virulencia de *Brucella abortus*: 2016-2017

Como se mencionó el TCS BvrR/BvrS es fundamental para el ciclo de vida intracelular *Brucella* spp., ya que controla factores asociados con el tránsito de la bacteria hacia el retículo endoplásmico de la célula eucariota que parasita. A pesar de que se conocían algunos de los genes regulados por BvrR/BvrS, como por ejemplo *omp25*, *vjbR* y *virB*, era necesario descifrar todo el regulón asociado al mismo con el fin de comprender mejor como controla eventos tan importantes para la patogénesis de la brucelosis. El proyecto permitió conocer en detalle el panorama transcripcional controlado por BvrR/BvrS, mediante la técnica de ChIP-seq, para lo cual se procedió a inmunoprecipitar y secuenciar el ADN unido a BvrR. El análisis bioestadístico y bioinformático de los datos de secuenciación, permitió conocer la globalidad de los genes regulados por BvrR y así mismo realizar una comparación bioinformática con los regulones recientemente reportados para CtrA y VjbR [23], [24]. El primero es un regulador global de *Brucella* spp., que controla el ciclo celular y parece tener cierta intersección con BvrR, sobretodo con respecto a proteínas de membrana externa. El segundo es otro regulador transcripcional de *Brucella* spp., que es importante para el tránsito intracelular. Por último, se verificó por métodos bioquímicos que BvrR se une a las secuencias promotoras de algunos de los genes identificados por bioinformática. Este proyecto generó una ponencia en un congreso internacional, un trabajo final de graduación de Ingeniería en Biotecnología, una tesis de Licenciatura en Microbiología, Parasitología y Química Clínica; dos tesis de Maestría Académica en Microbiología; diez artículos científicos publicados en revistas indexadas y un artículo divulgativo publicado en Investigatec [25].

### Descifrando la especificidad de hospedero: el caso de las bacterias del género *Brucella*: 2018-2019

Como se mencionó, las especies que conforman el género *Brucella* son muy específicas de hospedero pero muestran gran similitud genómica entre sí. La mayoría de estudios genómicos en *Brucella* se enfocan en las semejanzas de los organismos analizados. Sin embargo, dado que los genomas de *Brucella* presentan más de un 96% de similitud [26], la explicación de la especificidad de hospedero y su variación en virulencia debe encontrarse en ese ~4% de discrepancia. El proyecto es novedoso pues se enfoca en diferencias y no en similitudes. Ante la homogeneidad que presentan las especies de *Brucella*, se requiere el uso de herramientas de alto poder de resolución para la detección de variaciones. Este es el caso de las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación. El proyecto pretende que, con el análisis genómico de diversas especies de *Brucella*, provenientes de distintos hospederos y de distintos sitios anatómicos de un mismo hospedero se contribuya a establecer si la presencia de SNPs, pseudogenes, regiones repetitivas, entre otros, son importantes en la adaptación de *Brucella* a su hospedero. Al finalizar el proyecto se espera también la conclusión de al menos dos tesis doctorales, incluyendo la de la autora.

## Conclusión

Costa Rica ocupa el quinto lugar a nivel mundial de todas las publicaciones que se han hecho en brucelosis desde 1950 [27], por encima de países como Argentina, Australia, Bélgica y Alemania, entre otros. Además, el país ocupa el segundo lugar en publicaciones clásicas de brucelosis más leídas, lo cual en palabras del Dr. Moreno “es un gran logro para un país tan pequeño” (E. Moreno, comunicación personal). En la última década, los distintos proyectos mencionados han permitido que el CIB forme parte de un grupo de investigación multidisciplinario e interuniversitario muy fuerte que trabaja en temas de vanguardia en el campo de la brucelosis, por lo cual a futuro las perspectivas de continuar trabajando en este tema son muy alentadoras.

## Referencias

- [1] M. J. Corbel, *Brucellosis in Humans and Animals*. 2006.
- [2] World Health Organization, “No title,” *Seven Neglected Endemic Zoonoses—some Basic Facts*, 2014.
- [3] G. Pappas *et al*, “The new global map of human brucellosis,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, (2), pp. 91-99, 2006.
- [4] S. Al Dahouk *et al*, “*Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts,” *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 44420, 2017.
- [5] O. Rivas-Solano, “*Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia,” *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 28, (2), pp. 73, 2015.
- [6] G. Hernández-Mora *et al*, “Brucellosis in mammals of Costa Rica: an epidemiological survey,” *PloS One*, vol. 12, (8), pp. e0182644, 2017.
- [7] J. Zeledón-Alvarado, “Primera historia clínica de brucelosis humana en Costa Rica,” *Rev. Med.*, vol. 72, pp. 153-167, 1940.
- [8] J.C. Jiménez, “FICHA PROGRAMA NACIONAL DE BRUCELOSIS BOVINA,” 2009.
- [9] E. Moreno, “Brucellosis in central America,” *Vet. Microbiol.*, vol. 90, (1-4), pp. 31-38, 2002.
- [10] E. Moreno, A. Cloeckart and I. Moriyón, “*Brucella* evolution and taxonomy,” *Vet. Microbiol.*, vol. 90, (1-4), pp. 209-227, 2002.
- [11] G. Hernández-Mora *et al*, “Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease,” *PloS One*, vol. 12, (8), pp. e0182380, 2017.
- [12] C. Zúñiga-Vega and O. Rivas-Solano, “Buscan atender problemática asociada al encallamiento de cetáceos y su relación con la brucelosis marina,” 2015.
- [13] O. Rivas-Solano and C. Zúñiga-Vega, “Posible impacto en la salud pública del encallamiento de cetáceos en Costa Rica,” *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 26, (2), pp. 40, 2013.
- [14] R. Sieira *et al*, “Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* *virB* operon,” *Mol. Microbiol.*, vol. 54, (3), pp. 808-822, 2004.
- [15] C. Viadas *et al*, “Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system” . *PLoS One*, vol. 5, (4), pp.1-8, 2010.
- [16] O. Rivas-Solano, “Proyecto de investigación básica genera conocimiento sobre virulencia de *Brucella abortus*,” 2015.
- [17] World Health Organization, “ *The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action: Executive Summary*, 2012.
- [18] S. Qazi *et al*, “Global action plan for the prevention and control of pneumonia (GAPP): Report of an informal consultation: La Mainaz, Gex, France, 5-7 March 2007,” 2008.
- [19] World Health Organization, “ *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*, 2001.
- [20] O. Rivas-Solano, “Proyecto exploró opciones de terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas,” 2017.
- [21] P. Altamirano-Silva *et al*, “*Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche,” *Infect. Immun.*, pp. 17, 2018.



- [22] O. Rivas-Solano, "Proyecto interdisciplinario de investigación genera conocimiento sobre los mecanismos de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*," 2018.
- [23] N. Francis *et al*, "CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*," *Mol. Microbiol.*, vol. 103, (5), pp. 780-797, 2017.
- [24] C. L. Kleinman *et al*, "ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, (10), pp. 5757-5769, 2017.
- [25] O. Rivas-Solano, "Proyecto de investigación genera conocimiento sobre la regulación transcripcional de la virulencia en el patógeno zoonótico *Brucella abortus*," 2018.
- [26] J. VERGER *et al*, "*Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 35, (3), pp. 292-295, 1985.
- [27] F. G. Bakri, H. M. AlQadiri and M. H. Adwan, "The Highest Cited Papers in Brucellosis: Identification Using Two Databases and Review of the Papers' Major Findings," *BioMed Research International*, vol. 2018, 2018.

# Biología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional

## Microalgal biotechnology in Costa Rica: Business opportunities to the national productive sector

Fabián Villalta-Romero<sup>1</sup>, Francinie Murillo-Vega<sup>2</sup>, Bernal Martínez-Gutiérrez<sup>3</sup>, Johnny Valverde-Cerdas<sup>4</sup>, Andrés Sánchez-Kopper<sup>5</sup>, Maritza Guerrero-Barrantes<sup>6</sup>

Villalta-Romero, F; Murillo-Vega, F; Martínez-Gutiérrez, B; Valverde-Cerdas, J; Sánchez-Kopper, A; Guerrero-Barrantes, M. Biología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 85-93.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4634>

- 1 Químico. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: fvillalta@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: frmurillo@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-2751-8390>
- 3 Administrador de Empresas. Escuela de Administración de Empresas, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: bmartinez@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-0436-5229>
- 4 Químico. Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: jovalverde@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-2192-5144>
- 5 Químico. Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: ansanchez@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-8469-4366>
- 6 Bióloga. Escuela de Biología Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: mguerrero@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-8253-5919>



## Palabra clave

Microalgas; biorremediación; biofertilizantes; alimento animal.

## Resumen

La biotecnología microalgal se presenta como una oportunidad de mercado para el sector productivo costarricense. En esta revisión se detallarán algunos aspectos de los potenciales y limitaciones que tiene este sector de la biotecnología para nuestra región. La visualización de este potencial se remonta a más de una década, en donde en el Centro de Investigación en Biotecnología se dio inicio con el proceso de selección y conservación de cepas de microalgas nativas y su escalamiento. Se describirá brevemente algunos sistemas de cultivo de microalgas y de procesamiento, que pueden ser destinadas para diferentes mercados, entre los que se destaca la alimentación de humanos y animales, biofertilizantes, tratamiento de aguas, captura de CO<sub>2</sub> y la generación de metabolitos de alto valor. Paralelamente, se ha avanzado en la generación de protocolos para el escalamiento de las microalgas mediante la formulación de medios orgánicos con residuos agroindustriales. También se ha desarrollado el cultivo en diferentes zonas del territorio costarricense, mostrando la posibilidad de adaptación en diferentes regiones climáticas.

## Keywords

Microalgae; bioremediation; biofertilizer; animal feed.

## Abstract

Microalgal biotechnology is presented as a market opportunity for the productive sector. In this review some aspects of the potential and limitations of this biotechnology sector for our region will be detailed. The visualization of this potential goes back more than a decade when the Biotechnology Research Center began the process of selecting and preserving native microalgae strains, and scaling-up their biomass. We will briefly describe some microalgae cultivation and microalgal biomass processing systems that can be used for different markets, including the feeding of humans and animals, biofertilizers, water treatment, CO<sub>2</sub> capture and the generation of metabolites of high value. At the same time, progress has been made in the generation of protocols for the scaling of microalgae through the formulation of organic media with agroindustrial residues such as dairy manure, sugar cane, vinasse, pig manure and chicken manure. Cultivation has also been developed in different areas of the Costa Rican territory, showing the possibility for adaptation in different climatic regions.

## Introducción

Las microalgas son un amplio grupo de organismos procariotas y eucariotas, que poseen la habilidad de realizar fotosíntesis, capaces de convertir la energía lumínica y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en biomasa de alto valor. El potencial que ofrecen las microalgas puede ser aprovechado para su uso como herramienta de la biotecnología ambiental, especialmente en los campos de la bioenergía [1], biorremediación [2], captura de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) [3], tratamiento de aguas residuales, pudiendo ser aprovechada para eliminar metales pesados [4] y algunos contaminantes emergentes [5], [6], [7].

Las microalgas representan un formidable recurso gracias a la enorme gama de sustancias bioquímicas valiosas y novedosas para generar investigaciones y productos en las industrias alimentaria, agrícola y farmacéutica [8], [9], [10]. El mercado de estas aplicaciones sigue emergiendo, y se han abierto nuevas áreas de investigación en biotecnología microalgal para satisfacer las nuevas demandas de productos de la industria y los consumidores [10].

Por ejemplo, en los últimos 15 años, China se ha convertido en el principal productor de biomasa de microalgas en el mundo. La espirulina (*Arthrospira sp.*) es el producto microalgal más importante por tonelaje y valor, seguido de *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* y *Haematococcus sp.*, las cuatro principales microalgas cultivadas comercialmente. La producción de China se estima en alrededor de dos tercios de la biomasa mundial de microalgas, de los cuales aproximadamente 90% se vende para consumo humano como productos nutracéuticos, con mercados más pequeños en piensos principalmente para la acuicultura marina [11].

La posibilidad de usar aguas de baja calidad y el hecho de que no se necesita tierra fértil para su cultivo [12], las convierte en una opción que no compite con la soberanía alimentaria. Sin embargo, la relación costo/eficiencia de los actuales sistemas de producción han reservado la biomasa microalgal principalmente para aplicaciones de alto valor en salud, cosmética, nutracéuticos, alimentos humanos y la acuicultura [9].

La maximización de la producción y la minimización de costos son los temas más importantes para todos los involucrados en el cultivo de algas, para tal fin, se han implementado medios de cultivo alternativos basados en fertilizantes inorgánicos (NPK) [13]. El aporte nutricional es una herramienta primordial en el mantenimiento y el desarrollo de los cultivos microalgales; la selección del medio de cultivo adecuado para la microalga que se desea cultivar es un factor clave de éxito en aplicaciones industriales [14].

Los fertilizantes inorgánicos son simples y se pueden utilizar como medio alternativo para el cultivo microalgas, se disuelven fácilmente, tienen una composición definida y mantienen un pH moderado en el medio [15]. Sin embargo, al ser productos no renovables y con un costo considerable, no ha sido factible cultivar microalgas en altos volúmenes para aplicaciones bioenergéticas, biofertilizantes o como alimento animal. Además, varios países incluyendo Costa Rica están buscando limitar la utilización de estos químicos con el fin de reducir la huella de carbono y el impacto ambiental.

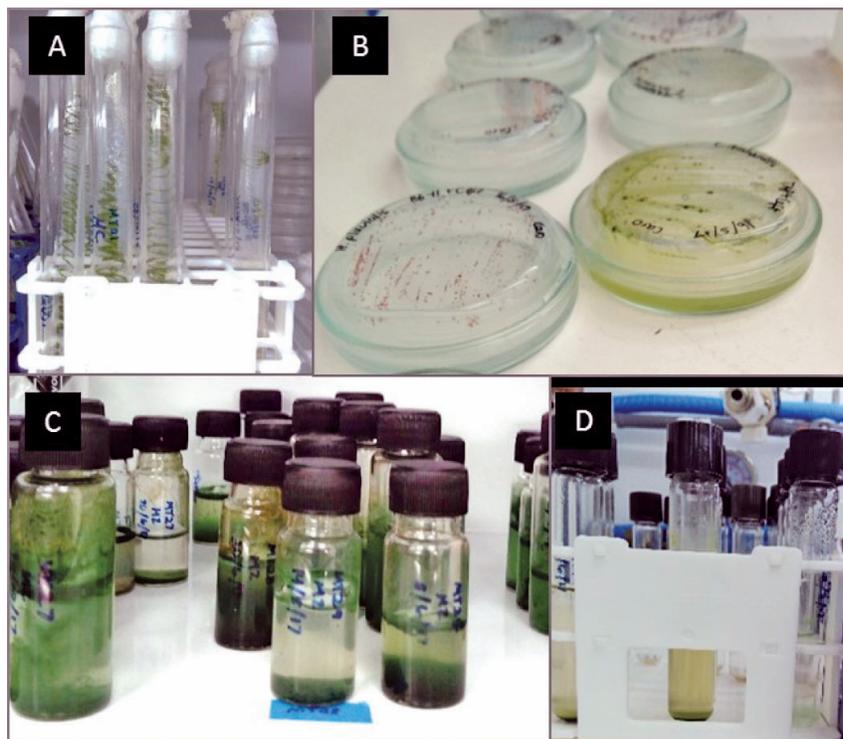
Una alternativa a los fertilizantes inorgánicos son los subproductos de los sustratos orgánicos de la agroindustria; su composición química proporciona una alternativa de fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, oligoelementos y otros nutrientes. El crecimiento de las microalgas en el agua residual de la industria alimentaria se ha establecido como una alternativa tecnológica viable, y reduce el alto costo de tratamiento del agua para la empresa, como la de palmito [16]. Por lo tanto, la reutilización de estas aguas contribuye en la utilización eficiente de los residuos, generando una biomasa con alto potencial económico. Además, se contribuye con la captura de dióxido de carbono y la producción de oxígeno; a su vez, esto permite reducir del impacto ambiental y por ende a mejorar las evaluaciones ambientales en las industrias [17].

Otras ventajas que ofrecen las microalgas serían su capacidad de crecer en tierras áridas no productivas, en aguas salinas y en aguas residuales domésticas e industriales y, por consiguiente, no compiten con los sistemas convencionales cultivados en tierras agrícolas, por lo tanto, no representan una amenaza para la seguridad alimentaria [18].

