

Dmitri Mendeléiev y la tabla periódica de los elementos

Beatriz S. Méndez

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

bea@qb.fcen.uba.ar



Obra de Iván Kramskoi

Dmitri Ivanovich Mendeléiev nació el 8 de febrero de 1834 en la entonces capital de Siberia y murió en San Petersburgo, el 2 de febrero de 1907. Miembro de una familia numerosa ya de pequeño se destacaba por su éxito en los estudios. **Su madre, María Dmitrievna Mendeléieva, fue determinante en su formación.** El padre quedó ciego el año de su nacimiento y en consecuencia la familia pasó a depender económicamente de la actividad de la madre como empresaria, ya que se hizo cargo de la dirección de una fábrica de productos de vidrio y elementos farmacéuticos. Cuando Dmitri terminó el bachillerato en 1849, ya muerto el padre, María Dmitrievna, consciente como nadie de la capacidad de su hijo, decidió trasladar su familia (ahora reducida a dos hijos) desde Siberia a Moscú de manera que el joven pudiese seguir una carrera universitaria. Evidentemente ambas regiones no estaban conectadas por ferrocarril y el viaje se realizó a caballo, ya fuese sobre los animales o en carruajes tirados por ellos. La universidad de Moscú solo recibía a moscovitas, y sufrió un rechazo similar en la de San Petersburgo. Sin embargo, por consejo de su madre, se inscribió en la Escuela Superior del Magisterio, dependiente de dicha universidad, en la cual cursó estudios de Física y de Matemática, el comienzo de su carrera científica.¹

La trayectoria de Mendeléiev en la universidad de San Petersburgo comienza en 1857 con un cargo como docente adjunto para la enseñanza de química y finaliza en 1890 cuando se retiró con el cargo máximo de profesor. Realizó una estadía en Heidelberg en los laboratorios de Kirchhoff y de Bunsen llevando a cabo al mismo tiempo investigaciones de su autoría. Las mismas trataron sobre los fenómenos de la capilaridad a la que relacionó con la cohesión entre las moléculas y dieron lugar a publicaciones que influenciaron, aunque no fueron reconocidas como tales, los trabajos de Andrew sobre capilaridad y composición química. Durante su estadía en Heidelberg aprendió las técnicas del análisis espectral que luego aplicó en Petersburgo y le permitieron verificar posiciones de elementos en la tabla periódica. Además se relacionó con otros químicos rusos que trabajaban en Heidelberg, entre ellos Alexander Borodin.²

Su interés abarcó también el desarrollo industrial de su país, desde la divulgación científica en revistas hasta la redacción de tratados sobre tecnología. El conocimiento que tenía sobre la producción de petróleo lo llevó hasta Bakú. A partir de ese viaje escribió sobre las condiciones primitivas en las cuales se realizaba la extracción de petróleo y sugirió los métodos para revertirlas. En lo referente a la agricultura tuvo mejores logros. Desarrolló un sistema de campos experimentales en los cuales se analizó el uso, con experimentos exactos, de distintos abonos minerales llegando a resultados sobre su mejor efecto en cuanto a composición y condiciones de aplicación.

Hay otra faceta no muy conocida de su personalidad que es su afición por el arte. Los miércoles, junto a su esposa Anna Ivánovna, se organizaban reuniones en su casa durante las cuales se trataban las novedades que tenían lugar en el arte, en especial pintura, que mucho le interesaba. Pintores como Kramskoi, Repin, Kuindzhi y Shishkin, entre otros, eran asiduos concurrentes a esas reuniones. El conocimiento que adquirió sobre pintura y que expresó en algunos escritos, motivó su ingreso como miembro a la Academia de Bellas Artes. También, gracias a su amistad con Borodin, estaba en estrecho contacto con el grupo de compositores, entre ellos Músorgski y Rimsky –Kórsakov, que propulsaban la composición de música con características rusas.

Como profesor, además de la calidad de sus clases, sobresale la redacción de libros de texto, por ejemplo sobre Química Orgánica y Tecnología. Cuando al empezar a dictar un curso de Química en 1868 planificó la redacción de un libro de texto al que le dio el nombre de Principios de la Química. Durante la tarea de redacción se dio cuenta que: *“...tenía que adoptar un cierto sistema de cuerpos simples, para no gobernarme en su distribución por motivos casuales, en cierto modo instintivo, sino por un principio exacto y determinado...”; el germen de la clasificación de los elementos por los pesos atómicos. Mendeléiev ordenó los 64 elementos conocidos por ese entonces de acuerdo a esa variable y analizando la*

secuencia obtenida descubrió la ley periódica, en sus palabras: "A medida que aumenta el peso atómico los elementos adquieren al principio propiedades nuevas, variables, pero que luego vuelven a repetirse en el nuevo período, en la nueva fila y serie de elementos y en el mismo orden de sucesión que en la serie precedente de ahí que la ley de periodicidad pueda ser formulada del siguiente modo: las propiedades de los elementos y en virtud de ello las propiedades de los cuerpos simples y compuestos que forman, se hallan en dependencia periódica (o sea se repiten con regularidad) de su peso atómico".

La tabla periódica impresa en hoja suelta y con fecha 17 de febrero de 1869 la envía a todos los físicos y químicos de su conocimiento. El 18 de marzo de 1869, se la presentó en la sesión de la Sociedad Química Rusa con el título: "Experimento de un sistema de elementos basado en su peso atómico y en la afinidad química". En el mismo año se publicó en Alemania [1]

**ОПЫТЪ СИСТЕМЫ ЭЛЕМЕНТОВЪ,
ОСНОВАННОЙ НА ИХЪ АТОМНОМЪ ВѢСѢ И ХИМИЧЕСКОМЪ СХОДСТВѢ.**

		Ti=50	Zr=90	?=180.
		V=51	Nb=94	Ta=182.
		Cr=52	Mo=96	W=186.
		Mn=55	Rh=104,4	Pt=197,1.
		Fe=56	Ru=104,4	Ir=198.
		Ni=Co=59	Pd=106,6	Os=199.
H=1		Cu=63,4	Ag=108	Hg=200.
	Be= 9,4	Mg=24	Zn=65,2	Cd=112
	B=11	Al=27,3	?=68	Ur=116
	C=12	Si=28	?=70	Sn=118
	N=14	P=31	As=75	Sb=122
	O=16	S=32	Se=79,4	Te=128?
	F=19	Cl=35,5	Br=80	I=127
Li=7	Na=23	K=39	Rb=85,4	Cs=133
		Ca=40	Sr=87,6	Ba=137
		?=45	Ce=92	
		?Er=56	La=94	
		?Yt=60	Di=95	
		?In=75,6	Th=118?	

Д. Менделѣевъ

Figura 1: Tabla enviada a la Sociedad Científica Rusa en 1869.

Además de poner en evidencia la periodicidad de las propiedades de los elementos su otra gran conclusión fue sugerir la existencia de los elementos faltantes. En 1871 dio a conocer otra tabla que presentaba 16 casillas sin llenar. Al respecto se originó un caso que tuvo características teatrales. A los elementos aún no descubiertos, pero ya con su lugar en la tabla, los designó agregando la palabra de origen sánscrito "eka", cuyo significado es "más uno", al nombre del análogo inmediato inferior o sea "ekaluminio" significa aluminio más uno. En 1875 el científico francés Lecoq de Boisbaudran descubrió un elemento al que llamó galio (Ga) cuya densidad era 4,7 y su peso atómico 68. Mendeléiev envió una nota a la Sociedad Físicoquímica Rusa explicando que las propiedades del Ga coincidían con las del elemento que él denominó "ekaluminio" salvo una diferencia en la densidad que debía ser de 5,9, tal cual lo había predicho. Interesante discusión entre una teoría y una demostración experimental. Nuevas mediciones confirmaron el valor teórico encontrado por el ruso. El otro elemento "pronosticado" en la tabla, "ekaboro" fue legalizado con el descubrimiento del escandio que poseía las propiedades indicadas previamente en forma teórica. Por último el "ekasilicio" probó ser el germanio. Su descubridor el químico alemán Winkler escribió: "Es poco probable que exista una demostración más brillante en cuanto a la justeza de la teoría periódica de los elementos, ello constituye claro está, algo más que una simple confirmación de la osada teoría, es una ampliación de los horizontes de la química, un paso gigantesco en la esfera el conocimiento". A lo largo de los años y con nuevos descubrimientos se probó que Mendeléiev había predicho 21 de los 37 elementos descubiertos con posterioridad a 1869. En la época de las primeras tablas periódicas no se conocían los gases nobles que luego fueron agregados en otra columna en 1902.