Las biomásas de microalgas pueden cumplir los requisitos nutricionales de aves, cerdos, ganado, peces y humanos. La composición bioquímica de las microalgas (vitaminas, minerales, ácidos grasos y antioxidantes) puede ser considerada como un alimento funcional, ya que complementan la función nutritiva y ayudan a la prevención de ciertas enfermedades.

## Colección de cepas

Para potencializar la biotecnología microalgal en Costa Rica se procedió a establecer una colección de cepas de microalgas nacionales. Las colecciones de cepas son depósitos de biodiversidad que permiten resguardar material biológico en forma viable, pura y estable. Las colecciones más grandes del mundo se encuentran en USA, Reino Unido, Japón, Alemania, Francia y Australia (UTEX, CCAP, NIES, SAG, Roscoff y CSIRO); sin embargo, en todo el mundo existen colecciones más pequeñas y que no tienen gran visualización internacional, pero que representan un patrimonio biológico único para estudios de ciencia básica y aplicada. El Grupo de Investigación Microalgal del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) inició la investigación con microalgas desde el 2007 y se vio la necesidad de crear una estructura tecnológica y logística para el resguardo de las especies de microalgas autóctonas. Actualmente se cuenta con más de 60 cepas aisladas de distintos ambientes, registradas ante la oficina de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO). Se desarrollaron protocolos de conservación a corto plazo y largo plazo (figura 1) por criogénesis y se han identificado morfológicamente unas 40 cepas hasta nivel de familia; de estas microalgas, un total de 24 cepas fueron seleccionadas para hacer la identificación molecular empleando el gen del ADNr 18S. A partir de los análisis de secuencias de amplificación se logró determinar que de las cepas pertenecen a la clase Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Prymnesiophyceae y Cyanidiophyceae [19], en muchas de las cuales se han descubierto interesantes propiedades que las hacen muy atractivas para su uso a nivel comercial y permite el estudio en ciencia básica como aplicada, contribuyen al conocimiento, valoración, conservación y uso sustentable de estos interesantes recursos biológicos.



**Figura 1.** Respaldo de cepas microalgales en medio semisólido y líquido, tanto a temperatura ambiente como a baja temperatura. A). Agar inclinado a baja temperatura, B). Placas de agar a temperatura ambiente, C). Respaldo líquido a baja temperatura, D). Respaldo líquido

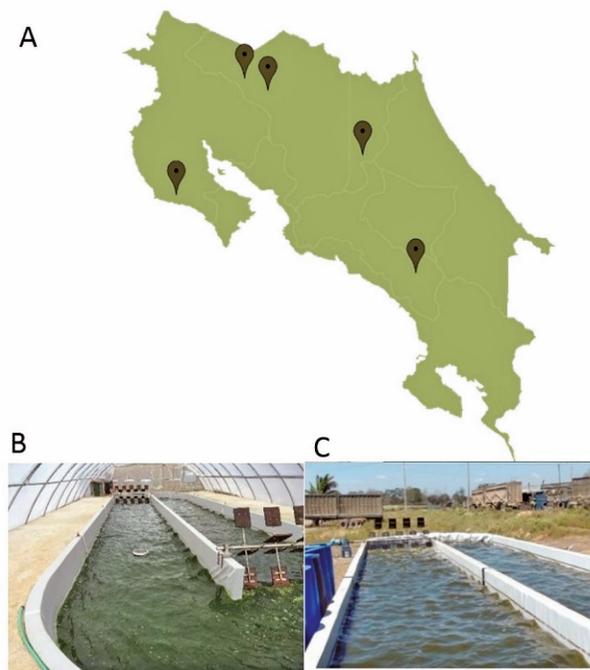
## Escalamiento de cultivos

### Fotobiorreactores cerrados

Los cultivos microalgales se realizan en sistemas acuáticos llamados biorreactores y pueden ser cerrados o abiertos. Dentro de los sistemas cerrados, usualmente se emplean las cámaras de microalgas que consisten en sistemas a pequeña escala donde se realiza el escalamiento para aumentar su volumen. Estos pueden ser diversos en formas y tamaños, desde tubos de ensayo, Erlenmeyer a botellas de plástico (PET). Bajo estas condiciones la temperatura, luz, agitación, etc., se mantienen controladas. Los fotobiorreactores, son sistemas cerrados que permiten realizar cultivos microalgales con la mayor producción y mayor control de la mayoría de los parámetros de crecimiento (temperatura, CO<sub>2</sub>, pH, etc.), y se reducen el riesgo de contaminaciones y las pérdidas de CO<sub>2</sub>.

A pesar de la complejidad de cultivar a intemperie, con adecuadas prácticas de manejo se ha logrado desarrollar cultivos microalgales hasta volúmenes de 40.000 L en Costa Rica [17], adaptándolas a diferentes residuos agroindustriales y a diferentes condiciones climáticas. Esta experiencia ha permitido poder desarrollar un *know-how* TEC que tiene un valor económico, ambiental y social muy importante para su posterior transferencia de la tecnología desarrollada al Sector Productivo.

Los sistemas de cultivo en reactores abiertos tipo *Raceways* o canales poseen un sistema de agitación mediante paletas o hélices, y pueden alcanzar 40 cm de profundidad en el CIB (figura 2), superando los estándares internacionales que usan menos profundidad. El suelo y paredes suelen estar recubiertos por una geomembrana. Algunas limitaciones son el mantenimiento de cultivos monoalgales, por lo que su empleo a gran escala se ha limitado a ciertas cepas de crecimiento vigoroso en medios selectivos y resistentes a condiciones de intemperie.



**Figura 2.** A) Localización de estanques de cultivos de microalgas en Costa Rica. B) Cultivo de microalgas en sistema Raceway en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. C) Cultivo de microalgas en sistema Raceway en el Hacienda El Viejo en Guanacaste.

## Aplicaciones

### Biofertilizantes

Las microalgas han sido objeto de estudio por parte del sector académico y la industria para lograr el desarrollo y la innovación (I+D+i) de nuevos productos en el sector agrícola, especialmente en el diseño de nuevas formulaciones de biofertilizantes [20], [21], [22]. El potencial del uso de las biomásas microalgales como biofertilizantes radica en que contienen altos niveles de micronutrientes y macronutrientes esenciales, así como algunos reguladores de crecimiento, poliaminas, enzimas, hidratos de carbono naturales, proteínas y vitaminas que tienen un efecto favorable en el crecimiento vegetativo, en el estado nutricional de las plantas y el rendimiento de los cultivos. Algunas investigaciones han mostrado que la aplicación de formulaciones de biofertilizantes microalgales en semillas de arroz acelera el proceso de germinación y el crecimiento de las plántulas; este mismo efecto se ha reportado para las semillas de tomate y trigo [23].

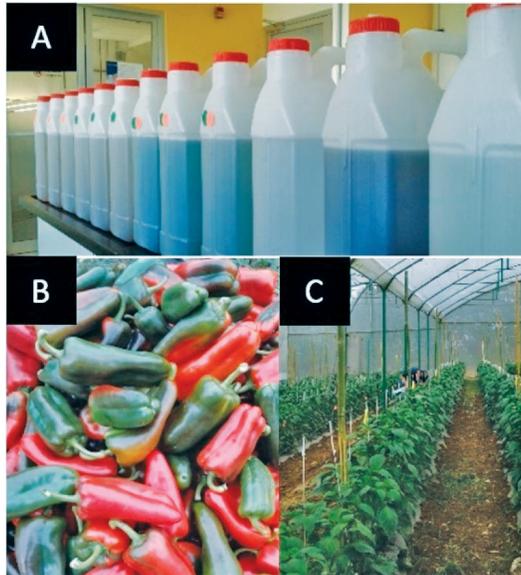
Por otra parte, la aplicación de biofertilizantes microalgales contribuye en el aporte de materia orgánica, reducción del contenido de materia oxidable de la tierra, oxigenación de la rizósfera sumergida, control de la salinidad y el pH, solubiliza los fosfatos, y aumentan la eficiencia del uso de fertilizantes [24].

A pesar de los múltiples beneficios del uso de las microalgas como biofertilizantes, es necesario una adecuada formulación para hacer más eficiente la asimilación de los nutrientes por la planta. Una estrategia ampliamente usada es el empleo de surfactantes como adyuvantes para facilitar la acción de las otras moléculas. Estos permiten reducir el tamaño de las gotas, aumentar la adhesión en la planta y facilitan la movilidad de las moléculas por la cutícula [25], [26], [27], [28].

Con las investigaciones desarrolladas se pretende continuar con los avances alcanzados en el desarrollo de productos de potencial biotecnológico con cepas de microalgas nativas de Costa Rica (figura 3), disponibles en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### Alimentos para animales

Los perfiles nutricionales de las microalgas se caracterizan por altos contenidos de proteína, carbohidratos y lípidos funcionales por lo que, generalmente, el contenido nutricional en microalgas es superior a los piensos convencionales. La proteína se considera el nutriente más caro en la alimentación animal, siendo la soja el grano que aporta la mayor porción a nivel proteico en piensos animales, y se prevé que su precio seguirá aumentando, lo que conlleva un efecto económico negativo en los productores agropecuarios del país. Un aporte para solucionar la problemática actual es el desarrollo de alternativas orgánicas a base de microalgas como sustituto parcial a la harina de soja. La biomasa obtenida de la microalga *Arthrospira sp.* contiene altas cantidades de proteínas, entre 55 y 70% del peso seco y se ha demostrado que genera beneficios en las dietas animales, aumentando en muchos casos la productividad. Por su parte, las microalgas del género *Isochrysis galbana* se caracterizan por su alto contenido lipídico en donde predominan algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como los omega-3, que actúan a nivel neurológico y cardiovascular por lo que constituyen un alimento funcional de alto potencial. Además, estas microalgas poseen micronutrientes, antioxidantes, vitaminas, minerales, y ficonutrientes, por lo que su aporte en las dietas no solo se limita a proteínas y lípidos, sino que constituye una fuente integral de otros nutrientes. Haciendo uso de la infraestructura y conocimiento generado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) se ha desarrollado el cultivo de estas microalgas que presentan un mayor potencial como suplemento en piensos, donde se han iniciado los primeros ensayos en la formulación de piensos para gallinas y cerdos.



**Figura 3** A) Formulación de biofertilizantes a base de microalgas costarricenses. B) Chiles tratados con los Biofertilizantes a base de microalgas costarricenses. C) Cultivo de Chile dulce tratado con Biofertilizantes a base de microalgas.

### Flujos metabólicos

El análisis de rutas metabólicas es una herramienta que permite la caracterización de cepas en sus potenciales de producción. El análisis de flujos metabólicos basado en marcación con  $^{13}\text{C}$  permite evaluar la dirección hacia la cual el metabolismo fotoautotrófico de cepas específicas de microalgas está dirigido. Con estos análisis es posible descubrir cuellos de botella en las rutas metabólicas y elucidar mecanismos de regulación del sistema, permitiendo determinar posibles objetivos para realizar ingeniería metabólica o modificaciones en las estrategias de cultivo que favorezcan la formación de un producto determinado. Para cultivos controlados en fotobioreactores se realiza la incorporación de un marcaje de  $^{13}\text{C}$  mediante la adición de  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  al medio de cultivo. La toma de muestras sucesiva después de la adición hace posible observar cómo se incorpora el  $^{13}\text{C}$  en los metabolitos intracelulares mediante el análisis de extractos por espectrometría de masas. Mediante un modelo matemático que toma en cuenta la rapidez de producción de moléculas marcadas y con la información de la ruta metabólica, se calcula para cada paso del metabolismo central el flujo de cada ruta metabólica. Esta investigación nos permitirá mejorar modelos para la producción de aceites, proteínas, pigmentos y otros metabolitos con propiedades industriales.

### Transferencia tecnológica y estudios económicos

El Laboratorio de Microalgas del CIB (TEC) cuenta con más de 10 años de experiencia en la investigación y desarrollo aplicada a la biotecnología de las microalgas, desarrollando con éxito ensayos de cultivo de estos organismos en su laboratorio en Cartago, y diferentes zonas del país. Durante este periodo se ha desarrollado un paquete tecnológico de producción de microalgas, con alto contenido proteico y lipídico (25% de aceites, 29% de proteína y 19% de carbohidratos) convirtiendo ésta en un producto adecuado para ser implementado en las dietas animales. Por tanto, se está desarrollando un modelo de transferencia de tecnología hacia el sector productivo animal y, de esta manera, contribuir con la reducción de los altos costos de importación de materias primas como la soja. En la actualidad el proyecto ha iniciado un proceso de transferencia del paquete tecnológico con el sector productor, en el año 2017 se firmó el contrato de Transferencia con la Empresa del Grupo Zamora, quienes están interesados en sustituir parcialmente la soja con microalgas.

## Estudios económicos

Es indispensable para el crecimiento socioeconómico de Costa Rica enfocar esfuerzos para disminuir la pobreza en zonas rurales, y esto se lograría a través de la generación de empleos de calidad. La industria de microalgas podría traer más inversiones públicas y privadas a las zonas rurales, generar empleo adicional e ingresos para los agricultores, productores pecuarios y las personas sin terrenos. La capacidad de las microalgas para ser cultivadas en tierras subutilizadas aumenta los potenciales impactos rurales en comparación con otros sistemas productivos. La producción de microalgas en pequeña escala podría ofrecer nuevas oportunidades de empleo, que se verían reflejados de dos maneras: directo (trabajadores de la planta, operadores y sus familias) e indirecto (educación, desarrollo de infraestructura y la estimulación global de la economía local a través de inversiones) [29].

Se ha evaluado la factibilidad económica, legal, ambiental y financiera para la instalación de empresas productoras de alimento animal y biofertilizantes a base de microalgas cultivadas de forma orgánica en Costa Rica y se ha obtenido en ambos casos factibilidad de los proyectos, en un periodo de 5 años, mediante financiamiento, a escalas de cultivo de entre 5 a 13 ha, lo que evidencia el valor generado a partir de la investigación en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. La inversión inicial ronda los 900.000 dólares debido a la base altamente tecnológica que requieren empresas de tipo biotecnológicas; sin embargo, es completamente factible la inversión en estos proyectos bioindustriales, que actualmente vendrían a generar empleo y materias primas para la alimentación animal y sector agro nacional.

## Conclusiones

La biotecnología microalgal se presenta como una oportunidad para la generación de una industria productiva que atienda las necesidades del país y contribuya con la economía nacional, principalmente en los ámbitos económicos, sociales y ambientales. Esta puede ser integrada a diversos procesos agroindustriales para la obtención de productos de alto valor agregado a partir de fuentes de residuos que no se han aprovechado.

## Referencias

- [1] M. Singh, R. Shukla and K. Das, "Harvesting of microalgal biomass," *Biotechnological Applications of Microalgae*, pp. 77-88, 2013.
- [2] L. Bulgariu and M. Gavrilescu, "Bioremediation of heavy metals by microalgae," Boston: Academic Press pp. 457-469, 2015
- [3] A.Y. Shekh, P. Shrivastava, K. Krishnamurthi, S.N. Mudliar, S.S. Devi, G.S. Kanade, S.K. Lokhande and T. Chakrabarti, "Stress-induced lipids are unsuitable as a direct biodiesel feedstock: a case study with *Chlorella pyrenoidosa*," *Bioresour.Technol.*, vol. 138, pp. 382-386, 2009.
- [4] Rawat, R.R. Kumar, T. Mutanda and F. Bux, "Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production," *Appl.Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3411-3424, 2011
- [5] de Wilt, A. Butkovskiy, K. Tuantet, L.H. Leal, T.V. Fernandes, A. Langenhoff and G. Zeeman, "Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams," *J.Hazard.Mater.*, vol. 304, pp. 84-92, 2016.
- [6] F. Peng, G. Ying, B. Yang, S. Liu, H. Lai, Y. Liu, Z. Chen and G. Zhou, "Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification," *Chemosphere*, vol. 95, pp. 581-588, 2014.
- [7] J. Xiong, M.B. Kurade and B. Jeon, "Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water?" *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 1, pp. 30-44, 2018.