Los elementos los ordenó en la tabla periódica en función de su "peso atómico" y a la vez los caracterizó por sus propiedades físicas como, solubilidad de sus sales, punto de ebullición. Nuevos hallazgos no cambiaron significativamente la tabla pero si la comprensión de la materia. A partir del descubrimiento de las propiedades del uranio, el polonio y el radio el fenómeno de la radioactividad hizo su aparición hacia el fin del siglo XIX [2, 3,4]. Se observó que los productos de la desintegración radioactiva diferían entre sí por pequeñas variaciones en el peso atómico y posteriormente fueron llamados isótopos. Más adelante los trabajos de Rutherford, Bohr y Schrödinger indicaron que el núcleo atómico está compuesto por protones con carga positiva y neutrones y que alrededor del núcleo giran electrones con cargas negativas equivalentes y en distintas órbitas. Schrödinger consideró que los orbitales indican la probabilidad de la presencia de los electrones en una región delimitada del espacio atómico [5, 6,7].

Todos estos nuevos conceptos y sus aplicaciones fueron definiendo la forma de determinar las características y nombres de los elementos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, (IUPAC por sus siglas en inglés: International Union of Pure and Applied Chemistry) es la organización reconocida para esa actividad y responsable de la edición de la tabla. Los elementos están ordenados siguiendo el **número atómico**, que es el número de protones que se hallan en el núcleo y los identifica. La **masa atómica** corresponde al número de protones y

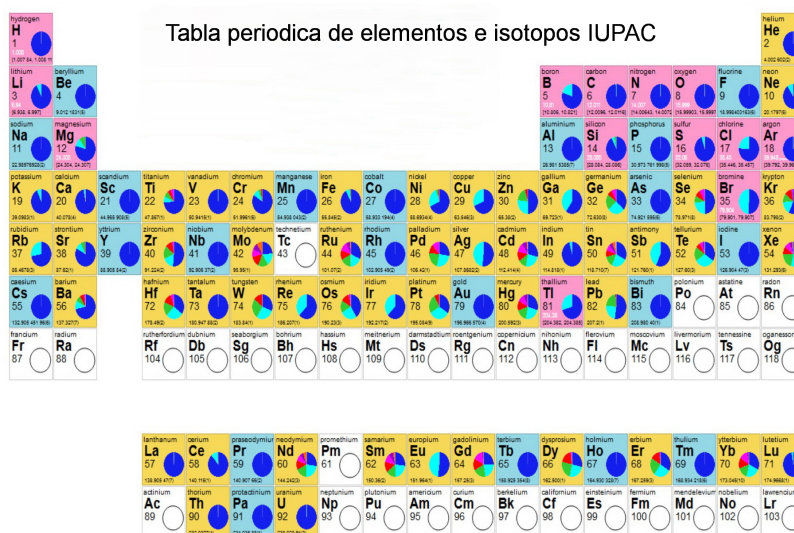
neutrones en el núcleo. Los productos de la desintegración radioactiva difieren entre sí por pequeñas variaciones en la **masa atómica** originada por la diferencia en el número de neutrones, y son llamados **isótopos**, que se encuentran también en elementos no radioactivos. El peso atómico no es medible y, según la definición de la IUPAC, "**un peso atómico (masa atómica relativa) de un elemento de una fuente especificada es la razón de la masa media por átomo del elemento respecto a 1/12 de la masa de un átomo ^{12}C** ". La definición centrada en "un" peso atómico se debe, como se señaló anteriormente, a la presencia de isótopos. Para lograr una mayor uniformidad se introdujo la **unidad de masa atómica**, definida como 1/12 de la masa del carbono 12. Se representa con el símbolo u; de este modo, $^{12}\text{C} = 12\text{u}$. A su vez IUPAC encarga a la Comisión sobre Abundancia de Isótopos y Pesos Atómicos (CIAAW, por sus siglas en inglés: Commission on Isotopic Abundances and Atomic Weight) la revisión bianual de los pesos atómicos de los elementos y de la presencia de isótopos. Los estándares de pesos atómicos publicados cada dos años por la CIAAW son reconocidos mundialmente y se incorporan a la tabla periódica.

Vale recordar que la estructura atómica no era conocida en los tiempos de Mendeléiev por lo que era conceptualmente adecuado considerar el peso atómico medible como la variable para ordenar la tabla. Indudablemente tenía una profunda visión de la naturaleza de los elementos químicos como lo demuestra el hecho que el ordenamiento de la tabla haya perdurado.

Los resultados de Mendeléiev fueron, en principio, recibidos con cierto resquemor por los científicos de algunos países europeos, entre otros motivos porque se consideraba a Rusia como un país de nivel cultural bajísimo. Sin embargo, para tomar un simple ejemplo, en cementerios de San Petersburgo, se hallan entre otras tumbas notables, las de Tchaikovsky, Dostoyevski, Borodin, Vera Komissarzhevskaya (actriz y empresaria teatral), Rimsky-Kórsakov, Mendeléiev y tal vez la madre de este último. ¡Vaya siglo XIX ruso!

Algo ha cambiado en estos tiempos. Las Naciones Unidas han proclamado a 2019 como el Año Internacional de la Tabla Periódica de los Elementos Químicos ya que se cumplen 150 años de la publicación del primer trabajo de Mendeléiev. La razón es que las Naciones Unidas han reconocido la importancia de la contribución de la química para la promoción del desarrollo sostenible y para proveer soluciones a los desafíos globales relacionados con la energía, la educación, la agricultura y la salud.

A su vez la IUPAC, que publica regularmente tablas periódicas actualizadas, ha ampliado la tabla en 2018 incluyendo los isótopos [8].



IUPAC PERIODIC TABLE of ELEMENTS and ISOTOPES. [Acceda a la versión original interactiva aquí](#)

Mendeléiev estaría feliz de ver esta tabla tan numerosa y colorida

Más recursos sobre elementos de la tabla periodica:

[Tabla periodica interactiva de elementos e isotopos.](#)

[Canal Periodic Videos en YouTube](#)

Notas al pie:

¹ Dedicatoria que encabeza su estudio de las disoluciones acuosas por su peso específico: "*Esta investigación está dedicada por su último hijo a la memoria de una madre. Tuvo que trabajar al frente de una fábrica para poder criarlo, le educó con el ejemplo, corrigiéndolo con el amor y, para entregárselo a la ciencia, lo sacó de Siberia, gastando los últimos recursos y las últimas fuerzas. Sus postreras disposiciones al morir fueron: huye de la suficiencia y el envanecimiento, sé tenaz en el trabajo y no en las palabras y busca pacientemente la verdad divina o científica...La última voluntad materna es sagrada para D. Mendeléiev*"

² Aunque pocos lo saben Borodin se ganaba la vida como químico, actividad en la que tenía muy buena reputación. Compartió con Mendeléiev la estadía en Heidelberg, durante la cual trabajó en el laboratorio de Emil Erlenmeyer sobre derivados del benceno. <http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/ed083p561>. En la foto, empezando de la derecha, Borodin es el segundo y Mendeléiev el tercero



Fotografía realizada en Heidelberg (hacia 1860)

Referencias:

General

Pisarzhevski ON (1955) Dimitri Ivanovich Mendeléiev. Su vida y su obra. Moscú: *Ediciones En Lenguas Extranjeras*

Específicas

1. **Mendelejew D** (1869) Über die beziehungen der eigenschaften zu den atomgewichten der element. *Zeitschrift für Chemie*: 405-406
2. **Becquerel AH** (1896). Émission de radiations nouvelles par l'uranium métallique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 122: 1086-1088
3. **Curie M** (1898) Rayons émit par composés d'uranium et du thorium. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 126: 1101-1103
4. **Curie M, Curie P** (1898) Sur une substance nouvelle radioactive contenue dans la pechblende. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 127: 175-178.
5. **Rutherford, E** (1911) The scattering of alpha and beta particles by matter and the structure of the atom. *Philosophical Magazine*. 21: 669.
6. **Bohr, N** (1913) On the constitution of atoms and molecules, parts I, II and III. doi:10.1080/1478644130863495 ; doi:10.1080/14786441308634993 ; doi:10.1080/14786441308635031
7. **Schrödinger, E** (1926). An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. *Physical Reviews* 28 (6): 1049-1070.
8. **IUPAC** (2018) Periodic table of the elements and isotopes. <https://www.isotopesmatter.com/applets/IPTEI/IPTEI.html>



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Número 1, año 18, Abril 2019

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Prof. Dr. Eduardo Hernán Charreau (1940 – 2019)

Un gigante de la docencia, de la investigación y de la vida

Juan Carlos Calvo

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

juacalvo@gmail.com



Hablar del Dr. Charreau es, para mí, hablar de un gigante como profesor, investigador y, casi, segundo padre.

El Dr Eduardo Charreau fue la razón por la que decidí continuar en investigación en el área de la Química Biológica, en el Instituto de Biología y Medicina Experimental donde ahora soy Investigador Principal del CONICET y seguir mi vocación docente dentro del mismo Departamento de Química Biológica, donde tengo el honor de continuar con su legado en la materia Química Biológica.

Su presencia en las aulas de la facultad imponía cierto temor ante una estampa erguida, con cabello negro, engominado y peinado hacia atrás y, a la vez, admiración por la facilidad con que podía explicar los temas complejos de la Química Biológica. Esa mezcla de respeto y temor por su personalidad tan seria, a los pocos minutos se disipaba mientras desarrollaba sus clases, con humor y muchísimo conocimiento.

Las hormonas proteicas y esteroideas, en los albores de su estudio mecanístico, fascinaron mi curiosidad y me impulsaron a acercarme al Dr. Charreau para preguntarle si había lugar en su laboratorio para hacer mi Tesis Doctoral. Eran los fines de 1975 y el Dr. Charreau estaba por hacer una visita al laboratorio del Dr. Vidar Hansson en Noruega, así que me dijo que regresara a fines de febrero. Eso hice y quedé en su laboratorio, creo, porque era el único por esos lados que podía colocar todos sus dedos sobre un teclado de máquina de escribir y usarlos como correspondía.

El Dr Charreau se graduó de Licenciado y Doctor en Ciencias Químicas, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires y se inició en la investigación científica bajo la dirección del Premio Nobel de Fisiología, Dr. Bernardo Houssay.

Recibió su entrenamiento posdoctoral en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Medicina de Harvard, donde tuvo la oportunidad increíble de trabajar junto al Dr. Claude Vilee y fue designado Assistant Professor.

En su trabajo de Tesis Doctoral, dirigido por la Dra. María Dufau en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, Bethesda, Maryland), estuvo al límite de descubrir el mecanismo de transducción de señal de la hormona luteinizante (LH) cuando, al purificar el receptor de membrana, aparecía en el gradiente de densidad una forma molecular con una "colita agregada" que, años más tarde seguramente resultaría ser la Proteína G.

Su interés por el mecanismo de acción hormonal lo llevó, a su regreso al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), a establecer un prestigioso centro de referencia en endocrinología molecular que produjo un marcado impacto en el área, como centro de referencia para Latinoamérica.

Su pasión por la investigación siempre anduvo de la mano de su interés por la docencia y, en la Universidad de Buenos Aires pasó por todas las categorías y fue designado en 1975 Profesor Titular en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Como director de laboratorio, siempre promovió la independencia y ninguna idea dejó de analizarse. Los días pasados en su laboratorio se recordarán siempre como horas de camaradería, trabajo, diversión y mucho estudio.

Como investigador de carrera, en el CONICET fue promovido a Investigador Superior en 1985, llegando a ejercer su Presidencia en el período 2002-2008, cerrando un ciclo como discípulo directo del Dr. Houssay. Como el Nobel, también fue director del IBYME (1993-2010), mientras

participaba activamente de la vida científica, dentro y fuera del país. Fue presidente de la Confederación Panamericana de Asociaciones para el Adelanto de las Ciencias y de varias Sociedades y Fundaciones.

Fue miembro de la Academia Nacional de Medicina, de la Academia de Ciencias Médicas de Córdoba, de la Third World Academy of Sciences y presidente de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (2008-2012). Su incansable necesidad de promover la actividad científica lo llevó a participar activamente en tareas de intercambio internacional, llevando su prestigio fuera de los límites de su país.

Su labor científica siempre estuvo relacionada con la endocrinología molecular y la hormono-dependencia tumoral, siendo de los primeros que participó en la puesta a punto de determinaciones hormonales en biopsias de cáncer mamario, cuando el análisis de los receptores estaba en sus inicios.

De los frutos de su constante actividad, podemos dar cuenta de más de 160 trabajos publicados en prestigiosas revistas internacionales y de su participación en numerosos congresos nacionales e internacionales que lo contaron en sus conferencias como disertante principal.

Su afán de compartir conocimientos y experiencias se plasmó en la formación de recursos humanos dirigiendo 22 tesis doctorales. Si bien el fin último de su actividad nunca fue la obtención de premios, mereció numerosos reconocimientos de prestigiosas instituciones nacionales e internacionales, incluyendo el TWAS Award in Basic Medicine, la distinción de Maestro de la Medicina Argentina, Dr Honoris Causa de las Universidades de Córdoba y Concepción, Premio Konex en dos oportunidades: como científico y como administrador de las Ciencias. Recibió, también, la Orden de Caballero de las Palmas Académicas del Gobierno Francés y del Mérito Científico en el grado de Comendador del Gobierno Brasileño.

Como presidente del CONICET, la ciencia argentina encontró a alguien que luchó por mantenerla activa y en un lugar de merecimiento, aunque le costara horas y días de intensa labor de convencimiento y "ablandamiento" antes quienes miraban números fríos y presupuestos sin alma.

Esta apretada síntesis de la labor de docencia e investigación que llevara adelante el Dr. Charreau, queda pequeña cuando se la compara con la calidad humana que supo brindar a sus discípulos. En mi caso particular, habiendo perdido a mi padre cuando apenas estaba por cumplir los 16 años, en muchas oportunidades de mi vida en las que hubiese querido poder compartirlas con él, el Dr. Charreau estuvo presente. Recibí consejos que, seguramente, también recibieron sus hijos biológicos. Supo ser firme con quienes trabajamos a su lado, pero comprensivo y generoso con su tiempo, paciencia, capacidad de escuchar y de brindar una palabra de aliento, consuelo y apoyo.

Un curriculum vitae perdurará, por virtud de la tecnología, por muchos años y cualquier persona podrá consultarlo; el recuerdo de un hombre de la ciencia y las anécdotas de las que fuimos protagonistas quienes tuvimos la suerte de compartir su vida, trascenderá aún más el ciberespacio para quedar en la memoria que perdurará más allá del fin de los tiempos, cuando la internet ya no exista y no queden seres humanos que intenten rastrearlo en una computadora.

El 23 de marzo de 2019, todos perdimos a un gigante que, consecuente con sus creencias religiosas, seguramente estará gozando del premio más merecido y el único para el que, seguramente, concursó con su vida diaria. Ya estará intercambiando anécdotas con otros gigantes de nuestro querido Departamento de Química Biológica, como el Dr. Carlos Cardini y el Dr. Carlos Pedro Lantos.