- [8] F. Bux, "Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products," Boca Raton, FL: CRC Press, 2013
- [9] Hernández-Pérez and J.I. Labbé, "Microalgas, cultivo y beneficios," *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. 49, no. 2, pp. 157-173, 2014.
- [10] O. Pulz and W. Gross, "Valuable products from biotechnology of microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, pp. 635-648, 2004.
- [11] J. Chen, Y. Wang, J.R. Benemann, X. Zhang, H. Hu and S. Qin, "Microalgal industry in China: challenges and prospects," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 2, pp. 715-725, 2016.
- [12] F.G. Acién, J.M. Fernández, J.J. Magán and E. Molina, "Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 6, pp. 1344-1353, 2012.
- [13] L.H. Sipaúba-Tavares, F.A. Berchielli-Morais and B. Scardoeli-Truzzi, "Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media," *Brazilian Journal of Biology*, vol. 75, pp. 796-806, 2013
- [14] D. James, "Culturing algae". 2014. [Online] Obtenido de <http://catalog.hathitrust.org/Record/009847709>. [Accesado 1 feb, 2019]
- [15] L.H. Sipaúba Tavares, Maria Donadon Lusser Segali, Alexandra and B. Scardoelli-Truzzi, "Aquatic Plants: Alternative Medium for Microalgae growth," *Annals of Aquaculture and Research*, 2015.
- [16] J. Mora-Urpi, and J. Gainza-Echeverría, "*Palmito de pejobaye (bactris gasipaes kunth): Su cultivo e industrialización*," San Jose: Editorial Universidad de Costa Rica, 1999
- [17] Carrasquilla-Batista, A. Chacón-Rodríguez, F. Murillo-Vega, K. Niiñez-Montero, O. Goomez-Espinoza and M. Guerrero-Barrantes, "Characterization of biomass pellets from *Chlorella vulgaris* microalgal production using industrial wastewater," pp. 1-6, 2017.
- [18] Guerrero-Barrantes, "Desarrollan sistema integrado para la producción de microalgas acoplado a un biodigestor ya un emisor de CO<sub>2</sub>," *Investiga. TEC*, vol. 19, pp. 21-21, 2014
- [19] O. Gomez-Espinoza, M. Guerrero-Barrantes, K. Meneses-Montero and K. Núñez-Montero, "Identification of a Microalgae Collection Isolated from Costa Rica by 18S rDNA Sequencing," *Acta Biológica Colombiana*, vol. 23, no. 2, pp. 199-204, 2018.
- [20] J. Coppens, O. Grunert, S. Van Den Hende, N. Boon, G. Haesaert and L. De Gelder, "The application of microalgae as a slow-release fertilizer: tomato cultivation as a model," pp. 19, 2015
- [21] J. Coppens, O. Grunert, S. Van Den Hende, I. Vanhoutte, N. Boon, G. Haesaert and L. De Gelder, "The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 4, pp. 2367-2377, 2016.
- [22] S. Zhang, L. Wang, W. Wei, J. Hu, S. Mei, Q. Zhao and Y.F. Tsang, "Enhanced roles of biochar and organic fertilizer in microalgae for soil carbon sink," *Biodegradation*, pp. 1-9, 2018.
- [23] J. Garcia-Gonzalez and M. Sommerfeld, "Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, no. 2, pp. 1051-1061, 2016.
- [24] O. Uysal, F.O. Uysal and K. Ekinici, "Evaluation of microalgae as microbial fertilizer," *European Journal of Sustainable Development*, vol. 4, no. 2, pp. 77-82, 2015.
- [25] Fagerström, "Effects of surfactant adjuvants on plant leaf cuticle barrier properties," Ph.D. dissertation Faculty of Health and Society, Malmö University, Sweden, 2014
- [26] L. Schreiber and J. Schonherr, "Water and solute permeability of plant cuticles," Berlin: Springer, 2009
- [27] J. Frelichowska, M. Bolzinger and Y. Chevalier, "Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 2, pp. 348-356, 2010.
- [28] J.O. Zoppe, R.A. Venditti and O.J. Rojas, "Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 369, no. 1, pp. 202-209, 2012.
- [29] E. Hytönen, A. Jussila and S. Kuusikunnas, "Algal energy roadmap in India: Opportunities for Finnish industries and SMEs," Finland: VTT Technical Research Centre of Finland, 2014.

# ***Helicobacter pylori* en Costa Rica, más de una década de investigaciones**

## ***Helicobacter pylori* in Costa Rica, more than a decade of research**

Virginia Montero-Campos<sup>1</sup>

---

Montero-Campos, V. *Helicobacter pylori* en Costa Rica, más de una década de investigaciones. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 94-103.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4636>

<sup>1</sup> Microbióloga. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: [vmontero@itcr.ac.cr](mailto:vmontero@itcr.ac.cr).  
 <https://orcid.org/0000-0002-2666-5030>



## Palabras clave

*Helicobacter pylori*; agua potable; cáncer gástrico; *glmM*.

## Resumen

En investigaciones realizadas en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) en agua de consumo humano de Costa Rica, se analizó un total de 112 muestras de agua potable de 20 cantones situados en áreas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico del país. Se logró el cultivo exitoso y la identificación molecular de la bacteria *Helicobacter pylori* con el marcador *glmM* en el 39% de las muestras de áreas de alta incidencia y en el 7.5% de las muestras de áreas de baja incidencia. Además, se analizaron muestras de agua potable ( $n = 44$ ) de acueductos costarricense con tratamiento de cloración en áreas seleccionadas con alta prevalencia de cáncer gástrico, así como muestras de agua de consumo humano de Panamá ( $n = 44$ ) de acueductos que suministran agua no tratada para consumo humano en la provincia de Chiriquí. En el caso de las muestras de Costa Rica, se determinó que el 79.5% de las muestras fue positivo para *H. pylori*; eliminando valores atípicos, la cuantificación de las bacterias se determinó en  $3,6 \times 10^3$  copias/100 mL de agua. Para Panamá, se determinó que el 86% de las muestras fueron positivas para la presencia de *H. pylori* con un valor de  $3.3 \times 10^2$  copias/100 mL agua. La diferencia en los valores entre los acueductos en ambos países reveló una distribución ambiental de las bacterias de interés epidemiológico en cada caso, que puede explicar la diferencia entre las tasas de cáncer gástrico entre ambos países.

## Keywords

*Helicobacter pylori*; drinking water; gastric cancer; *glmM*.

## Abstract

Research conducted at the Biotechnology Research Center (CIB) in water for human consumption from Costa Rica, a total of 112 drinking water samples from 20 cantons located in areas of low and high incidence of gastric cancer in the country were analyzed; successful culture and molecular identification of *Helicobacter pylori* with the *glmM* marker in 39% of the samples from high incidence areas and in 7.5% of the samples from low incidence areas was achieved. In addition, drinking water samples ( $n = 44$ ) of Costa Rican aqueducts with chlorination treatment in selected areas with high prevalence of gastric cancer were also analyzed, as well as samples of water for human consumption from Panama ( $n = 44$ ) of aqueducts that supply water not treated for human consumption in the province of Chiriquí. In the case of samples from Costa Rica, it was determined that 79.5% of the samples were positive for *H. pylori*; eliminating atypical values, the quantification of the bacteria was determined in  $3.6 \times 10^3$  copies/100 mL of water. It was determined for Panama that 86% of the samples were positive for the presence of *H. pylori* with a value of  $3.3 \times 10^2$  copies/100 mL water. The difference in values between the aqueducts in both countries revealed an environmental distribution of the bacteria of epidemiological interest in each case that can explain the difference between gastric cancer rates between both countries.

## Introducción

La infección con *Helicobacter pylori* está catalogada como un agente carcinogénico tipo I (carcinógeno en humanos) por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por

sus siglas en inglés), esto es: la única bacteria en el mundo capaz de producir cáncer basado en la evidencia científica en seres humanos y/o animales de experimentación [1].

Se considera que la bacteria está presente en la mitad de la población mundial, puede evadir la respuesta inmune que provoca, y permanecer en la gran mayoría de los individuos infectados por largos periodos de tiempo sin producir enfermedad. Sin embargo, no todos los países que poseen alta tasa de incidencia de la bacteria en su población poseen altos índices de cáncer gástrico; factores de patogenicidad de la bacteria, factores ambientales del entorno propio de los países y naturaleza genética poblacional, son factores que se mezclan para producir una patología específica en la población [2].

En investigaciones realizadas en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), se ha trabajado desde el año 2007 con esta bacteria. En el presente artículo, se resume que, a partir de estas investigaciones, se logró el cultivo e identificación molecular de la bacteria, reconociendo que del agua se puede aislar de forma viable y cultivable, lo cual a la fecha muy pocos investigadores han logrado en el mundo; posteriormente se cuantificó el número de copias de bacterias del agua de consumo comparándose entre calidades de agua de Costa Rica y Panamá.

## Infeción de la bacteria

En circunstancias definidas bajo la relación hospedero-parásito, la presencia de *H. pylori* en las personas se le asocia con un mayor riesgo de provocar diferentes patologías: gastritis, úlcera gástrica o duodenal, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, adenocarcinoma gástrico y Linfoma del Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (MALT, según la sigla inglesa). Con respecto a la enfermedad ulcero-péptica, la eliminación de la bacteria permite un mejoramiento significativo del epitelio gástrico; sin embargo, se puede presentar la re-infección especialmente en los países tropicales [2].

La infección de la bacteria, por lo general, puede pasar inadvertida en toda la vida del hospedero y los primeros síntomas generalmente tardan mucho tiempo en producirse después de una infección. Esto implica que los episodios de transmisión pueden pasar inadvertidos dificultando el seguimiento de la adquisición y su abordaje epidemiológico. Siendo que el cultivo y el aislamiento de *H. pylori* son relativamente difíciles comparados con otras bacterias de importancia clínica, su identificación solo puede ser molecular dada su relativa facilidad para confundirse con otros microorganismos tanto de la microbiota (en biopsias gástricas) como del ambiente (en muestras de agua) [3].

De acuerdo con lo que presenta la literatura y la relación de la bacteria con cáncer gástrico, se presenta que en gastritis predominante antral, la producción de ácido gástrico se incrementa (hiperclorhidria), y se asocia con un alto riesgo de desarrollar úlcera duodenal, pero de protección contra el desarrollo de cáncer gástrico. Por el contrario, la gastritis predominante en el cuerpo del estómago conduce a una menor producción de ácido gástrico (hipoclorhidria) y puede conducir a una gastritis atrófica, una afección que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico y la condición hipoclorhídrica crea un entorno adecuado para otros microorganismos que puedan entrar y colonizar el estómago. Algunas de estas bacterias son reductoras de nitrógeno, capaces de producir compuestos N-nitrosos cancerígenos a través de la conversión de nitratos o nitritos de la saliva [4].

En un estudio basado en enfoques moleculares, *H. pylori* se detectó en sujetos que se consideraron negativos basados en métodos de cultivo o serológicos tradicionales. La baja abundancia de *H. pylori* está en concordancia con lo que se ha informado anteriormente de acuerdo a la hipoclorhidria del estómago de algunos pacientes [5].

Avances en tecnologías de secuenciación de ADN han descrito comunidades complejas de bacterias no cultivables en el estómago humano. La interacción entre estos habitantes, conocidos colectivamente como la microbiota gástrica y *Helicobacter pylori*, impacta la inmunobiología gástrica y posiblemente el progreso al estado de enfermedad de los pacientes; por lo tanto, la caracterización de la microbiota gástrica en sujetos con y sin infección por *H. pylori* podría proporcionar una nueva perspectiva de la homeostasis gástrica y la patogénesis de la enfermedad asociada a *H. pylori*, incluido el cáncer gástrico [6]. No obstante, ambos roles aún no están claramente establecidos [4].

Con respecto a su comportamiento en el agua, es bien reconocida su habilidad para formar biofilmes o biopelículas, se ha estudiado la adhesión de *H. pylori* en tanques de almacenamiento de agua de acero inoxidable y de polipropileno, encontrándose que en estas superficies la bacteria retiene su morfología espiralar [7]. Lo anterior es importante por cuanto se podría considerar reservorio en sistemas de distribución de agua potable.

Por algún tiempo se consideró que muchos de los problemas que se han encontrado en la recuperación de formas viables de la bacteria en el agua, se debía a que estas pasan a formas cocoides o viables pero no cultivables (VPNC); desde un punto de vista más amplio, ahora se acepta que lo que ocurre es que estas bacterias no se logran cultivar bajo métodos rutinarios y convencionales de laboratorio. Más aún, se ha demostrado que formas cocoides de *H. pylori* son capaces de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis en ratones [8], [9].

Se presenta evidencia sobre la mayor resistencia de *H. pylori* con respecto a *Escherichia coli* al cloro, a las cloraminas y al ozono [10], considerándose esta bacteria capaz de tolerar desinfección en sistemas de distribución de agua y ser un problema en la salud pública [11]. Dado lo anterior las condiciones de saneamiento poblacional se consideran un determinante en la adquisición de la infección [12].

## Investigaciones en el Centro de Investigación en Biotecnología

En una investigación en agua de consumo humano en Costa Rica [3], se analizaron muestras de agua potable de 20 cantones del país ubicados en áreas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico, se utilizó el marcador glmM, y la proteína inductora del factor de necrosis tumoral alfa (T $\alpha$  TNF- $\alpha$ ) como marcador de patogenicidad de las cepas encontradas. Se recopiló información sobre la gestión del agua por los entes operadores de acueductos para establecer relaciones estadísticas. Se analizaron un total de 112 muestras de agua y se logró identificar la bacteria en el 39% de las muestras de agua de áreas de alta incidencia y en el 7.5% de las muestras de áreas de baja incidencia. Se secuenciaron dos productos de PCR del gen glmM, confirmándose como verdaderos positivos. La tasa de prevalencia más alta de *Helicobacter pylori* se encontró en el agua de áreas con una alta incidencia de cáncer gástrico.

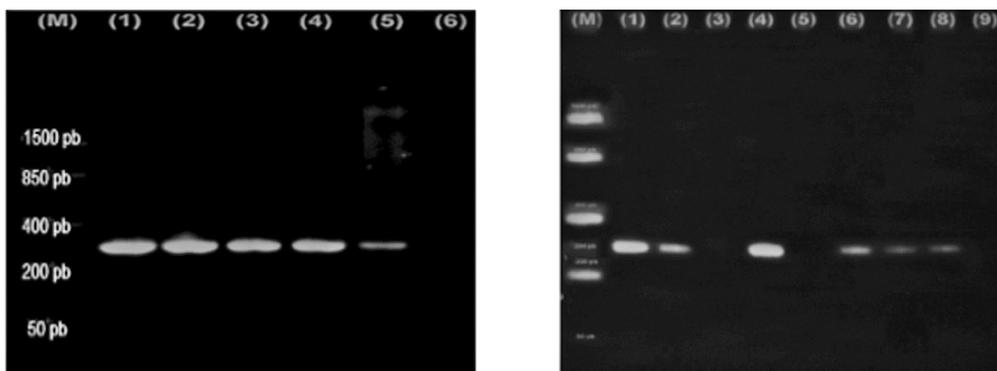
Se establecieron correlaciones estadísticas significativas entre las condiciones ambientales, el manejo del agua potable y la incidencia de cáncer gástrico. Uno de los hallazgos tuvo que ver con las diferencias de altitud (msnm) y la tasa de incidencia de la enfermedad en Costa Rica.

Estas diferencias fueron importantes con un coeficiente de correlación = 0,86. Luego se realizaron comparaciones entre la tasa de incidencia de cáncer gástrico en los cantones estudiados y la altitud, la temperatura ambiental, la fuente de agua y el operador del acueducto que suministra agua a la población. Todas las variables se analizaron estadísticamente utilizando SPSS 16.0 y se establecieron correlaciones significativas e importantes utilizando análisis de correlación de Pearson, obteniéndose que para Costa Rica la tasa de prevalencia de cáncer gástrico se relaciona con la altura y la temperatura ambiental, esto es a mayor altura y menor temperatura ambiental mayor tasa de prevalencia de la enfermedad ( $r = 0,867$  y  $r = -0,853$

respectivamente); además se logró establecer que entre la temperatura ambiental baja y la tasa de prevalencia de cáncer gástrico hay una relación de interdependencia de variables o sea que una variable explica a la otra, esto es a menor temperatura mayor tasa de la enfermedad (coeficiente de regresión lineal de  $r^2 = 0.728$ ).