Por siempre en la memoria de quienes tuvimos el honor de conocerlo y, desde una distancia prudencial, seguir sus pasos.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista *QuímicaViva*

Número 3, año 17, Diciembre 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

La materia orgánica disuelta en los ambientes dulceacuícolas: Efectos en los ecosistemas, transferencia y transformación

Roberto Daniel García

Grupo de Ecología de Sistemas Acuáticos a escala de Paisaje (GESAP), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA), CONICET-UNComahue. Quintral 1250, Bariloche, Argentina.

garcia robertodaniel@gmail.com

Recibido: 29/11/2018 - Aceptado: 15/02/2019

Resumen

La materia orgánica disuelta en los ambientes dulceacuícolas: Efectos en los ecosistemas, transferencia y transformación. Las aguas continentales vinculan los sistemas terrestres, la atmósfera y los océanos a través del ciclo biogeoquímico del carbono. Los arroyos, ríos y lagos son sistemas extremadamente activos para el transporte, transformación y almacenamiento de grandes cantidades de carbono de origen terrestre, que se encuentra principalmente en forma de materia orgánica disuelta (MOD). Este complejo heterogéneo de sustancias posee un rol central en los cuerpos de agua. La MOD influye en la ecología de los sistemas acuáticos ya que atenúa la radiación solar, regula el pH, interviene en el transporte de nutrientes y metales, y sustenta las tramas tróficas microbianas. La transferencia de MOD entre sistemas, su concentración y calidad, están controlados por factores climáticos, físico-químicos y biológicos. Debido a ello, su estudio permite comprender y predecir cambios ambientales naturales y antropogénicos. En este artículo se describe la importancia de la MOD en sistemas dulceacuícolas, detallando sus propiedades químicas, interacciones y transformaciones.

Palabras clave: Ambientes dulceacuícolas; aporte terrestre; degradación; cambio global; ciclo del carbono.

Dissolved organic matter in freshwater environments: Effects on ecosystems, transfer and transformation

Summary

Dissolved organic matter in freshwater environments: Effects on ecosystems, transfer and transformation. Inland waters connect terrestrial systems, atmosphere and oceans through the biogeochemical carbon cycle. The streams, rivers and lakes are extremely active systems for the transport, transformation and storage of large amounts of terrestrial origin carbon, which is found mainly in the form of dissolved organic matter (DOM). This heterogeneous complex of substances plays a key role in water bodies. DOM influences several ecological properties of aquatic ecosystems, attenuating the solar radiation, regulating the pH, mediating the transport of nutrients, metals and, ultimately supporting microbial food webs. The transference of DOM among ecosystems, its magnitude and quality are controlled by several factors including, climate, and physic-chemical and biological ones. Therefore, its study allows us to understand and predict natural and anthropogenic environmental changes. This article describes the importance of DOM in freshwater systems, detailing its chemical properties, interactions and transformations.

Keywords: Freshwater environments; terrestrial contribution; degradation; global change; carbon cycle.

Introducción

Los ambientes dulceacuícolas vinculan la vegetación, los suelos, la atmósfera y los océanos a través del ciclo biogeoquímico del carbono (C) [1-3]. A pesar de que los ambientes dulceacuícolas representan una pequeña parte de la superficie terrestre, estos sistemas juegan un importante papel en el flujo global del C [4, 5]. Las estimaciones indican que los sistemas dulceacuícolas transportan, transforman o almacenan aproximadamente ~2,7 Pg de C al año (1 Pg = 1 petagramo o 10⁹ toneladas métricas), lo que representa un ~60% de la producción primaria neta de los ecosistemas terrestres [6].

Los ambientes dulceacuícolas pueden ser considerados sistemas heterotróficos, ya que su metabolismo y sus tramas tróficas se encuentran sustentadas en diferente grado por C terrestre [4]. Los ríos y arroyos transportan C desde la cuenca, el cual se metaboliza y se sedimenta dentro del sistema [5]. Por su posición en el paisaje, generalmente los lagos concentran los materiales transportados por las redes fluviales. Estos sistemas son sitios extremadamente activos para el transporte, transformación y almacenamiento de grandes cantidades de C terrestre, teniendo un efecto desproporcionado en relación con su extensión espacial [6]. En los lagos y embalses se deposita más C orgánico que en los océanos [4, 7]. Debido a este gran aporte externo, la respiración de los sistemas dulceacuícolas excede a la producción primaria y, como resultado, estos sistemas liberan más dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera del que consumen [7, 8].

En los sistemas acuáticos, los aportes de C terrestre se denominan alóctonos y se encuentran regulados por factores climáticos. Las precipitaciones vehiculizan materiales e intensifican la exportación de C terrestre hacia la red fluvial [1, 9]. El agua de las precipitaciones atraviesa diversos elementos de las cuencas (organismos, horizontes del suelo, etc.), concentrando una gran variedad de sustancias que son transportados hacia los cuerpos de agua por medio de la escorrentía [2] (Figura 1). Es por ello que las propiedades geomorfológicas (pendiente, extensión de la ribera, suelos) y biológicas (cobertura vegetal, comunidades del suelo) de la cuenca son determinantes de la cantidad y calidad del C que se exporta hacia los ambientes dulceacuícolas [10]. Finalmente, los ríos, arroyos y las aguas subterráneas descargan sus aguas en los lagos, sistemas que concentrarán a través del tiempo los materiales provenientes de las cuencas [11]. La evaporación de los cuerpos de agua condensará en nubes, para luego precipitar en forma de lluvia y nieve, produciendo un nuevo arrastre de material terrestre hacia los ambientes dulceacuícolas (Figura 1).

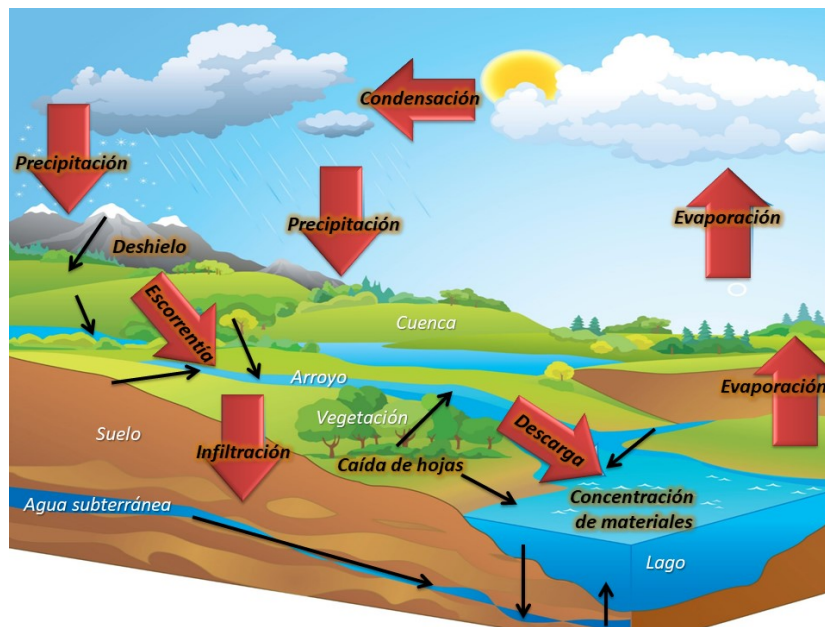


Figura 1: Esquema del ciclo del agua y del transporte de materiales hacia los ambientes acuáticos. Las flechas negras indican flujos de materiales mediados por el agua. Las flechas rojas indican procesos.

La mayor parte del C orgánico presente en los ambientes dulceacuáticos se encuentra en forma de materia orgánica disuelta (MOD), un complejo conjunto de sustancias [2]. Debido a su elevada movilidad y reactividad, la MOD tiene un rol central en el ciclo global del C y en gran medida de ella depende la circulación de la energía y los nutrientes dentro y entre ecosistemas [5, 6]. En el presente trabajo revisaremos la importancia de la MOD en los sistemas dulceacuáticos como así también su origen, transporte y transformación.

La materia orgánica disuelta en los sistemas dulceacuáticos

Los cuerpos de agua concentran un complejo heterogéneo de moléculas orgánicas de distinta composición (desde aminoácidos sencillos a polímeros complejos), que conforman lo que se denomina materia orgánica (MO) [12]. La MO se divide por convención en las fracciones particulada (MOP, $>0,45 \mu\text{m}$) y disuelta (MOD, $<0,45 \mu\text{m}$) [13]. Esta categorización posee una relevancia trófica, ya que la mayoría de los consumidores secundarios (desde los protozoos hasta los peces) pueden utilizar la MOP, mientras que los microorganismos descomponedores (bacterias) hacen uso principalmente de la MOD [14] (Figura 2). Las bacterias metabolizan la MOD, transformándola en biomasa y aportando CO_2 a la atmósfera. Al ser consumidas, las bacterias transfieren energía y nutrientes hacia niveles superiores de la trama trófica acuática, lo que se denomina bucle microbiano [15]. Si bien la producción primaria acuática realiza un importante aporte de C, la mayor parte de la energía y los nutrientes que sostienen a las tramas tróficas acuáticas proviene del subsidio de MOD del medio terrestre [4, 16] (Figura 2).

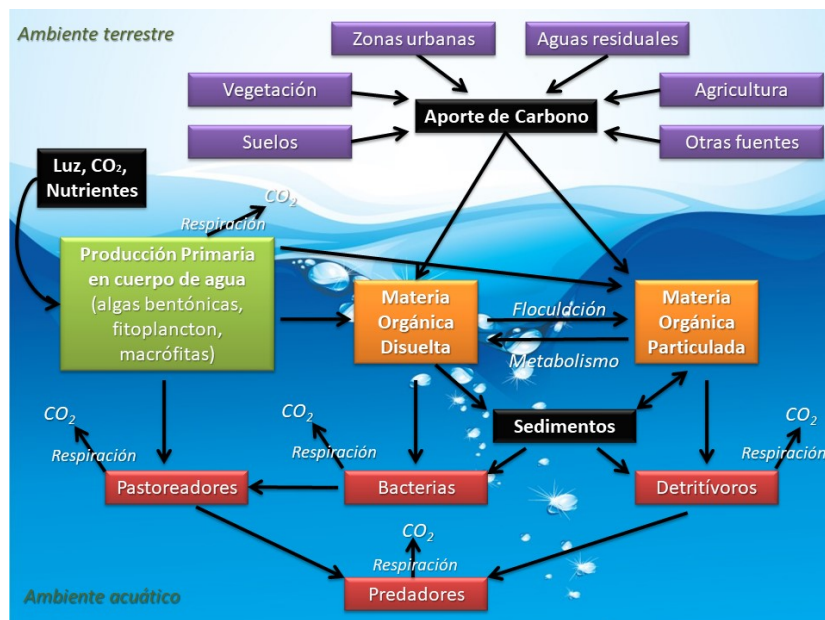


Figura 2: Esquema del ciclo del carbono orgánico en el medio acuático.

Las sustancias que componen la MOD controlan diversos aspectos de los sistemas acuáticos: regulan el pH del medio, determinan la penetración de las distintas longitudes de onda de la luz, influyen en la disponibilidad de nutrientes y metales, y proveen compuestos estructurales que son utilizados directa e indirectamente por los organismos [12, 14]. Cuando se encuentra en concentraciones elevadas, la MOD constituye un problema ambiental, alterando la calidad del ecosistema acuático y del agua como recurso vital [12].

La MOD puede controlar tanto la intensidad como la calidad espectral de la luz que penetra en la columna de agua y, por lo tanto, tiene una fuerte influencia sobre la producción primaria del sistema [17]. En ambientes acuáticos muy transparentes con baja concentración de MOD, los niveles de penetración de la radiación solar pueden inhibir la fotosíntesis algal en las capas superficiales, mientras que concentraciones elevadas

de MOD pueden limitar la producción primaria [18]. La MOD puede actuar como un filtro, absorbiendo la radiación ultravioleta y amortiguando los efectos nocivos de estas longitudes de onda sobre los organismos [19].

La MOD posee la capacidad de complejizarse con otros elementos, impactando su movilidad, solubilidad y utilización por los organismos [20, 21]. En particular, el ciclo del nitrógeno (N) está fuertemente ligado a la MOD, ya que las sustancias orgánicas pueden contener diferente número de átomos de N en su estructura [22]. El N es un elemento limitante para los organismos acuáticos y su disponibilidad afecta la producción primaria [23]. Entre los metales, la asociación MOD-mercurio (MOD-Hg) ha sido una de las más estudiadas debido a sus implicancias medioambientales. Dependiendo del sistema, la MOD puede inhibir o promover la formación de metilmercurio (CH_3Hg^+), un peligroso neurotóxico que se bioacumula y biomagnifica en las tramas tróficas acuáticas. El metilmercurio puede encontrarse en concentraciones tóxicas en peces, mamíferos marinos y moluscos de consumo humano. El consumo de animales contaminados altera el desarrollo neurológico en los embriones, fetos en gestación y niños [20, 24].

Propiedades químicas y clasificación de la MOD

La MOD está compuesta principalmente por carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno, hidrógeno y azufre, e incluye un amplio espectro de moléculas: sustancias simples (aminoácidos, azúcares), polímeros complejos y sustancias coloidales [25]. Este gradiente se refleja en un amplio rango de pesos moleculares, solubilidad, afinidad y propiedades ópticas de la MOD [12]. Solamente el 25% de la MOD son moléculas identificables, como hidratos de carbono, grupos amino e hidroxiácidos. El 75% restante se categoriza en grupos generales tales como sustancias húmicas (SH) y no húmicas (SNH) [26]. En los sistemas acuáticos, las SNH representan el 20% de la MOD mientras que el 80% corresponde a SH, generalmente coloreadas y derivadas de residuos de origen animal, vegetal y/o microbiano [25, 26] (Figura 3). Las SH con clasificadas según su solubilidad en: ácidos húmicos (solubles a $\text{pH} < 2$), ácidos fúlvicos (solubles independientemente del pH) y huminas (insolubles en todo el rango de pH) [25]. Los ácidos fúlvicos son las SH mayoritarias en los ambientes acuáticos y poseen menor peso molecular (100-2.000 da) que los ácidos húmicos, los cuales pueden formar agregados coloidales de alto peso molecular (100.000 da) [13, 26].

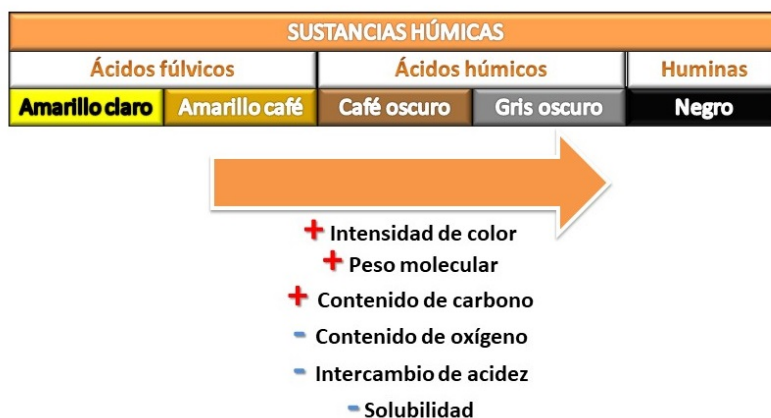


Figura 3: Composición y propiedades químicas de las sustancias húmicas.