Se estableció también la relación de la enfermedad con el uso de fuentes de agua como naciente entre las poblaciones de alta y baja incidencia de cáncer gástrico del país ( $r = 0.651$ ), relacionándose directamente con el operador del acueducto mediante una prueba exacta de Fisher estableciéndose que esta relación no es casual.

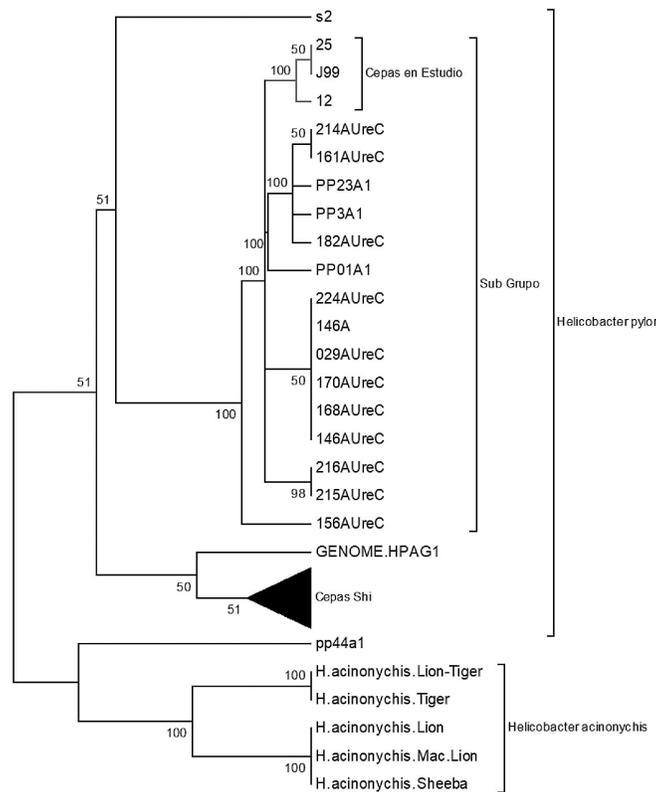
En el año 2014 la investigación titulada: “Culture and Molecular Identification of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica” [13], demostró la capacidad de cultivo de la bacteria en agua para consumo humano. La muestra de agua fue concentrada (1 L) y posteriormente el filtro de nitrocelulosa fue cultivado a 35 °C por 72 horas en medio líquido con antibióticos en microaerofilia, el filtro fue cultivado en forma de curva tratando de retener las bacterias adheridas al mismo. Posterior a esto el crecimiento fue extraído de la zona cercana al filtro y se extrajo el ADN del medio, se evaluaron entonces los marcadores *glmM* y las muestras positivas para dicho marcador se les determinó el marcador TNF- $\alpha$  (figura 1).



**Figura 1.** Visualización de productos de PCR para *glmM* (294 pb). Izquierda: (M) Fast Ruler Low Rangemarker; (1) cepa Hp 12455; (2) cepa J99; (3) *H. p* ATCC 51932; (4) *H. pylori* ATCC 700392; (5) muestra +; (6) Control: agua. Derecha: (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *E. coli*; de la (4) a la (8) muestras +; (9) Control: agua.

Dos muestras positivas fueron escogidas para enviarlas a secuenciación molecular a Macrogen Corporation, Rockville, Maryland, USA confirmándose que las cepas eran verdaderos aislamientos de *Helicobacter pylori*. La figura 2 explica las relaciones filogenéticas de las cepas secuenciadas en un árbol de máxima parsimonia (35:209); este árbol filogenético fue construido utilizando sitios informativos. Los números utilizados se refieren a porcentajes y la longitud de la línea indica distancias y diferencias en el ADN, estableciéndose la cercanía genética entre cepas de bacteria reportadas en el banco de cepas en Estados Unidos, dicho dendrograma se aprecia bajo la figura 2.

Una observación importante a esta bacteria es que, a pesar de que puede ser transmitida por agua, es incapaz de crecer en cultivo líquido como cualquier otra bacteria, por esto es que sólo se pudo obtener cultivos positivos si la bacteria estaba adherida al papel de filtro; ya fue discutido anteriormente la imperiosa necesidad de crecer como biofilme.



**Figura 2.** Árbol de máxima parsimonia que muestra la relación filogenética de las cepas secuenciadas en estudio (rojo), por el gen *glmM*.

Otro proyecto ejecutado en el CIB [14], tuvo como objetivo cuantificar las copias de la bacteria en muestras de agua de Costa Rica y Panamá. Se trabajó con muestras de Costa Rica tratadas con cloro ( $n = 44$ ) de áreas seleccionadas con alta prevalencia de cáncer gástrico, que correspondían a los cantones de: Central, Oreamuno y Paraíso de Cartago. También se analizaron muestras de agua de consumo humano de Panamá ( $n = 44$ ) de acueductos que suministran agua sin cloración de la provincia de Chiriquí. Se buscó el marcador molecular de *H. pylori*, *glmM* utilizando el equipo LightCycler® 480 II (LC480II) de Roche Diagnostics GmbH, así como el Análisis de Cuantificación Absoluta por medio del Método de la Segunda Derivada Máxima.

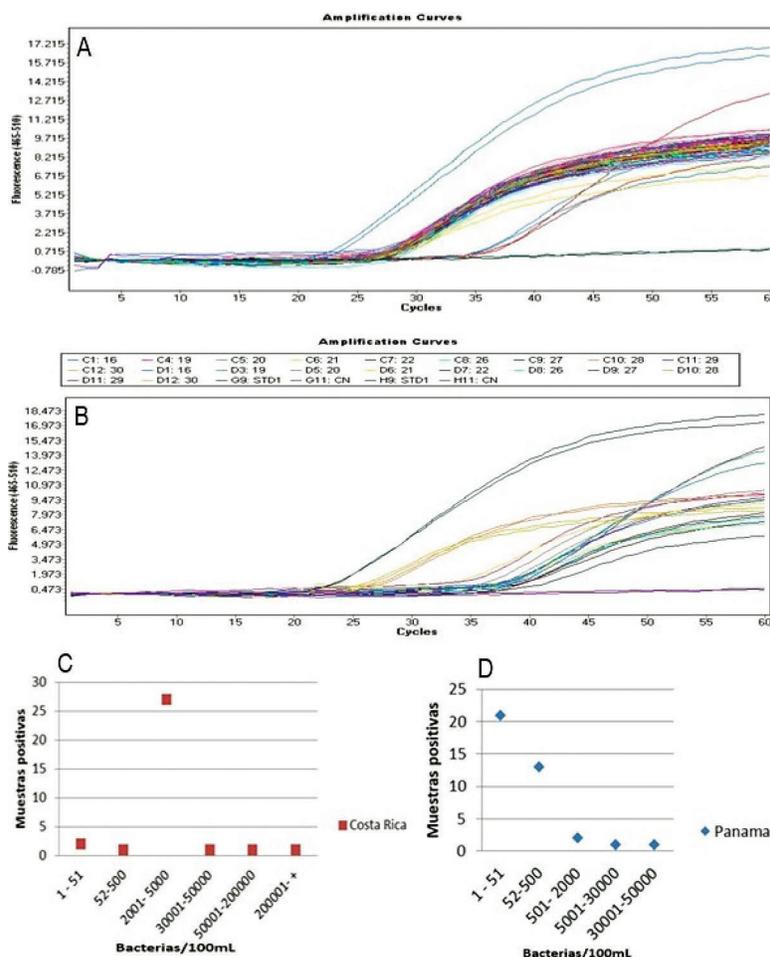
En las muestras de Costa Rica, se determinó que el 79.5% estaban positivas con el marcador *glmM* para *H. pylori*; eliminando valores que distorsionaban el promedio de cuantificación de la bacteria (por ser extraordinariamente altos), se determinó que la misma tenía como promedio  $3,6 \times 10^3$  copias/100 mL; mientras que en el caso de las muestras procedentes de Panamá se determinó que el 86% fueron positivas para la presencia de la bacteria, eliminando valores atípicos se determinó un promedio de  $3,3 \times 10^2$  copias/100 mL; siendo que la diferencia en los valores entre acueductos en ambos países reveló una distribución ambiental de las bacterias de interés epidemiológico en cada caso.

Según los resultados de esta investigación, aunque el agua en zonas de alta incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica es dispensada a la población por los municipios o ASADAS (Asociaciones Administradoras de los Sistemas de Acueductos y Alcantarillados Comunales) y es considerada de muy buena calidad basado en la presencia o ausencia de coliformes fecales, se pudo determinar que en algunos casos aunque el Ente Operador cloraba continuamente en el sitio del tratamiento, en algunos lugares distantes este cloro residual no llegaba al agua de

consumo de la población, determinándose en muchos casos que los tratamientos de cloración aplicados demostraban ser insuficientes y con concentraciones importantes de bacterias viables de *H. pylori* que aún permanecían en el agua.

Aunado a lo anterior, en esos muestreos puntuales en algunos casos se determinó una turbidez aparente superior a 5 NTU (unidades nefelométricas de turbiedad), que es el máximo permitido por el Reglamento de Calidad del Agua en Costa Rica [15]. Los sólidos en suspensión, como las partículas del suelo, pueden servir para ocultar las bacterias. El actual Reglamento de calidad del agua propone tratar el agua con cloro residual de 0.1 mg/L a 0.3 mg/L; sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, esta concentración es totalmente insuficiente para erradicar por completo a *H. pylori*.

Panamá presenta proporcionalmente mucho menores tasas de cáncer gástrico que Costa Rica a la fecha del artículo original [14], que son 10 casos por 100.000 habitantes, contrastado con Costa Rica para la fecha de ese artículo con respecto a datos estadísticos disponibles de 2003 para hombres de 31.87 casos por 100,000 habitantes y 17.42 casos por 100,000 habitantes para mujeres en el mismo año (figura 3).



**Figura 3.** A- Superior: Gráficas del equipo para muestras positivas de Costa Rica, curvas superiores control positivo, líneas inferiores controles negativos; B- Gráficas del equipo para muestras positivas Panamá, curvas superiores control positivo, líneas inferiores controles negativos; C y D Cantidad de bacterias de manera comparativa para muestras positivas de Costa Rica y Panamá.

En un trabajo presentado en el VI Simposio Internacional de *Helicobacter pylori*, San José, Costa Rica en el año 2014, llevada a cabo sobre Prevalencia de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes dispépticos de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica [16], se analizó 135 biopsias de pacientes dispépticos de los cantones de Abangares de Guanacaste y Paraíso de Cartago, como zonas de baja y alta incidencia respectivamente. Las biopsias fueron tomadas de antro y cuerpo gástricos, se procedió al cultivo para la posterior identificación molecular de *Helicobacter pylori* con el marcador glmM y como marcador de patogenicidad de las cepas encontradas se utilizó la proteína inductora del factor de necrosis tumoral alfa (Tipalpha FNT- $\alpha$ ), y el marcador *cag A* (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Tamaños de los productos y secuencias de los marcadores glmM, *cag A*, TNF- $\alpha$ .

Región a amplificar	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencias de los iniciadores 5' – 3'
glmM	294	AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC
<i>cagA</i>	128	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA AGAAACAAAAGCAATACGATCATT
Tipalpha (TNF- $\alpha$ )	273	sFd 5'CACGCAAGGGGTGGATAGC 3'

Se pudo observar que, en los cultivos bifásicos iniciales de la biopsia, se pudo obtener otros crecimientos diferentes a *Helicobacter pylori*, notándose que la bacteria se coloca debajo de la flora acompañante, en la parte inclinada del agar probablemente evitando el acceso de oxígeno.

Se pudo obtener que algunas de estas otras colonias en crecimiento en las biopsias algunos aislamientos son ureasa positiva y oxidasa positiva, por lo que la identificación de las colonias aisladas solamente debe de darse a través de pruebas moleculares.

Para dicha investigación se obtuvo que la bacteria por análisis moleculares solamente fue encontrada entre el 40% y el 56% de pacientes dispépticos de zonas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico respectivamente. No se encontró diferencia de patogenicidad en las cepas entre ambos lugares.

## Conclusiones

Al reconocer que el medio ambiente juega un rol preponderante en la adquisición de la bacteria y la asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* de forma crónica y el riesgo elevado de desarrollar diversas patologías gástricas incluido cáncer gástrico si no se atiende la infección a tiempo; toman entonces especial importancia las condiciones de saneamiento ambiental y el nivel socioeconómico general, tales como acceso al agua potable adecuadamente tratada, educación de la población en hábitos saludables, y conocimiento y prevención del riesgo de patologías gástricas típicas de poblaciones específicas.

Aunado a lo anterior, la población costarricense cuenta con una susceptibilidad genética o polimorfismos proinflamatorios de interleucinas donde la respuesta inflamatoria contribuye a la patogénesis del problema gástrico, dentro del grupo de personas infectadas por *H. pylori*, específicamente las que presentan determinados polimorfismos del gen IL-1 $\beta$  +3954 [17]. El



antígeno Lewis b, que es un fucosil, es el receptor de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica. En un estudio de hace algunos años de León y colaboradores [18], se encontró que el factor de Lewis b, está presente en un 72.4% de la población costarricense; lo que significa que la bacteria puede sentirse mucho “más cómoda” en los estómagos de los costarricenses y con esto promover infecciones crónicas o de largo plazo.

Se comprobó la no correlación entre presencia de *H. pylori* y contaminación fecal en las aguas que abastecen los cantones de las zonas de alta incidencia.

Se describieron por primera vez relaciones geográficas importantes y significativas entre prevalencia de cáncer gástrico y altura, temperatura, origen del agua como naciente y Ente Operador del Acueducto, lo que propone relacionar de forma diferenciada, presencia de *H. pylori* de origen ambiental y alta prevalencia de cáncer gástrico para los cantones de la provincia de Cartago investigados con respecto a los cantones de Guanacaste de muy baja prevalencia.

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento a mis compañeros investigadores que a lo largo de estos años han contribuido con su trabajo y su experiencia a este tema tan importante para la población costarricense: MSc. Alejandro Hernández, Ph.D, MD Sergio Con Chin, Dr Jorge Camacho, Dr Federico Masís, Ph.D Fernando García, MSc Benedicto Valdes, MSc Monserrat Jarquín. A mis asistentes en ese momento estudiantes, hoy Ingenieros en Biotecnología: Ing Milena González, Ing, José Pablo Cerdas, Ing Shirley Arias, Ing Gustavo López, Ing Karina Barboza, Ing Jimena Orozco.

## Referencias

- [1] IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. International Agency for Research on Cancer. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> Consultado 15 de marzo de 2019.
- [2] V. Montero. “Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*”. *Rev Costarr Salud Pública*; vol 18, pp 84-93. Noviembre 2009.
- [3] V.Montero, A. Hernández, F. Masís, Camacho, J; García, F; Barboza, et al. “Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica”. *Tecnología en Marcha*, vol. 24 (3), pp 3-14. Octubre 2011
- [4] J. Dicksved , M. Lindberg, M. Rosenquist, H. Enroth, J.K. Jansson, L. Engstrand. “Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls”. *Journal of Medical Microbiology*, vol 58, pp 509–516. April 2009. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.007302->
- [5] E. Bik, P. Eckburg, S. Gill, S. Nelson, E. Purdom, F. Francois, et al. “Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach” .*Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 103, pp 732–737. Jan 2006.
- [6] K. Brawner, C. Morrow, P. Smith. “Gastric Microbiome and Gastric Cancer”. *Cancer Journal*, vol 20, pp 211-216. May 2014 <http://dx.doi.org/10.1097/PPO.0000000000000043>
- [7] N. Azevedo, A. Pinto, N. Reis, M. Vieira, J. Keevil . “Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water–stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 72(4), pp 2936-2941. April 2006.
- [8] E. Touati, V. Michel, J. Thiberge, N. Wuscher, M. Huerre, A. Labigne A. “Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice”. *Gastroenterology* .,vol 124 (5) pp 1408 – 1419, May 2003.
- [9] F. She, J. Y.Lin, J.Y. Liu, C. Huang, D.H. Su. “Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice”. *World Journal of Gastroenterology*; vol 9 (3), pp 516-520, Mar 2003
- [10] K. Baker, J. Hegarty, B. Redmond, N. Reed, D. Herson. “Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 68(2), pp 981-984, Feb 2002.