La MOD puede caracterizarse a través de su concentración y calidad. Generalmente, se utiliza la concentración del C orgánico disuelto como estimador de la concentración de MOD, mientras que existe un amplio abanico de parámetros para definir la calidad de la MOD [27]. Existe una evolución continua en los enfoques analíticos para determinar la composición, el origen y la reactividad de la MOD debido al advenimiento de nuevas tecnologías. Sin embargo, las propiedades de absorción de la luz y de fluorescencia de la MOD han permitido un gran avance en su caracterización mediante técnicas espectrofotométricas, que brindan una rápida información acerca del tamaño molecular, aromaticidad y estado diagenético, permitiendo inferir su origen y composición [12, 13]. El reciente desarrollo de técnicas instrumentales (p.e., espectrometría de masas) ha mejorado la capacidad para caracterizar compuestos orgánicos individuales y mezclas homogéneas [27]. Sin embargo, debido a la gran complejidad de la MOD, su caracterización sigue siendo un desafío.

Origen y procesos que controlan la MOD

En ambientes dulceacuícolas, la concentración de MOD (estimada a partir de la concentración de carbono orgánico disuelto) varía aproximadamente entre 0,5 y 50,0 mg/L [28]. Este C orgánico proviene tanto de fuentes internas (autóctonas) como de fuentes externas (alóctonas) [14]. La MOD autóctona deriva de la producción primaria de las algas y macrófitas, prevaleciendo el fitoplancton en los ecosistemas lénticos y el biofilm (algas adheridas a diferentes sustratos) en los ecosistemas lóticos (Figura 2). La generación de MOD a partir de los organismos se produce por senescencia, pastoreo, lisis viral o liberación extracelular de compuestos orgánicos [26]. La MOD autóctona es particularmente susceptible a la degradación bacteriana debido a que se encuentra conformada principalmente por sustancias de fácil asimilación, como proteínas y polisacáridos [29].

La MOD alóctona proviene principalmente del ecosistema terrestre y deriva de la vegetación terrestre y de los suelos [14]. El ingreso de esta MOD a los ambientes acuáticos se encuentra ligado a las precipitaciones que movilizan materiales por escurrimiento superficial (escorrentía, por transporte de aguas superficiales conectadas) y subsuperficial (aguas subterráneas). El ingreso directo de hojarasca y detrito aporta también MOD por lixiviación [7] (Figura 1). La cantidad y calidad de MOD alóctona que ingresa a los sistemas acuáticos se encuentra influenciada por una variedad de factores, entre los que destacan el clima y las actividades antrópicas [30,31].

La MOD alóctona es dependiente de los procesos y de las características de las cuencas, como son el tipo de suelos y vegetación, el tamaño y la pendiente de la cuenca, la presencia de permafrost, entre otros [10, 32, 33]. Sin embargo, es el efecto del clima (precipitación y temperatura) el que genera la interacción entre la cuenca y los sistemas acuáticos, ya sea por arrastre de materiales durante la escorrentía o por efecto del deshielo [34, 35]. En efecto, las precipitaciones pueden incrementar la concentración de MOD de los sistemas acuáticos debido al mayor flujo de materiales [9, 36].

El cambio climático tiene grandes consecuencias para la MOD de los ecosistemas acuáticos, con efectos a corto y a largo plazo (Figura 4). El aumento de la temperatura, los cambios en las precipitaciones, etc., pueden producir grandes alteraciones en el grado de procesamiento y transferencia de los materiales terrestres hacia los cuerpos de agua [37]. Por ejemplo, el calentamiento global ha reducido la superficie de permafrost, generando un ingreso de grandes volúmenes de MO inactiva al ciclo del C, que se degrada en los suelos y cuerpos de agua liberando enormes cantidades de CO₂ a la atmósfera [8, 37, 38]. En regiones donde se acumulaba una capa de nieve en invierno, las temperaturas más cálidas podrían generar una escorrentía temprana, alterando la calidad del material que es exportado desde los suelos debido al procesamiento incompleto por parte de los microorganismos [6, 37]. A su vez, la vegetación de ribera puede experimentar cambios en la composición de especies y en su relación estequiométrica (carbono: nitrógeno) debido a la variación en los patrones climáticos. Los múltiples efectos del cambio climático se traducirán en fluctuaciones de la calidad y cantidad de la MOD que es exportada desde el medio terrestre, impactando de una manera incierta sobre las redes tróficas de los sistemas acuáticos [19, 28] (Figura 4).

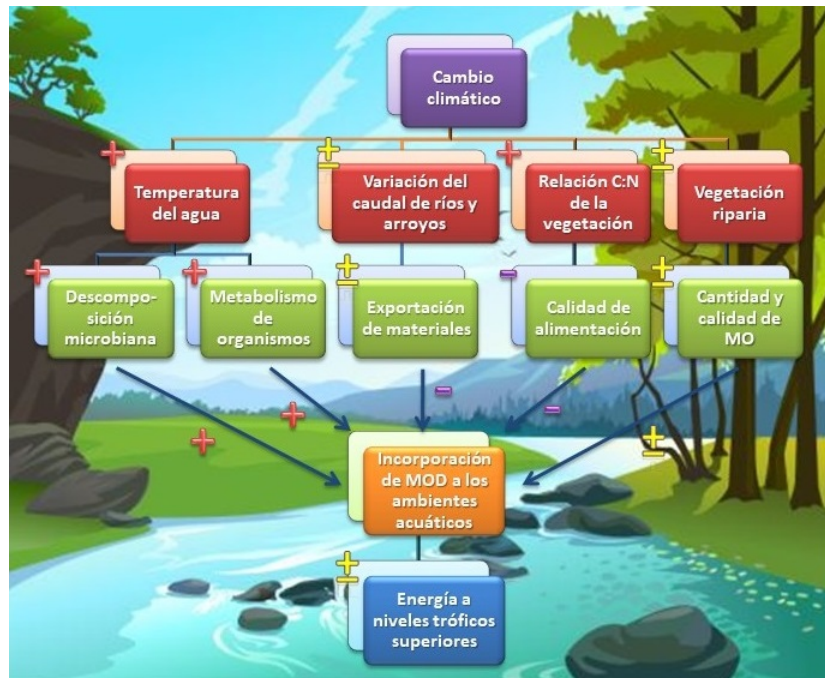


Figura 4: Impacto potencial del cambio climático sobre la materia orgánica disuelta en ambientes dulceacuícolas. +: Influencia positiva; -: Influencia negativa; ±: Incertidumbre; MO: Materia orgánica; MOD: Materia orgánica disuelta; C:N: Relación carbono:nitrógeno.

En la actualidad, la actividad antrópica es otro importante regulador de la MOD. La intensificación del impacto humano debido al crecimiento de la población, la ampliación de la frontera urbana y los cambios en la magnitud y calidad de los aportes desde el medio terrestre antropizado alteran directa e indirectamente a la MOD [30, 31]. Uno de los impactos más importantes de la actividad humana es la eutrofización, es decir, la contaminación y el enriquecimiento de C y nutrientes de los ecosistemas naturales [39]. En regiones del hemisferio norte (Norteamérica, norte y centro de Europa, y sudeste de Asia), la alteración de los ciclos hidrológicos, la urbanización y la agricultura, han conducido a un aumento sustancial de la MOD en los sistemas acuáticos, con una fuerte disminución de la claridad del agua. Este proceso, conocido como oscurecimiento de los ambientes dulceacuícolas, produce un detrimento de la calidad del agua y un incremento de los costos de potabilización de la misma [30, 38].

Transformación de la MOD

El tiempo de residencia de la MOD en los ecosistemas determina la importancia relativa de los procesos internos frente a los externos [7, 9]. En sistemas con tiempos de residencia del agua cortos, la dinámica de la MOD está determinada por factores externos como la climatología o la posición en el paisaje [9, 10]. En sistemas con tiempos de residencia más extensos, los procesos internos adquieren un papel más importante, dando lugar a distintas transformaciones de la MOD [40].