- [11] P. Krumbiegel, I. Lehmann, A. Alfreide, G. Fritz, D. Boeckler D, U. Rolle-Kampczyk "Helicobacter pylori determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings". *Isotopes Environ Health Stud*, vol 40(1), pp 75-80, Mar 2004.
- [12] N. Azevedo, N. Guimaraes, C. Figueiredo, C. Keevil, M.J. Vieira. "A New Model for the Transmission of Helicobacter pylori: Role of Environmental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity". *Critical Reviews in Microbiology*, vol 33, pp157-169, (2007).
- [13] V. Montero, A. Hernández, J. Camacho. "Culture and Molecular Identification of Helicobacter pylori in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica". *Open Journal of Medical Microbiology*, vol 4, pp 261-269. Dec 2014. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2014.44030>
- [14] V. Montero, S. Arias, B. Valdés, M. Jarquín. "Quantitative Detection of Helicobacter pylori by Real Time PCR in Drinking Water—Environmental and Public Health Risk Significance". *Open Journal of Medical Microbiology*, vol 5, pp 118-127. Oct 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2015.53015>
- [15] Reglamento para la calidad del Agua Potable. Decreto Ejecutivo 38924. Sistema costarricense de información jurídica. 12/01/2015. Disponible en <http://www.pgrweb.go.cr>
- [16] V. Montero, S. Con Wong, M. González, A. Hernández. "Prevalence of H. pylori in gastric biopsies of dyspeptic patients in areas of high and low incidence of gastric cancer in Costa Rica". VI Simposio Internacional de Helicobacter pylori, San José, Costa Rica. INISA, Universidad de Costa Rica. 2014.
- [17] S. Con, H. Takeuchi, G Con-Chin, V. Con-Chin, N. Yasuda, and R. Con-Wong. "Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica". *World J Gastroenterol*. 15(2): 211–218. Jan 2009. doi: 10.3748/wjg.15.211
- [18] R. León R, R. Marín R, A. Morales. Inmunohematología Avanzada. Distribución de fenotipos y genotipos del sistema de Lewis en Costa Rica 1999. Universidad de Costa Rica.

# Proyectos relacionados con diversidad, ecología, desplazamiento, virulencia y potencial biotecnológico de cepas de *Listeria* spp. aisladas en Costa Rica a partir de muestras alimentarias, clínicas y ambientales

Research projects about diversity, ecology, movement, virulence and biotechnological potential of *Listeria* spp. isolated in Costa Rica from food, clinic and environmental samples

Kattia Núñez-Montero<sup>1</sup>, Luis Barboza-Fallas<sup>2</sup>, Rossy Guillén-Watson<sup>3</sup>, Olga Rivas-Solano<sup>4</sup>, Johnny Peraza-Moraga<sup>5</sup>

Núñez-Montero, K; Guillén-Watson, R; Rivas-Solano, O; Peraza-Moraga, J. Proyectos relacionados con diversidad, ecología, desplazamiento, virulencia y potencial biotecnológico de cepas de *Listeria* spp. aisladas en Costa Rica a partir de muestras alimentarias, clínicas y ambientales. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 104-113.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4637>

1 Ingeniera en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Costa Rica. Correo electrónico: knunez@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-8629-5107>

2 Ingeniero en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Costa Rica. Correo electrónico: luis12barboza@gmail.com.  <https://orcid.org/0000-0001-8381-3696>

3 Ingeniera en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Costa Rica. Correo electrónico: roguillen@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-0388-2910>

4 Ingeniera en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Costa Rica. Correo electrónico: orivas@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-0990-149X>

5 Biólogo, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Costa Rica. Correo electrónico: jperaza@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-7769-1944>



## Palabras claves

*Listeria monocytogenes*; *Listeria costaricensis*; aislamiento; suelos; ambiente; comunidades bacterianas.

## Resumen

El género *Listeria* está compuesto por más de 15 especies, que pueden ser aisladas de diferentes ambientes, incluyendo vegetación, suelo, agua y animales. *L. monocytogenes* ha sido mundialmente estudiada como un modelo de patogénesis intracelular, lo cual ha permitido descifrar información importante sobre el comportamiento del patógeno, como es el caso de la respuesta a la actividad antibiótica intracelular, transcripción de genes durante la vida intracelular y desarrollo de modelos *in vivo* para el estudio de infecciones. Costa Rica es una de las naciones del mundo más ricas biológicamente siendo de interés para estudios de diversidad genética en organismos. Por lo tanto, la mayoría de los estudios realizados en el país se centran en el aislamiento de *Listeria* spp. para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en muestras de interés, siendo las alimenticias las más analizadas. La poca información genética sobre estas bacterias llevó a que investigadores del Centro de Investigación en Biotecnología del TEC, junto con colaboradores nacionales e internacionales, realizarán el primer estudio sobre la diversidad genética de *Listeria* spp. en Costa Rica. Desde entonces los proyectos de investigación en *Listeria* spp. que se han desarrollado actualmente en el CIB tienen un alcance científico que permiten la comprensión de las bacterias presentes en nuestro ambiente, su potencial patogénico, trazabilidad, control de contaminación y potencial biotecnológico. Asimismo, se pretende mantener y fortalecer las colaboraciones importantes tanto nacionales como internacionales con miras a formar una red orientada a la investigación aplicada al sector de las infecciones alimentarias del país.

## Keywords

*Listeria monocytogenes*; *Listeria costaricensis*; isolation; soils; environment; bacterial communities.

## Abstract

The genus *Listeria* is composed of more than 15 species, which can be isolated from different environments, including vegetation, soil, water and animals. *L. monocytogenes* has been studied worldwide as a model of intracellular pathogenesis, which has allowed deciphering important information on the behavior of the pathogen, such as the response to intracellular antibiotic activity, transcription of genes during intracellular life and development of *in vivo* models for the study of infections. Costa Rica is one of the most biologically rich nations in the world, being of interest for studies of genetic diversity in organisms. Therefore, most studies conducted in the country focus on the isolation of *Listeria* spp. to determine the presence or absence of the microorganism in samples of interest, being the foodstuffs the most analyzed. The little genetic information on these bacteria, led researchers from the Biotechnology Research Center of TEC, together with national and international collaborators, to carry out the first study on the genetic diversity of *Listeria* spp. in Costa Rica. Since then the research projects in *Listeria* spp. that have been developed at the CIB have a scientific scope that allow the understanding of the bacteria present in our environment, their pathogenic potential, traceability, contamination control and biotechnological potential. Likewise, it is intended to maintain and strengthen important national and international collaborations with a view to forming a network oriented to research applied to the sector of food infections in the country.

## Características del género *Listeria*

El género *Listeria* está compuesto por más de 15 especies [1], [2], entre ellas: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. rocourtii*, *L. marthii*, *L. grayi*, *L. flesichmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*, estas dos últimas son conocidas por su patogenicidad en animales y humanos. Se ha demostrado que las especies de *Listeria* spp. pueden ser aisladas de diferentes ambientes, incluyendo vegetación, suelo, agua y animales [1].

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que puede ser aislada de una gran diversidad de ambientes, incluyendo suelos, aguas y alimentos de diversos tipos. *L. monocytogenes* causa graves infecciones, tanto localizadas como generalizadas, en humanos, aves y en gran diversidad de mamíferos [3]. En humanos, se considera un patógeno de transmisión alimentaria que puede causar septicemia, meningitis, encefalitis e infecciones intrauterinas. Estas últimas pueden conducir a abortos espontáneos cuya cantidad varía dependiendo de la población infectada y de la virulencia de las cepas. La enfermedad, por lo general, empieza con síntomas parecidos a los de la gripe aproximadamente horas después de la infección [4]. A pesar de que se trata de un patógeno bien conocido, en la actualidad continúa cobrando cientos de vidas humanas alrededor del mundo [5], y en los últimos años ha habido gran preocupación por el aumento de casos de listeriosis [6].

Además de su importancia clínica, *L. monocytogenes* ha sido mundialmente estudiada como un modelo de patogénesis intracelular, lo cual ha permitido descifrar información importante sobre el comportamiento del patógeno, como es el caso de la respuesta a la actividad antibiótica intracelular, transcripción de genes durante la vida intracelular [7] y desarrollo de modelos *in vivo* para el estudio de infecciones [8]. Desde finales de 1980, los estudios realizados en biología celular combinado con biología molecular y genómica han elucidado la estrategia utilizada por *L. monocytogenes* para ingresar al hospedero, multiplicarse y propagarse entre célula-célula. Estos estudios identificaron y caracterizaron los factores de virulencia involucrados en el ciclo intracelular, además, de los mecanismos de regulación que modulan la virulencia [9]. *L. monocytogenes* se caracteriza por tener una alta heterogeneidad en la virulencia, lo cual se ha identificado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Gran parte de las cepas son naturalmente virulentas y capaces de producir alta mortalidad; en cambio existen otras que son avirulentas e incapaces de establecer una infección dentro del hospedero [10]. Las diferencias en la virulencia entre las cepas de *L. monocytogenes* pueden deberse a polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de estos genes, debido a mutaciones puntuales y/o la presencia o ausencia de algún gen de virulencia [11]. En un sub-grupo de cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al linaje I, se ha identificado la producción de un factor de virulencia adicional conocido como listeriolisina S [LLS], el cual es responsable del aumento de la virulencia en *L. monocytogenes*. LLS se encuentra codificada en una nueva isla de patogenicidad, designada como LIPI-3 y corresponde a una citolisina, que pertenece a la familia de la estreptolisina S [SLS] [12]. Se ha determinado que su presencia está asociada con el aumento de la virulencia de las cepas, lo cual contribuye a la citotoxicidad y a la activación inflamatoria [13]. Además, se ha demostrado que la LLS juega un rol en la sobrevivencia de *L. monocytogenes* y contribuye a su virulencia *in vivo*. LIPI-3 sólo ha sido identificada en algunas cepas del linaje I y muchas de éstas han estado implicadas en brotes de listeriosis; por lo tanto, es necesario distinguir aquellas cepas que son productoras de LLS [12].

En alimentos de origen casero, artesanal y en ferias del agricultor, el porcentaje de productos contaminados con *Listeria* spp. aumenta cuando no se aplican controles de calidad en la manipulación de los alimentos [14]. Por consiguiente, esto incrementa el riesgo de contraer alguna enfermedad provocada por la exposición a alimentos o ambientes con presencia de *L. monocytogenes*. A nivel mundial, la preocupación es creciente respecto al impacto en la

salud pública como consecuencia de las distintas prácticas que se aplican en la enmienda de suelos, sumado a los pocos controles que existen para la valoración de patógenos en suelos cultivables [14], [15]. En muchos países, incluyendo Costa Rica, continúa siendo un reto el aumentar el conocimiento sobre la prevalencia y colonización de patógenos en suelos según las prácticas de explotación realizadas en los terrenos, con miras al establecimiento de controles para asegurar la inocuidad de los productos alimenticios derivados de dichas prácticas; ya que los patógenos bacterianos tienen habilidades que les permiten ser altamente persistentes en suelos, por lo que es difícil identificar cómo y cuáles factores antropogénicos pueden modificar su circulación e incidencia en la biosfera de forma natural [16].

### Impacto de las infecciones transmitidas por alimentos

Las enfermedades debidas al consumo de alimentos contaminados con microorganismos han tenido un gran impacto a lo largo de la historia, tanto en la economía, como en la salud pública alrededor del mundo, la atención principal se ha centrado en las bacterias patógenas como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., encontradas con facilidad en América del Norte; así como *Yersinia*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, que pueden adaptarse y sobrevivir a una gran variedad de ambientes y condiciones [17], [18].

Se estima que sólo en Estados Unidos, 48 millones de personas son víctimas de intoxicaciones alimentarias causadas por patógenos, 128000 terminan hospitalizadas y 3000 mueren anualmente. Entre los 31 patógenos conocidos, que son transmitidos por alimentos, las especies de *Salmonella*, *Toxoplasma*, *Listeria*, y *norovirus* son causantes de la mayor cantidad de muertes; representando *Salmonella typhimurium* un 29%, *Toxoplasma gondii* un 23% y *L. monocytogenes* un 20% del total de muertes [19].

### Estudios previos sobre *Listeria* spp. en Costa Rica

Costa Rica, por ser una de las naciones del mundo más ricas biológicamente, resulta de interés para estudios de diversidad genética en organismos. Este interés aplica para microorganismos procariotas como las bacterias, algunas de ellas estudiadas a fondo por las implicaciones directas con el ser humano. Este es el caso de *Listeria* spp., una bacteria patogénica en humanos y otros vertebrados, cuyo estudio ha permitido entre otros desentrañar los mecanismos celulares y moleculares implicados en los procesos de invasión de parásitos intracelulares humanos.

Particularmente *Listeria* spp. no se encuentra dentro del grupo de bacterias de vigilancia obligatoria por el Ministerio de Salud de Costa Rica. Esto quiere decir que los centros médicos nacionales no se encuentran en la obligación de detectar y reportar cepas de *Listeria* en la población costarricense. Además, con respecto a la elaboración y venta de alimentos, no existe una norma que exija la ausencia de *Listeria* en los productos de consumo nacional, como es el caso de los alimentos de exportación e importación, los cuales deben certificar la ausencia de este grupo de bacterias. Debido a esto, el conocimiento sobre *Listeria* spp. en alimentos, *L. monocytogenes* en casos clínicos y las características genéticas de estas cepas es muy limitado en Costa Rica.

La mayoría de los estudios realizados en el país se centran en el aislamiento de *Listeria* spp. para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en muestras de interés, siendo las alimenticias las más analizadas. En el ámbito clínico solamente existe un reporte de *L. monocytogenes* realizado por Schuchat *et al.*, [20]. El estudio se basó en un brote de listeriosis neonatal en el año 1989, del cual se aisló *L. monocytogenes* de 9 recién nacidos infectados por el uso de aceite mineral contaminado, el cual era utilizado para limpiar a los neonatos después

del nacimiento. Como consecuencia, en Costa Rica se dejó de utilizar el aceite mineral en recién nacidos.

Seguidamente, en 1991 se realizó un análisis para determinar la presencia de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos, encontrándose distintas especies de *Listeria* en queso blanco, helado, pescado, pollo y camarón fresco. Este estudio reveló, por primera vez en Costa Rica, la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos [21]. Posteriormente se han realizado múltiples reportes que indican la presencia de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en todos los tipos de alimentos producidos en el país, incluyendo 14% de presencia en 220 muestras de leche cruda [22], 32% en muestras de 50 ensaladas [23], 65% en muestras de pescado fresco de 67 pescaderías del área metropolitana [24], 12% en 65 muestras de helado [25], presencia en múltiples muestras de leche [26], queso blanco no pasteurizado [27] y pulpas de frutas [28]. Con esto se hace evidente que en Costa Rica existe riesgo de contraer alguna enfermedad provocada por la exposición a alimentos o ambientes con presencia de *L. monocytogenes* [29].

Otros estudios también han descrito la resistencia a ampicilina de 5 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de pacientes, la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense [30] y la optimización de protocolos de reacción en cadena de la polimerasa [PCR] para la identificación de *L. monocytogenes* [31].

Las investigaciones de *Listeria* spp. realizadas en el Centro de Investigación en Biotecnología del TEC corresponden al primer estudio sobre la diversidad genética de *Listeria* spp. en Costa Rica. Los proyectos de investigación en *Listeria* spp. que se han realizado y se desarrollan actualmente en el CIB tienen un alcance científico que permitirá la comprensión de las bacterias presentes en nuestro ambiente, su potencial patogénico, trazabilidad, control de contaminación y potencial biotecnológico.

### **Proyecto “Diversidad de *Listeria* spp. en Costa Rica: Un estudio de la genómica, transcriptómica y patogénesis”: 2015-2016**

Este proyecto surgió ante la necesidad de generar información sobre la diversidad genética de las cepas de *Listeria* spp. en Costa Rica, además de generar alternativas en su identificación y estudio molecular. Bajo la coordinación del MSc. Johnny Peraza y en conjunto con la Ing. Kattia Núñez se formuló un estudio exploratorio para la descripción de la diversidad genética de este género bacteriano en Costa Rica. Además, se contó con la participación de la Dra. Fabiola Jiménez del CEQUIATEC y con la colaboración del Dr. Javier Pizarro Cerdá de la Unidad de Interacción Bacteria-Célula del Instituto Pasteur, París, Francia, centro especializado en el estudio de *L. monocytogenes* como modelo para el estudio de la invasión celular.

Este proyecto contó con financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC y permitió establecer una colección de 182 cepas de *Listeria* spp., registrada ante CONAGEBIO bajo el código R-CM-ITCR-001-2016-OT. Estas cepas fueron aisladas de todas las provincias del país, a partir de muestras alimentarias, ambientales y clínicas. En colaboración con el Instituto Pasteur, en París, Francia, se secuenció el genoma completo de los aislamientos y se realizaron estudios filogenéticos para determinar relaciones genéticas entre los mismos, según distribución geográfica y tipo de muestra, lo cual contribuyó al estudio de la epidemiología de patógenos transmitidos por alimentos en Costa Rica. Adicionalmente, se optimizaron cuatro protocolos para la caracterización e identificación molecular de *Listeria* spp. y se logró aplicar por primera vez la técnica de *Multi-Locus sequence Typing* (MLST) para la genotipificación de cepas costarricenses de *L. monocytogenes*. Por su parte, el análisis genómico permitió determinar que Costa Rica cuenta con una alta frecuencia de cepas de *L. monocytogenes*

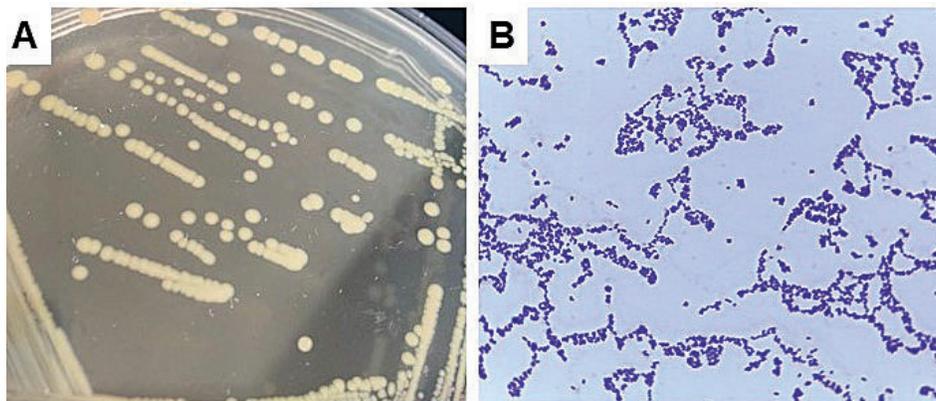
que han sido catalogadas como hipervirulentas. Otro hallazgo importante del proyecto fue el descubrimiento de una nueva especie de *Listeria*, denominada *L. costaricensis*.

### Descubrimiento de la nueva especie *L. costaricensis*

A partir de una muestra de desagüe de una industria alimenticia, se consiguió la obtención de una cepa del género *Listeria* pero sin coincidencias genéticas que la asociaran a alguna de las 17 especies previamente conocidas. Tampoco se consiguió identificar la especie mediante técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), secuenciación de ARN 16S y test de perfil bioquímico. Debido a esto, se procedió con los análisis que confirmaron el descubrimiento de una nueva especie, la cual fue denominada *L. costaricensis*, haciendo honor a la diversidad microbiana que puede tener nuestro país.

El genoma de *L. costaricensis* fue secuenciado y analizado, mostrando que filogenéticamente se encuentra más relacionada a las especies *L. fleishmannii*, *L. floridensis* y *L. aquatica*. Por su parte, las características bioquímicas la ubican cerca de las especies más emparentadas con *L. monocytogenes*, grupo conocido como “*sensu stricto*”.

*L. costaricensis* es una bacteria Gram-positiva, con forma de bacilo. No posee cápsula, ni produce esporas, figura 1b. En medio Brain Heart Infusion (BHI) forma colonias opacas de color amarillo, figura 1a. Su crecimiento óptimo es entre 30 y 37°C, pudiendo crecer desde los 22 a 42°C. Es móvil a 37°C y es negativa para la prueba de catalasa, lo cual la diferencia de las demás especies de *Listeria*. Esta cepa se encuentra depositada en las colecciones mundiales de microorganismos DSMZ – *German Collection for Microorganisms and Cell Cultures GmbH* (Braunschweig, Alemania) y CIP- *Collection of Institut Pasteur* (Paris, Francia).



**Figura 1.** a) Colonias de *L. costaricensis* crecidas en medio BHI (Brain Heart Infusion). b) Tinción de Gram positiva en colonia de *L. costaricensis*, observada en el microscopio óptico en aumento de 100X.

*L. costaricensis* no produce hemólisis y no posee genes de virulencia conocidos, por lo que probablemente no sea un organismo patógeno para el ser humano, pero su estudio puede ayudar a comprender los mecanismos que rigen la supervivencia de otras especies de *Listeria* en el ambiente y permitirá el estudio futuro de potenciales moléculas con actividad antimicrobiana, como la Listeriolisina S descrita recientemente en *Listeria monocytogenes* [32], [33], [34].



## Proyecto “Ecología de *Listeria monocytogenes* en suelos de Costa Rica: Estudio ambiental de un patógeno humano”: 2017-2018

Este proyecto surge con la finalidad de esclarecer los factores bióticos y abióticos que permiten la presencia de *Listeria* spp. en los suelos de Costa Rica, principalmente en suelos agrícolas y ganaderos, con la hipótesis de que estos pueden ser la fuente primaria de contaminación de alimentos con *L. monocytogenes*. La comprensión de los factores ecológicos que rigen la vida y comportamiento de *Listeria* spp. en el ambiente es muy limitada, en comparación a la gran cantidad de información que se conoce sobre la vida del patógeno dentro del organismo hospedero. Un mayor entendimiento de estos factores puede ser de gran importancia para la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos e incluso servir de modelo para otros organismos patógenos cuyo nicho primario es el suelo.

Este proyecto contó además con la participación de la MSc. Olga Rivas, el PhD. Federico Masis y la Ing. Rossy Guillén, además fue financiado por la VIE. Consistió en analizar los factores bióticos y abióticos de suelos donde se ha logrado aislar *Listeria* spp. También permitió continuar con el aislamiento de más cepas, a las que se les secuenció el genoma completo. Con esto se logró ampliar la colección de cepas, así como la base de datos con las secuencias de ADN de sus genomas completos. Asimismo, se pudo correlacionar ciertos factores abióticos que permiten la incidencia de *L. monocytogenes* [resultados pronto a publicarse]. De la misma forma, se están estudiando los metagenomas de las comunidades bacterianas que se encuentran asociadas al género *Listeria* spp. en suelos de los diferentes puntos de muestreo que se analizaron durante este proyecto [resultados pronto a publicarse], para evidenciar también las estructuras microbianas asociadas con la supervivencia, incidencia y circulación de *L. monocytogenes*.

## Proyecto “Estudio del desplazamiento en suelo, virulencia y potencial biotecnológico de cepas de *Listeria* spp. aisladas en Costa Rica”: 2019-2022

Como continuación de las investigaciones anteriores, este año el grupo de investigación propuso el proyecto denominado: “Estudio del desplazamiento en suelo, virulencia y potencial biotecnológico de cepas de *Listeria* spp. aisladas en Costa Rica”.

Uno de los principales problemas que se han identificado, es que los estudios previos en *L. monocytogenes* a nivel global se han enfocado principalmente en comprender la patogénesis de esta bacteria en los mamíferos y la respuesta inmune a la infección bacteriana, dejando de lado las investigaciones que explican cómo esta bacteria sobrevive en el suelo y logra colonizarlo. Se sabe que *L. monocytogenes* se adapta muy bien en el medio ambiente, específicamente en el suelo y la materia vegetal en descomposición, lo que le permite contaminar fácilmente alimentos crudos, procesados y/o elaborados con leche no pasteurizada, e incluso puede sobrevivir varias semanas en algunos alimentos congelados, facilitando el contagio a los humanos. Por este motivo, la presente investigación pretende establecer un modelo para visualizar la movilidad y el transporte de *L. monocytogenes* en suelos, para así comprender mejor sus procesos de colonización y supervivencia. Los resultados obtenidos permitirán generar insumos para aumentar la inocuidad alimentaria en cultivos tratados con enmiendas de suelos. Otro problema que se ha detectado a raíz de los proyectos desarrollados es que actualmente no existe en el país una red de vigilancia epidemiológica para *L. monocytogenes*, ya que no existe información sobre los fenotipos de virulencia ni de resistencia a antibióticos que circulan en Costa Rica. Tampoco hay información sobre el potencial biotecnológico de aislamientos autóctonos no patogénicos, los cuales podrían estar desempeñando un papel clave en la ecología microbiana de suelos en nuestro país. Se busca utilizar la colección de cepas de

*Listeria* spp. del CIB, así como la base de datos con las secuencias de sus genomas, para estudiar la presencia de genes de virulencia y genes de resistencia a antimicrobianos en las cepas patógenas autóctonas, así como la presencia de genes asociados a rutas metabólicas de utilidad biotecnológica en las cepas no patógenas, como por ejemplo la nueva especie *L. costaricensis*. Los resultados obtenidos podrán utilizarse a futuro para justificar una red de vigilancia nacional de *L. monocytogenes* y para plantear nuevas aplicaciones biotecnológicas basadas en el uso de recursos biológicos autóctonos.

## Colaboración nacional e internacional

El proyecto ha contado con importantes colaboraciones a nivel nacional e internacional. En el primer caso, destacan el Centro de Referencia en Bacteriología del INCIENSA, el Centro de Investigación y Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), el Laboratorio de Análisis Microbiológico Suplilab y el Laboratorio de Alimentos de la UCR. A nivel internacional destacan la Unidad de Interacción Bacteria Célula y Centro de Referencia de *Listeria*, ambos del Instituto Pasteur en París, Francia. Además, en el presente proyecto se colaborará con la Universidad de la Frontera en Araucanía, Chile, donde la Ing. Kattia Núñez Montero realiza actualmente sus estudios doctorales. También se contará con la colaboración de la Universidad Cardenal Herrera en Valencia, España. Todo este trabajo colaborativo ha permitido dar un enfoque multidisciplinario a los proyectos, así como un abordaje más integral del tema de estudio.

## Importancia e impacto

Además del aporte científico que nuestros proyectos han generado al conocimiento de *Listeria* spp. en Costa Rica, también se ha fomentado la formación profesional incluyendo la participación de 16 asistentes de investigación, estudiantes de la carrera de ingeniería en biotecnología, el desarrollo de 4 tesis de pregrado, 2 tesis de grado y un proyecto estudiantil. Por último, el proyecto ha impulsado una tesis del programa de Maestría en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción, el cual cuenta con la colaboración del estudiante de posgrado, el Ingeniero en biotecnología Luis Barboza Fallas.

## Conclusiones

Los proyectos de investigación en *Listeria* spp. desarrollados en el CIB tienen un alcance científico que permite la comprensión de las bacterias presentes en nuestro ambiente, su potencial patogénico, trazabilidad, control de contaminación y potencial biotecnológico. A futuro, vislumbramos mantener y fortalecer las colaboraciones con miras a formar una red orientada a la investigación aplicada al sector de las infecciones alimentarias en Costa Rica. También se tiene la expectativa de continuar aplicando tecnologías de vanguardia para generar conocimientos que permitan un mejor control de estos patógenos, así como dar trazabilidad desde su fuente primaria de contaminación. Además, esperamos en un futuro aplicar la experiencia generada al estudio de otras bacterias patógenas y a su control mediante la búsqueda de metabolitos que inhiban su crecimiento.

## Referencias

- [1] B. D. Souders *et al*, "Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, (12), pp. 4420-4433, 2012.
- [2] H. C. den Bakker *et al*, "*Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 64, (6), pp. 1882-1889, 2014.
- [3] J. A. Vázquez-Boland *et al*, "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, (3), pp. 584-640, 2001.
- [4] D. Liu, "Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen," *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, (6), pp. 645-659, 2006.
- [5] S. Alcayaga and B. Hott, "*Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos," *Revista Chilena De Salud Pública*, vol. 12, (3), pp. 188-195, 2008.
- [6] V. Chenal-Francisque *et al*, "Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, (6), pp. 1110, 2011.
- [7] T. Schultze *et al*, "A detailed view of the intracellular transcriptome of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages using RNA-seq," *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, pp. 1199, 2015.
- [8] C. Andersson, J. Gripenland and J. Johansson, "Using the chicken embryo to assess virulence of *Listeria monocytogenes* and to model other microbial infections," *Nature Protocols*, vol. 10, (8), pp. 1155, 2015.
- [9] A. Vera *et al*, "Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación," *Revista Chilena De Infectología*, vol. 30, (4), pp. 407-416, 2013.
- [10] M. Olier *et al*, "Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates," *Microbiology*, vol. 148, (6), pp. 1855-1862, 2002.
- [11] P. Velge and S. M. Roche, "Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence?" *Future Microbiology*, vol. 5, (12), pp. 1799-1821, 2010.
- [12] E. M. Clayton *et al*, "Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S-positive and-negative strains of *Listeria monocytogenes*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, (1), pp. 163-171, 2011.
- [13] V. Nizet *et al*, "Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus," *Infect. Immun.*, vol. 68, (7), pp. 4245-4254, 2000.
- [14] I. L. Pepper *et al*, "Pathogens and indicators in United States Class B biosolids: National and historic distributions," *J. Environ. Qual.*, vol. 39, (6), pp. 2185-2190, 2010.
- [15] T. O. Rahube *et al*, "Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, (22), pp. 6898-6907, 2014.
- [16] A. Vivant, D. Garmyn and P. Piveteau, "*Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 3, pp. 87, 2013.
- [17] M. Gandhi and M. L. Chikindas, "*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 113, (1), pp. 1-15, 2007.
- [18] U. Lyhs *et al*, "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market," *Acta Vet. Scand.*, vol. 54, (1), pp. 64, 2012.
- [19] E. Scallan *et al*, "Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, (1), pp. 7, 2011.
- [20] A. Schuchat *et al*, "Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil." *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 10, (3), pp. 183-189, 1991.
- [21] R. Ellner, D. Utzinger and V. García, "Aislamiento de *Listeria* sp. de diversos alimentos en Costa Rica," *Rev Cost Cienc Med*, vol. 12, pp. 82-86, 1991.
- [22] M. L. Arias *et al*, "Occurrence of the bacteria *Listeria* spp. in raw milk in Costa Rica," *Revista De Biología Tropical*, pp. 711-713, 1994.
- [23] R. Monge and M. L. Arias-Echandi, "*Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables." *Rev Biomed*, vol. 10, pp. 29-31, 1999.
- [24] M. Bianchini *et al*, "*Listeria monocytogenes* incidence and evaluation of the sanitary quality of filleted fresh fish from the Metropolitan Area of San José," *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 49, (4), pp. 358-362, 1999.

- [25] P. Windrantz and M. L. Arias, "Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica," *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 50, (3), pp. 301-303, 2000.
- [26] A. Reuben *et al*, "Presencia de Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes y Salmonella spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica." *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 53, (4), pp. 389-392, 2003.
- [27] C. Cháves and M. L. Arias, "Caracterización de cepas de Listeria monocytogenes realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses," *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, vol. 59, (1), pp. 66-70, 2009.
- [28] J. von Breymann, C. Chaves and M. L. Arias, "Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de Listeria monocytogenes en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses," *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, vol. 63, (1), pp. 53-57, 2013.
- [29] G. Kopper, G. C. Calderon and G. Gutierrez, "No title," *Enfermedades Transmitidas Por Alimentos Y Su Impacto socioeconómico Estudios De Caso En Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras Y Nicaragua*, 2009.
- [30] G. Carrillo Zeledón, M. Redondo Solano and M. L. Arias Echandi, "Capacidad de formación de biopelículas de cepas de Listeria monocytogenes aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense," *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, vol. 60, (2), pp. 175-178, 2010.
- [31] M. L. Arias, C. Chaves and G. Solano, "Evaluación de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección e identificación de Listeria monocytogenes en queso fresco proveniente del Área Metropolitana de San José, Costa Rica," *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, vol. 60, (4), pp. 391-396, 2010.
- [32] P. D. Cotter *et al*, "Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I Listeria monocytogenes," *PLoS Pathogens*, vol. 4, (9), pp. e1000144, 2008.
- [33] J. J. Quereda *et al*, "Bacteriocin from epidemic Listeria strains alters the host intestinal microbiota to favor infection," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, (20), pp. 5706-5711, 2016.
- [34] J. J. Quereda *et al*, "Listeriolysin S is a streptolysin S-like virulence factor that targets exclusively prokaryotic cells in vivo," *MBio*, vol. 8, (2), pp. 259, 2017.