La fotodegradación y la biodegradación son reconocidos como los procesos más importantes que actúan en la transformación y mineralización de la MOD [41, 42]. La acción de la radiación solar sobre la MOD puede producir múltiples efectos, como por ejemplo la fotomineralización (que se traduce en la transferencia de C a la atmósfera en forma de CO₂), la fotodegradación de la MOD (en inglés, "photobleaching"; pérdida de la capacidad de absorber fotones), la fotopolimerización (aumento de la capacidad de absorber fotones), o la formación de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno [40, 43, 44] (Figura 5). El efecto de la radiación solar depende de la composición inicial de la MOD, de su historial previo de degradación y de las condiciones de irradiación (p. e., longitudes de onda y duración de la luz) [45]. Los compuestos aromáticos provenientes del ambiente terrestre son considerados como los materiales más fotolábiles, mientras que los compuestos alifáticos son los más fotoresistentes y a su vez los más fotoproducidos [46].

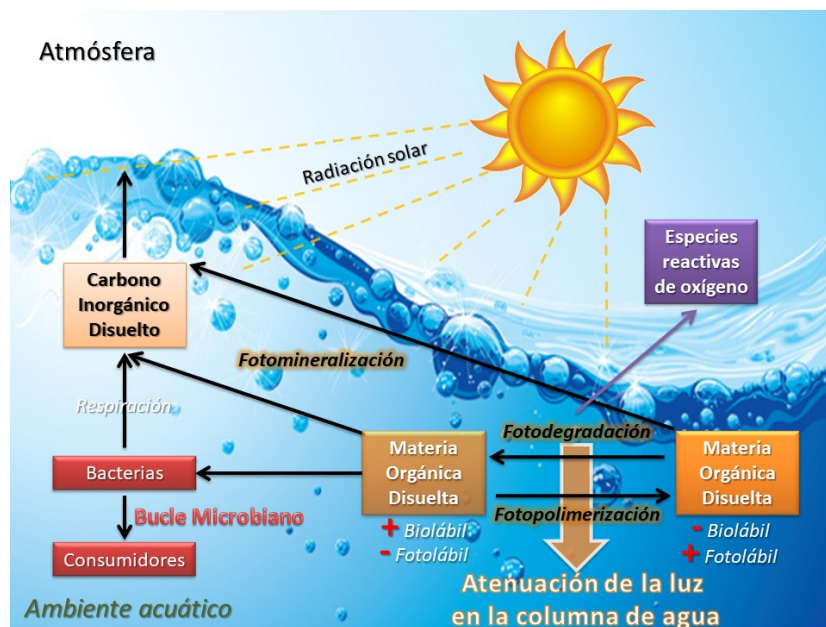


Figura 5: Efectos de la radiación solar sobre la materia orgánica disuelta (MOD) en los ambientes acuáticos y su interacción con las redes tróficas.

Por su parte, la biodegradación de la MOD es un proceso que consiste en su utilización como sustrato microbiano, cuyo metabolismo produce la transformación y mineralización, liberando CO_2 al sistema (Figura 5). La biolabilidad de la MOD varía según su calidad y origen [47]. Los sustratos preferenciales de las bacterias son los aminoácidos libres y los carbohidratos, pudiendo ser capaces de utilizar materiales más complejos (p. e., sustancias húmicas). En el metabolismo acuático, la MOD alóctona puede ser considerada menos biolábil que la MOD autóctona, debido a su mayor contenido de compuestos aromáticos y húmicos [46, 48].

La foto y la biodegradación son procesos que ocurren en simultáneo en los sistemas acuáticos, pudiendo actuar sinérgicamente (Figura 5). Dependiendo del origen de la MOD, la radiación solar puede disminuir, incrementar o no tener ningún efecto sobre su biodegradabilidad [40]. Algunos compuestos provenientes del ambiente terrestre (p.e., ligninas, ácidos húmicos) aumentan su biolabilidad al ser expuestos a la radiación ultravioleta, debido a su ruptura en compuestos de menor peso molecular, fácilmente utilizables por las bacterias [49, 50]. Por el contrario, fuentes más biolábiles de MOD (p.e., exudados algales), reducen su biolabilidad después de la exposición a la radiación, debido a su condensación en macromoléculas recalcitrantes que limitan el crecimiento bacteriano [48, 49]. La disponibilidad, transformación y degradación de la MOD tiene implicancias claves para el ciclo del C, nutrientes y metales, como así también para la estructuración de las comunidades y la dinámica trófica de los sistemas acuáticos.

Consideraciones finales

Los sistemas dulceacuicolas revelan información crítica sobre los procesos que ocurren en la biosfera a través de las fluctuaciones en sus características físico-químicas y biológicas [7, 28]. En particular, la MOD evidencia señales de procesos y/o disturbios pasados y presentes en sus cuencas que permiten inferir el impacto futuro de cambios ambientales que operan actualmente [51]. El cambio impulsado por el clima está generando respuestas complejas en los ecosistemas, que varían dependiendo de la distribución geográfica. El mayor ingreso de MOD desde las cuencas hacia los ríos y lagos ha sido extensamente registrado en América del Norte y Europa, y ha causado gran preocupación en la comunidad científica. Sin embargo, los efectos sobre otras regiones todavía se encuentran bajo estudio [7].

La dinámica de la MOD también puede ser usada como herramienta para predecir los impactos antrópicos [51]. Los vertidos de aguas residuales, la actividad agrícola, la destrucción de hábitats naturales, entre otras prácticas, modifican los ciclos biogeoquímicos y sus efectos se traducen en el deterioro de la calidad del agua y en la pérdida de servicios ecosistémicos [52]. Si queremos mitigar las implicancias ambientales, sociales y económicas que esto puede acarrear, será fundamental conocer cómo funcionan los ciclos biogeoquímicos dentro y entre sistemas, cómo se ven influenciados por las perturbaciones, y por qué estos ciclos funcionan como lo hacen.

Agradecimientos

Agradezco a M Reissig, MC Diéguez, PE García y a un revisor anónimo por sus valiosos aportes que han mejorado notablemente la escritura del manuscrito.

Referencias:

1. Lohse KA, Brooks PD, McIntosh JC, Meixner T, Huxman TE (2009) Interactions between biogeochemistry and hydrologic systems. *Annual Review of Environment and Resources* 34: 65–96. DOI:10.1146/annurev.environ.33.031207.111141
2. Aufdenkampe AK, Mayorga E, Raymond PA, Melack JM, Doney SC, Alin SR, et al. (2011) Riverine coupling of biogeochemical cycles between land, oceans, and atmosphere. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9(1): 53–60. DOI:10.1890/100014.
3. Xenopoulos MA, Downing JA, Kumar MD, Menden-Deuer S, Voss M (2017) Headwaters to oceans: Ecological and biogeochemical contrasts across the aquatic continuum. *Limnology and Oceanography* 62(S1): S3–S14. DOI:10.1002/lno.10721.
4. Cole JJ, Prairie YT, Caraco NF, McDowell WH, Tranvik LJ, Striegl RG, et al. (2007) Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* 10(1): 172–185. DOI:10.1007/s10021-006-9013-8.
5. Battin TJ, Kaplan LA, Findlay S, Hopkinson CS, Marti E, Packman AI, et al. (2008) Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. *Nature Geoscience* 1(2): 95–100. DOI:10.1038/ngeo101.
6. Tranvik LJ, Downing JA, Cotner JB, Loiselle SA, Striegl RG, Ballatore TJ, et al. (2009) Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography* 54(6part2): 2298–2314. DOI:10.4319/lno.2009.54.6_part_2.2298.
7. Ward ND, Bianchi TS, Medeiros PM, Seidel M, Richey JE, Keil RG, et al. (2017) Where carbon goes when water flows: carbon cycling across the aquatic continuum. *Frontiers in Marine Science* 4: artículo 7. DOI:10.3389/fmars.2017.00007.
8. Raymond PA, Hartmann J, Lauerwald R, Sobek S, McDonald C, Hoover M, et al. (2013) Global carbon dioxide emissions from inland waters. *Nature* 503(7476): 355–359. DOI:10.1038/nature12760.