# Los insectos y la biotecnología: avispa social como fuente de nuevos compuestos antibióticos

## Insects and biotechnology: social wasps as a source for novel antibiotic compounds

Laura Chavarría-Pizarro<sup>1</sup>

---

Chavarría-Pizarro, L. Los insectos y la biotecnología: avispa social como fuente de nuevos compuestos antibióticos. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 114-120.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4639>

1 PhD en Entomología, profesora e investigadora de la Escuela de Biología y Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
Correo electrónico: [laura.chavarria@tec.ac.cr](mailto:laura.chavarria@tec.ac.cr).  
 <https://orcid.org/0000-0002-7630-1104>



## Palabras clave

Avispas sociales; celdas de cría; cutícula; actinobacterias; antibióticos.

## Resumen

Los insectos son un grupo de organismos indispensables en los ecosistemas naturales y en aquellos modificados por el hombre como los cultivos y las ciudades. Estos organismos han sido estudiados desde hace mucho tiempo; sin embargo, con el surgimiento de áreas como la biotecnología, el enfoque que se le ha dado a los estudios con insectos está cambiando. Un caso es el de los insectos sociales, organismos que están siendo investigados debido a las relaciones simbióticas que mantienen con microorganismos productores de sustancias antimicrobianas. Es por este motivo que en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se están realizando dos estudios para determinar la presencia de actinobacterias en colonias de avispas sociales, y probar su actividad antibiótica. Se aislaron 49 cepas de microorganismos con morfología de actinomicetos de las celdas de cría, y la actividad antibiótica se midió en 45 cepas de las cuales 36 (80%) mostraron actividad positiva contra patógenos. Otro proyecto pretende aislar microorganismos de las glándulas y cutícula de los adultos de avispas, al ser éstos posiblemente los que dispersan las sustancias antibióticas por la colonia. Los resultados obtenidos demuestran que las avispas Epiponini sí mantienen relaciones simbióticas con actinomicetos, y que algunas cepas presentan actividad antibiótica. Esto demuestra que estos organismos tienen un gran potencial para el desarrollo de investigaciones biotecnológicas.

## Keywords

Social wasps; breed cells; cuticle; actinobacteria; antibiotics.

## Abstract

Insects are key organisms on natural and artificial ecosystems like cities and crops; for this reason, insects have been studied for a long time. Nevertheless, with the emergence of biotechnology, insect research is changing. Social insects for example, are of special interesting because of the symbiotic relationship they maintain with microorganisms to produce antibiotics to protect their colonies. In consequence two studies have been developed at the Biotechnology Research Center (CIB) of Costa Rica Institute of Technology (ITCR), to determine if social wasps establish symbiotic relationships with actinobacteria and to test their antibiotic activity. We isolated 49 actinomycete morphotype strains from breeding cells, antibiotic activity was test in 45 strains and 80% (N=36) were effective against pathogens. Another research aims to isolate actinobacteria from the salivary glands and cuticle of adults, because according to behavior observations, these individuals could spread antibiotic compounds in the nest. Preliminary results demonstrate that Epiponini wasps establish symbiotic relationships with actinomycetes, and strains could have antibiotic activity against human pathogens. These results demonstrate that social wasps could be used to develop innovative biotechnological research.

## Introducción

Los insectos son los organismos más diversos, representan aproximadamente dos tercios del total de especies que hay en el planeta [1]; en términos de biomasa son los animales más abundantes también [2]. Su diversidad y abundancia se debe a la gran capacidad adaptativa

que han desarrollado, ya que pueden vivir bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad y luz, lo que ha permitido la colonización de una gran variedad de hábitats (con excepción de la Antártida). Además, tienen diversos tipos de dieta, algunos son saprófagos, detritívoros, herbívoros, carnívoros, entre otros.

Al ser los insectos organismos clave en los ecosistemas, las poblaciones humanas dependemos de muchas de las actividades que realizan, tales como polinización, dispersión de semillas, y la descomposición y reciclaje de nutrientes; además, muchas especies mantienen bajo control otras poblaciones de insectos, y también son fuente de alimento para otras especies de animales. Adicionalmente, las poblaciones humanas han domesticado algunos grupos de insectos para su beneficio, como es el caso de las abejas para la producción de miel y sus derivados, los gusanos de seda, así como una gran cantidad de especies que son utilizadas como fuente de alimento para animales domésticos y humanos [3]. Unas pocas especies también tienen importancia debido a sus efectos negativos en las actividades agrícolas y como transmisores de enfermedades.

Es por estas razones que los científicos han estudiado los insectos desde hace muchos años, sin embargo, con el surgimiento de áreas como la biotecnología, el enfoque que se le ha dado a los estudios ha ido cambiando por las múltiples aplicaciones que estos organismos tienen. Por ejemplo, en el campo de la agricultura se han aislado compuestos antimicrobianos de los insectos para proteger cultivos, y se ha aplicado la tecnología del ARN de interferencia y organismos transgénicos para combatir insectos plaga [4], [5]. En biomedicina, los insectos están siendo utilizados como organismos modelo para evaluar diferentes infecciones y sus tratamiento [6], [7], así como en la obtención de compuestos antibióticos, producidos por los mismos insectos o por los microorganismos asociados a ellos [8], [9], [10].

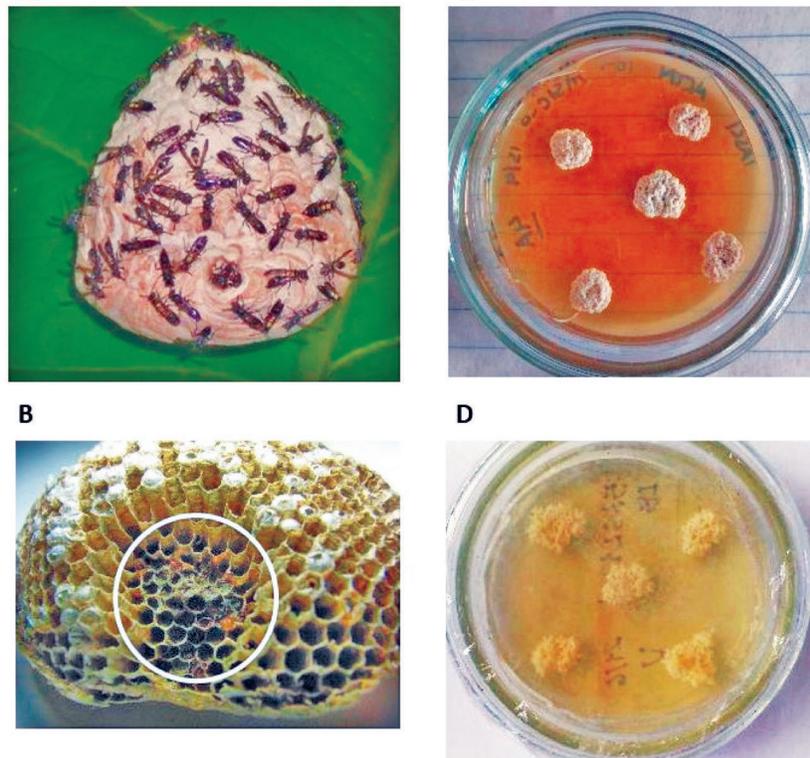
Hay grupos que tienen un gran potencial para la obtención de compuestos antimicrobianos, como los insectos sociales (abejas, hormigas, avispas y termitas), ya que se caracterizan por vivir en colonias bajo condiciones que favorecen el desarrollo de microorganismos infecciosos. Por ejemplo, estos insectos comparten un espacio común (nido) con miles de individuos en donde se mantiene una temperatura y humedad confortable, y también se da la acumulación de desechos. Además los individuos tienen un alto grado de parentesco [11] lo que significa una menor variabilidad genética, y mayor probabilidad de transmisión de enfermedades. Para mantener las colonias libres de parásitos, los insectos sociales han desarrollado estrategias para conservar los nidos limpios, incluyendo comportamientos para controlar y eliminar los parásitos, así como el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos que producen sustancias antimicrobianas [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21].

Debido a la relevancia de los insectos para las poblaciones humanas y los ecosistemas, en el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR se realizan estudios sobre el potencial de los microorganismos asociados a los insectos para producir sustancias antibióticas, y determinar su actividad contra diferentes patógenos. A continuación, se muestran algunos de los resultados obtenidos en las investigaciones.

### **Actinomicetos asociados a nidos y adultos de avispas**

El proyecto de investigación “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a nidos de avispas sociales” que se desarrolla en el CIB en conjunto con el CENIBiot, tiene como objetivo aislar microorganismos de las celdas de cría de los nidos para determinar si las avispas establecen relaciones simbióticas con actinobacterias y determinar su actividad antimicrobiana. Los actinomicetos son un grupo de microorganismos con un gran valor económico y científico debido a que muchas especies producen sustancias antibióticas.

Dentro de los insectos sociales, se decidió trabajar con avispas de la tribu Epiponini (figura 1), ya que tienen un gran potencial para realizar estudios exploratorios sobre la presencia de actinobacterias, debido a que en las celdas de cría se acumulan desechos fecales (meconia) producidos por las larvas (figura 1). Como hay reutilización de celdas, los organismos inmaduros (huevo, larvas y pupas) se desarrollan por encima de los desechos dejados por larvas que ocuparon previamente la celda. Dado que el meconia es un sustrato ideal para el desarrollo de parásitos, debería secretarse o producirse algún tipo de sustancia antimicrobiana para evitar infecciones en los inmaduros.



**Figura 1.** Nido de avispas Epiponini del género *Polybia* (A). Panal de un nido de avispas con detalle de meconia en círculo (B). Actinomicetos aislados de los nidos de los géneros *Pseudonocardia* (C) y *Streptomyces* (D).

Por estos motivos, se aislaron actinobacterias de las celdas de cría de nidos de los siguientes géneros: *Parachartergus*, *Chartergellus*, *Metapolybia*, *Polybia* y *Protopolybia*, las muestras se colectaron en tres regiones: Pacífico Norte (Santa Cruz, Guanacaste), Valle Central (Cartago) y Pacífico Sur (Golfito, Puntarenas). Se aislaron 49 morfotipos de cepas de actinomicetos, hasta el momento 28 cepas han sido confirmadas molecularmente, mediante extracción del ADN genómico [22] y amplificación del gen ARNr 16S utilizando los imprimadores 27F y 1492R. Las pruebas de actividad antibiótica se realizaron en 40 cepas, de las cuales el 75% presentó actividad antimicrobiana positiva inhibiendo el crecimiento de alguna de las siguientes cepas patógenas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, y *Bacillus thuringensis* (cuadro 1). Los resultados obtenidos demuestran que las avispas Epiponini mantienen relaciones simbióticas con actinobacterias, y que la mayor parte de las cepas aisladas presentan actividad antibiótica.

**Cuadro 1.** Actividad antibiótica (muy alta, alta, media y baja) contra cuatro microorganismos patógenos (*B. thuringensis*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus*) de las cepas de actinobacterias aisladas de los nidos de las avispas sociales.

Cepa Actinobacteria	<i>B. thuringensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Nocardopsis</i> (A)	Alta		Baja	
<i>Streptomyces</i> (R)			Baja	
<i>Pseudonocardia</i> (2W)	Alta	Media		
<i>Amycolaptosis</i> (2Y)	Muy Alta	Alta		
2Z	Alta	Alta		Baja
<i>Pseudonocardia</i> (3C)	Alta	Baja		
<i>Amycolaptosis</i> (3E)	Alta	Media		
3F	Muy Alta	Media		Baja
3G	Alta	Baja		
<i>Amycolaptosis</i> (3J)	Alta	Baja		
<i>Pseudonocardia</i> (3O)	Alta	Baja		
3P	Alta	Alta		
3Q	Alta	Media		
<i>Pseudonocardia</i> (3V)	Media	Media		
3W	Alta	Media		
<i>Streptomyces</i> (3Y)	Alta	Baja		
<i>Pseudonocardia</i> (4A)	Alta	Baja		
4D	Baja	Alta		
<i>Streptomyces</i> (4E)	Alta			
<i>Amycolaptosis</i> (4J)	Alta			
<i>Amycolaptosis</i> (4K)	Alta	Baja		
4O	Baja			
<i>Saccharopolyspora</i> (4R)	Alta	Media		
<i>Pseudonocardia</i> (4S)	Alta			
<i>Kocuria</i> (4U)	Alta	Media		
<i>Kocuria</i> (4V)	Media	Media		
<i>Kocuria</i> (5A)	Media	Media		
5B	Alta	Alta		
5D	Alta	Media		
5F	Media	Baja		

También es importante determinar si las asociaciones se establecen entre los microorganismos y los estadios inmaduros, o con los adultos. Tomando en cuenta las observaciones que se han realizado sobre el comportamiento de los individuos dentro de las colonias, se sabe que, cuando un nuevo adulto completamente desarrollado abandona la celda, las obreras permanecen aproximadamente media hora insertando y sacando la cabeza de la misma [23], [24], [25]. Hasta el momento, no se ha logrado determinar exactamente qué es lo que hacen las obreras en las celdas, pero se cree que podrían estar esterilizando para evitar la propagación

de microorganismos patógenos desde el meconia acumulado hacia el resto del nido. Estas observaciones indican que probablemente los microorganismos productores de antibióticos establecen asociaciones con los adultos quienes son los encargados de limpiar las celdas y el nido en general. Por estos motivos, un nuevo proyecto titulado “Evaluación de microorganismos con actividad antimicrobiana asociados a adultos de avispas sociales (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini)” tiene como objetivo buscar actinobacterias en órganos y glándulas asociadas a las mandíbulas de los adultos, así como en la cutícula. Este proyecto permitiría comprender dónde se produce la asociación de los microorganismos con las avispas, y también permitiría realizar una mayor cantidad de aislamientos para obtener nuevas cepas y realizar pruebas adicionales sobre la actividad antimicrobiana, para pasar a la siguiente etapa del proyecto, donde se caracterizarían los metabolitos antibióticos. Cuando se obtenga la caracterización de metabolitos, se pretende formar un grupo de trabajo para determinar el uso que se le podría dar a estos compuestos, y la forma como se transmitiría este conocimiento a la sociedad.

## Conclusión

Los insectos son organismos que tienen un gran potencial para realizar estudios biotecnológicos. Esto se ha demostrado en los estudios que se están desarrollando en el Centro de Investigación en Biotecnología, donde se encontraron varias cepas de actinobacterias asociadas a las celdas de cría de los nidos de diferentes especies de avispas sociales. Estas cepas presentaron un alto porcentaje (80%) de actividad antibiótica contra el crecimiento de patógenos de humanos y de insectos, lo que demuestra que este grupo que no ha sido tan estudiado como las hormigas y las abejas, tiene un gran potencial para encontrar nuevos antibióticos. Los resultados obtenidos son muy prometedores debido al problema de la resistencia que un creciente número de microorganismos patógenos está desarrollando contra los medicamentos tradicionalmente utilizados. Por estos motivos, esperamos continuar realizando este tipo de investigaciones utilizando otras especies de avispas e insectos, para caracterizar los metabolitos que puedan estar produciendo los microorganismos con actividad antimicrobiana y los mismos insectos, y realizar pruebas contra otros patógenos de humanos, y de animales y plantas de producción.

## Referencias

- [1] F. Sánchez-Bayo y K. A. G. Wyckhuys, «Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers», *Biol. Conserv.*, vol. 232, pp. 8-27, abr. 2019.
- [2] B. Hölldobler, F. P. of B. B. Holldobler, H. C. in E. and U. R. P. E. E. O. Wilson, y E. O. Wilson, *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. W.W. Norton, 2009.
- [3] A. van Huis, Ed., *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- [4] C. Jansen y K.-H. Kogel, «Insect Antimicrobial Peptides as New Weapons Against Plant Pathogens», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 123-144.
- [5] J. A. Gatehouse y D. R. G. Price, «Protection of Crops Against Insect Pests Using RNA Interference», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 145-168.
- [6] K. Mukherjee, E. Domann y T. Hain, «The greater wax moth *Galleria mellonella* as an alternative model host for human pathogens», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 3-14.
- [7] T. Roeder, K. Isermann, C. Wagner, y C. Warmbold, «Fruit Flies as Models in Biomedical Research – A *Drosophila* Asthma Model», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 15-27.
- [8] H. B. Bode, «Insect-Associated Microorganisms as a Source for Novel Secondary Metabolites with Therapeutic Potential», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 77-93.



- [9] K. Dettner, «Potential Pharmaceuticals from Insects and Their Co-Occurring Microorganisms», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 95-119.
- [10] J. Wiesner y A. Vilcinskas, «Therapeutic potential of antimicrobial peptides from insects», en *Insect Biotechnology*, A. Vilcinskas, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, pp. 29-65.
- [11] M. D. Hastings, D. C. Queller, F. Eischen, y J. E. Strassmann, «Kin selection, relatedness, and worker control of reproduction in a large-colony epiponine wasp, *Brachygastra mellifica*», *Behav. Ecol.*, vol. 9, n.º 6, pp. 573-581, ene. 1998.
- [12] C. R. Currie, J. A. Scott, R. C. Summerbell, y D. Malloch, «Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites», *Nature*, vol. 398, n.º 6729, pp. 701-704, abr. 1999.
- [13] A. V. Santos, R. J. Dillon, V. M. Dillon, S. E. Reynolds, y R. I. Samuels, «Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 239, n.º 2, pp. 319-323, oct. 2004.
- [14] M. Kaltenpoth *et al.*, «*Candidatus Streptomyces philanthi*, an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus* digger wasps», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, n.º 6, pp. 1403-1411, 2006.
- [15] M. Poulsen, W. O. H. Hughes, y J. J. Boomsma, «Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*», *Insectes Sociaux*, vol. 53, n.º 3, pp. 349-355, ago. 2006.
- [16] A. Stow y A. Beattie, «Chemical and genetic defenses against disease in insect societies», *Brain. Behav. Immun.*, vol. 22, n.º 7, pp. 1009-1013, oct. 2008.
- [17] J. Kroiss *et al.*, «Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring», *Nat. Chem. Biol.*, vol. 6, p. 261, feb. 2010.
- [18] P. Graystock y W. O. H. Hughes, «Disease resistance in a weaver ant, *Polyrhachis dives*, and the role of antibiotic-producing glands», *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 65, n.º 12, pp. 2319-2327, dic. 2011.
- [19] A. A. Madden, A. Grassetti, J.-A. N. Soriano, y P. T. Starks, «Actinomycetes with Antimicrobial Activity Isolated from Paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) Nests», *Environ. Entomol.*, vol. 42, n.º 4, pp. 703-710, ago. 2013.
- [20] C. Tranter, P. Graystock, C. Shaw, J. F. S. Lopes, y W. O. H. Hughes, «Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics», *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 68, n.º 3, pp. 499-507, mar. 2014.
- [21] B. Matarrita-Carranza, R. D. Moreira-Soto, C. Murillo-Cruz, M. Mora, C. R. Currie, y A. A. Pinto-Tomas, «Evidence for Widespread Associations between Neotropical Hymenopteran Insects and Actinobacteria», *Front. Microbiol.*, vol. 8, 2017.
- [22] J. Chun y M. Goodfellow, «A Phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardia* with 16S rRNA Gene Sequences», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 45, n.º 2, pp. 240-245, 1995.
- [23] M. V. Baio, F. B. Noll, y R. Zucchi, «Shape differences rather than size differences between castes in the Neotropical swarm-founding wasp *Metapolybia docilis* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini)», *BMC Evol. Biol.*, vol. 3, n.º 1, p. 10, may 2003.
- [24] F. S. Nascimento, I. C. Tannure-Nascimento, y R. Zucchi, «Behavioral mediators of cyclical oligogyny in the Amazonian swarm-founding wasp *Asteloea ujhelyii* (Vespidae, Polistinae, Epiponini)», *Insectes Sociaux*, vol. 51, n.º 1, pp. 17-23, feb. 2004.
- [25] L. Chavarría-Pizarro y M. J. West-Eberhard, «The behavior and natural history of *Chartergellus*, a little-known genus of neotropical social wasps (Vespidae Polistinae Epiponini)», *Ethol. Ecol. Evol.*, vol. 22, n.º 4, pp. 317-343, nov. 2010.

# Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la producción agrícola

## Biocontrol Laboratory: Research linked to agricultural production

William Rivera-Méndez<sup>1</sup>, Jaime Brenes-Madriz<sup>2</sup>, Claudia Zúñiga-Vega<sup>3</sup>

---

Rivera-Méndez, W; Brenes-Madriz, J; Zúñiga-Vega, C.  
Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la  
producción agrícola. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019.  
25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología.  
Pág 121-125.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4640>



- 1 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0002-2065-6264>
- 2 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0003-2325-8808>
- 3 Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0001-7267-6788>

## Palabras clave

Biocontrol; bio-insumos; comunidades del suelo; mezclas de microorganismos; *Trichoderma*.

## Resumen

El Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica ha trabajado durante la última década en el uso de microorganismos nativos y el desarrollo de bio-insumos a partir de estos, para la regulación de poblaciones de insectos y microorganismos patógenos de plantas.

El control biológico se enfoca hacia la forma en que las comunidades de organismos alrededor de las plantas afectan las interrelaciones que ocurren. La investigación está centrada en la prospección de nuevas especies, el análisis de la composición de las comunidades de microorganismos en la rizósfera y la filósfera, la comunicación microorganismo-planta, la activación de la resistencia sistémica en las plantas por inducción con organismos benéficos y el desarrollo de formulaciones novedosas.

La transferencia de resultados a los agricultores es un factor fundamental que permite el intercambio de conocimientos generados para que sean incorporados por muchos agricultores. La capacitación de técnicos y extensionistas es también importante, ya que son ellos los que día a día están en contacto con los agricultores y les pueden recomendar otras técnicas de control de plagas y enfermedades. La vinculación con empresas es otro punto que ha permitido el desarrollo de investigaciones contratadas y una serie de servicios de diagnóstico y soporte al sector privado. La diversidad de las actividades realizadas ha permitido al laboratorio consolidarse como un aliado del sector agrícola y de la industria local de producción de bio-insumos.

## Keywords

Biocontrol; bioinputs; soil communities; microorganisms mix; *Trichoderma*.

## Abstract

The Biological Control Laboratory of the Biotechnology Research Center has worked intensively -in the last decade- in the use of native microorganisms and the development of bio-inputs for population control of insects and plant pathogens. The concept of biological control has evolved and currently focuses in the way in which communities of organisms around plants affect the interrelationships that occur, and how this is reflected, at a biochemical and molecular level, in survival mechanisms exhibited by each species.

The research of the Laboratory focuses on the prospecting of new species, analysis of microorganism communities composition in rhizosphere and phylosphere, the microorganism-plant communication, activation of systemic resistance in plants by induction with organisms beneficial and development of novel formulations.

Transferring of results to farmers is a key factor that allows generated knowledge to be incorporated by many farmers, especially for production of garlic and onion. Training of technicians and extensionists is also important. The link with companies is another point that has allowed development of contracted research and a series of diagnostic services and support for private sector. The diversity of activities carried out has allowed the laboratory to consolidate itself as an ally of the agricultural sector and local industry for production of bio-inputs.

## ¿Qué es Biocontrol o control biológico de plagas y enfermedades agrícolas?

El control biológico es una parte importante de una estrategia de manejo integrado en los cultivos. Existen varias definiciones, pero se puede explicar como la reducción de las poblaciones de plagas y enfermedades por enemigos naturales y que actualmente involucra la intervención del ser humano [1]. En los inicios de la aplicación del control biológico o etapa clásica, la estrategia consistía básicamente en la introducción de enemigos naturales. Posteriormente, en lo que se denominó la etapa de conservación, además de incorporar los enemigos naturales se modificaba el ambiente para beneficiar al biocontrolador. Actualmente se habla de una estrategia de aumentación, donde lo que se busca es agregar biocontroladores para aumentar su población.

### Mecanismos de biocontrol

Existen diferentes formas de actuar de estos organismos, pero todas destinadas a limitar el desarrollo del patógeno. Los principales mecanismos antagonistas son:

- La competencia por el oxígeno, los nutrientes y el espacio que ocupan en el suelo.
- El parasitismo, que se basa en la capacidad que tienen para producir secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares, que provocan la desintegración y la muerte de los fitopatógenos que habitan en el suelo.
- La capacidad de funcionar como un antibiótico, cuando libera sustancias que matan al patógeno.
- La inducción de resistencia a enfermedades en los cultivos, basados en la activación de las respuestas de defensa de las plantas.
- La promoción del crecimiento vegetal.
- La presión mecánica que ejercen por su crecimiento rápido, que les permite colonizar primero los espacios donde se desarrollarían los patógenos y competir eficientemente eliminando a otros hongos.

En teoría, todos los patógenos e insectos pueden combatirse con biocontroladores, esto si se trata de un ecosistema en equilibrio, donde cada ser vivo posee enemigos naturales, que son los encargados de mantener sus poblaciones bajo control.

En el comercio se pueden encontrar diferentes tipos de biocontroladores:

- Bio bactericidas, que afectan bacterias.
- Bio fungicidas, que afectan hongos.
- Bio nematocidas, que afectan nematodos.
- Bio insecticidas, que afectan insectos.
- Otros biocontroladores como bacteriófagos, micovirus y baculovirus controlan bacterias, hongos o insectos respectivamente.

### Investigación en el uso de microorganismos

El trabajo está enfocado en diferentes frentes de investigación, sobre todo en la prospección de nuevos microorganismos, la descripción de sus mecanismos de control biológico, el análisis de la composición y funcionamiento de las comunidades rizosféricas de diversos agro-ecosistemas, la aplicación de mezclas de microorganismos para remodelar la rizósfera

y cambiar el funcionamiento del suelo y el control de plagas y enfermedades con biomasa y metabolitos microbianos.

La prospección es sumamente valiosa para encontrar nuevos organismos que tengan capacidades útiles para establecer prácticas sostenibles en la producción agropecuaria. Una de las mayores riquezas que tiene Costa Rica como país tropical es la enorme biodiversidad. En este laboratorio se trata de aprovechar las capacidades metabólicas de los hongos y las bacterias que se encuentran asociados a cultivos, sobre todo en el área de la rizósfera y la filósfera.

Como cultivos modelo se ha trabajado ya cerca de 10 años con ajo y cebolla, y más recientemente con chile dulce y tomate. Se utilizan diversos microorganismos dentro de los que se destacan varias especies de los géneros *Trichoderma*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Metarhizium*, *Purpureocillium*, *Pochonia*, *Beauveria*, etc. De estos se aprovechan no sólo la biomasa (micelio, conidios, células libres), sino también metabolitos secundarios y proteínas [2,3].

De cada uno de esos microorganismos se describe sus mecanismos para el combate biológico, lo que implica el uso de análisis microbiológicos, genéticos, bioquímicos y metagenómicos. Los resultados de estos análisis son la base de las recomendaciones para el uso de un determinado microorganismo y en qué momento del cultivo utilizarlo.

Las pruebas realizadas *in vitro*, generalmente dan paso a la experimentación en invernadero y finalmente en parcelas de campo propiedad de agricultores que se involucran en los proyectos. De esta forma se determina la mejor forma de utilizar un microorganismo en un cultivo. Esto incluye determinar la vía óptima de aplicación, la edad fenológica o productiva del cultivo en que se deben hacer las aplicaciones, la composición adecuada de una mezcla de microorganismos, la compatibilidad con otros insumos agrícolas, la formulación adecuada de las mezclas y la manera de medir los efectos de un bio-insumo.

Las investigaciones recientes se enfocan en el uso de microorganismos para promover la resistencia sistémica de la planta, el aumento en el rendimiento de los cultivos por medio de la incorporación de microorganismos en las raíces de almácigos y en las semillas, y en la re-ingeniería de las comunidades de microorganismos del suelo a fin de establecer ambientes con menor presencia de patógenos y mayor capacidad productiva.

## Extensión para agricultores y asociación con empresas

Dentro de los proyectos de investigación que se han desarrollado en el Laboratorio de Biocontrol, se ha contado con el apoyo de agricultores de la zona norte de Cartago (Llano Grande, Tierra Blanca, Cot y Pacayas), los cuales han facilitado sus cultivos de cebolla o ajo para los distintos ensayos de evaluación de los microorganismos [4]. A los agricultores se les capacita en el manejo y uso de los distintos microorganismos, ventajas de su utilización, cómo aplicarlos, con qué productos se pueden combinar y cómo almacenarlos. Además, en los proyectos se les hace entrega de paquetes de microorganismos para su utilización en sus cultivos. Con la participación de las distintas oficinas Ministerio de Agricultura y Ganadería (del MAG) ubicadas en cada región productora, se realizan charlas de capacitación a asociaciones de agricultores, en donde se les habla de las ventajas de la utilización de microorganismos y cómo estos van a mejorar las propiedades del suelo.

Cuando se establecen los ensayos en las parcelas, se le da un seguimiento desde la etapa de almacigo hasta la producción, para poder demostrarles que la aplicación de microorganismos va a beneficiar el cultivo, ya sea por un incremento en la producción o porque se dio un buen desarrollo del cultivo, sin la aplicación de los funguicidas que ellos suelen utilizar.

El Laboratorio de Biocontrol también realiza investigaciones para empresas. Esta vinculación se da por medio de la venta de servicios, que pueden ser investigaciones contratadas, charlas de capacitación para técnicos o ingenieros o análisis de muestras de suelo para determinar la presencia de microorganismos benéficos o patógenos. Además, se invita o recibe a gerentes de investigación de empresas agrícolas, para enseñarles la capacidad y servicios que se pueden ofrecer y capacitarlos en los nuevos avances del Biocontrol.

## Una mirada hacia el futuro

El control biológico de plagas y enfermedades agrícolas en nuestro país ha ganado bastante terreno durante las últimas dos décadas. Si bien se inició como experiencias de investigación y programas de Universidades, actualmente existen varias empresas productoras, importadoras y distribuidoras de bio-insumos [5]. Hemos realizado cálculos basados en conversaciones con representantes de algunas de las empresas y estimamos que hay un mercado que ronda los \$5 millones de dólares/año de ventas solo de bio-insumos de producción local semi-artesanal y artesanal con productos registrados ante el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Este estimado sería mucho mayor si se incluyeran las ventas productos fabricados fuera del país y los productos no registrados que se consiguen en muchas zonas rurales.

La vinculación del laboratorio para dar servicios de diagnóstico, análisis y soporte a investigaciones de empresas, grupos de productores y agricultores independientes también es un eje central que se verá fortalecido con el desarrollo de nuevas tecnologías y procesos. La investigación que estamos desarrollando apoya la creación de nuevos insumos, sobre todo con la introducción de nuevas formulaciones, el uso de metabolitos secundarios y fracciones de proteínas purificadas y estabilizadas para su aplicación en los cultivos, la incorporación de conidios en micropartículas y la estimulación de las defensas vegetales.

De la misma forma en que el concepto de control biológico y sus tendencias han ido cambiando a lo largo del tiempo, el quehacer del Laboratorio de Biocontrol se ha ido adaptando para poder apoyar con firmeza la producción agrícola nacional y sobre todo, el trabajo de los agricultores y consumidores que merecen un ambiente más seguro, saludable y sostenible.

## Referencias

- [1] A. E. Hajek, J. Eilenberg, Natural enemies: an introduction to biological control. Cambridge, USA. University Press, 2018.
- [2] K. Astorga-Quirós, K. Meneses-Montero, C. Zúñiga-Vega, J. Brenes-Madriz, W. Rivera-Méndez, "Evaluation of antagonism of *Trichoderma sp.* and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens", Revista Tecnología en Marcha, vol 27, no 2, pp. 79-86. 2019.
- [3] J. Brenes-Madriz, C. Zúñiga-Vega, M. Villalobos-Araya, C. Zúñiga-Poveda and W. Rivera-Méndez, "Efectos de *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum*) variedad Nathalie en ambientes protegidos", Revista Tecnología en Marcha, pp. 79-86. 2019.
- [4] DiCYT, "Aplican técnicas biotecnológicas en el cultivo del ajo", *Dicyt.com*, 2019. [Online]. Available: <http://www.dicyt.com/noticias/aplican-tecnicas-biotecnologicas-en-el-cultivo-del-ajo>. [Accessed: 21- Aug- 2019].
- [5] W. Rivera-Méndez, "Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centro-americana", Revista Tecnología en Marcha, vol especial, pp. 31-40. 2016.