9. Garcia RD, Reissig M, Queimaliños CP, Garcia PE, Diéguez MC (2015) Climate-driven terrestrial inputs in ultraoligotrophic mountain streams of Andean Patagonia revealed through chromophoric and fluorescent dissolved organic matter. *Science of The Total Environment* 521-522: 280–292. DOI:10.1016/j.scitotenv.2015.03.102.
10. Garcia PE, Diéguez MC, Queimaliños CP (2015) Landscape integration of North Patagonian mountain lakes: a first approach using characterization of dissolved organic matter. *Lakes & Reservoirs: Research & Management* 20(1): 19–32. DOI:10.1111/lre.12083.
11. Garcia RD, Gereá M, Soto Cárdenas S, Garcia PE, Pérez G, Reissig M, Queimaliños CP, Diéguez MC (2015c) Integrando los cuerpos de agua al paisaje del Parque: la trama invisible de las cuencas. *Macroscopia* 5: 3–8.
12. Aiken GR (2014) Fluorescence and dissolved organic matter: a chemist's perspective. En: Coble PG, Lead J, Baker A, Reynolds D., Spencer RGM (eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence*, New York :Cambridge University Press
13. Leenheer JA, Croué JP (2003) Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 37(1): 18A–26A.
14. Wetzel RG (2003) Dissolved organic carbon: Detrital energetics, metabolic regulators, and drivers of ecosystem stability of aquatic ecosystems. En: Findlay SEG, Sinsabaugh RL (eds.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. San Diego: *Academic Press*. Estados Unidos.
15. Guillemette F, Del Giorgio PA (2012) Simultaneous consumption and production of fluorescent dissolved organic matter by lake bacterioplankton. *Environmental Microbiology* 14: 1432–1443. DOI:10.1111/j.1462-2920.2012.02728.x.
16. Tranvik LJ, Cole JJ, Prairie YT (2018) The study of carbon in inland waters—from isolated ecosystems to players in the global carbon cycle. *Limnology and Oceanography Letters* 3(3): 41–48. DOI:10.1002/lol2.10068.
17. Morris DP, Zagarese H, Williamson CE, Balseiro EG, Hargreaves BR, Modenutti B, et al. (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* 40: 1381–1391. DOI:10.4319/lo.1995.40.8.1381.
18. Gereá M, Pérez GL, Unrein F, Soto Cárdenas CE, Morris D, Queimaliños CP (2017) CDOM and the underwater light climate in two shallow North Patagonian lakes: evaluating the effects on nano and microphytoplankton community structure. *Aquatic Sciences* 79(2): 231–248. DOI:10.1007/s00027-016-0493-0.
19. Häder DP, Williamson CE, Wangberg SA, Rautio M, Rose KC, Gao K, et al. (2015) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences* 14(1): 108–126. DOI:10.1039/C4PP90035A.
20. Ravichandran M (2004) Interactions between mercury and dissolved organic matter— a review. *Chemosphere* 55(3): 319–331. DOI:10.1016/j.chemosphere.2003.11.011.
21. Soto Cárdenas CE, Diéguez MC, Queimaliños CP, Rizzo A, Fajon V, Kotnik J, et al. (2018a) Mercury in a stream-lake network of Andean Patagonia (Southern Volcanic Zone): Partitioning and interaction with dissolved organic matter. *Chemosphere* 197: 262–270. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.01.048.
22. Bronk DA, See JH, Bradley P, Killberg L (2007) DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences* 4(3): 283–296. DOI:hal-00297614.
23. Kissman CE, Williamson CE, Rose KC, Saros JE (2013) Response of phytoplankton in an alpine lake to inputs of dissolved organic matter through nutrient enrichment and trophic forcing. *Limnology and Oceanography* 58(3): 867–880. DOI:10.4319/lo.2013.58.3.0867.
24. Soto Cárdenas CE, Gereá M, Queimaliños CP, Ribeiro Guevara S, Diéguez MC (2018b) Inorganic mercury (Hg²⁺) accumulation in autotrophic and mixotrophic planktonic protists: Implications for Hg trophodynamics in ultraoligotrophic Andean Patagonian lakes. *Chemosphere* 199: 223–231. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.02.035.
25. Hessen DO, Tranvik LJ (1998) *Aquatic Humic Substances: Ecology and Biogeochemistry*. Berlin: *Springer-Verlag*.
26. Steimberg C (2013) *Ecology of Humic Substances in Freshwaters: Determinants from Geochemistry to Ecological Niches*. Berlin: *Springer Science & Business Media*.
27. Minor EC, Swenson MM, Mattson BM, Oyler AR (2014) Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16(9): 2064–2079. DOI:10.1039/C4EM00062E.
28. Creed IF, McKnight DM, Pellerin BA, Green MB, Bergamaschi BA, Aiken GR, et al. (2015) The river as a chemostat: fresh perspectives on dissolved organic matter flowing down the river continuum. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72(8): 1272–1285. DOI:10.1139/cjfas-2014-0400.
29. Benner R (2003) Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter En: Findlay SEG, Sinsabaugh RL (eds.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. San Diego: *Academic Press*.
30. Williams CJ, Frost PC, Morales-Williams AM, Larson JH, Richardson WB, Chiandet AS, et al. (2016) Human activities cause distinct dissolved organic matter composition across freshwater ecosystems. *Global Change Biology* 22(2): 613–626. DOI:10.1111/gcb.13094.
31. Creed IF, Bergström AK, Trick CG, Grimm NB, Hessen DO, Karlsson J, et al. (2018) Global change-driven effects on dissolved organic matter composition: Implications for food webs of northern lakes. *Global Change Biology* 24: 1–23. DOI:10.1111/gcb.14129.
32. Aitkenhead-Peterson J, McDowell W, Neff J, Stuart E, Robert L (2003) Sources, production, and regulation of allochthonous dissolved organic matter inputs to surface waters En: Findlay SEG, Sinsabaugh RL (eds.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter* San Diego: *Academic Press*.
33. Garcia RD, Messeta ML, Feijóo C, Garcia PE (en prensa) Assessment of variations in dissolved organic matter in contrasting streams in the Pampas and Patagonian regions (Argentina). *Marine & Freshwater Research*. DOI:10.1071/MF18156.
34. Finlay JC, Neff JC, Zimov S, Davydova A, Davydova S (2006) Snowmelt dominance of dissolved organic carbon in high-latitude watersheds: Implications for characterization and flux of river DOC. *Geophysical Research Letters* 33(10): L10401. DOI:10.1029/2006GL025754.
35. Garcia RD (2016) Caracterización de la materia orgánica alóctona y la dinámica de su ingreso en un lago profundo Norpatagónico a través de arroyos tributarios. Tesis de Doctorado, Universidad del Comahue, Argentina.
36. Messetta ML, Hegoburu C, Casas-Ruiz JP, Butturini A, Feijóo C (2018) Characterization and qualitative changes in DOM chemical characteristics related to hydrologic conditions in a Pampean stream. *Hydrobiologia* 808(1): 201–217. DOI:10.1007/s10750-017-3422-x.
37. Erickson III DJ, Sulzberger B, Zepp RG, Austin AT (2015) Effects of stratospheric ozone depletion, solar UV radiation, and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical & Photobiological Sciences* 14(1): 127–148. DOI:10.1039/C4PP90036G.
38. Fasching C, Behounek B, Singer GA, Battin TJ (2014) Microbial degradation of terrigenous dissolved organic matter and potential consequences for carbon cycling in brown-water streams. *Scientific Reports* 4, N° artículo 4981. DOI:10.1038/srep04981.
39. Carpenter SR, Stanley EH, Vander Zanden MJ (2011) State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. *Annual review of Environment and Resources* 36: 75–99. DOI:10.1146/annurev-environ-021810-094524.
40. Reche I (2003) Sensibilidad de los ecosistemas acuáticos a la radiación ultravioleta: el papel de la materia orgánica disuelta. *Ecosistemas* 12(1): 1–11.
41. Chen M, Jaffé R (2014) Photo- and bio-reactivity patterns of dissolved organic matter from biomass and soil leachates and surface waters in a subtropical wetland. *Water Research* 61: 181–190. DOI:10.1016/j.watres.2014.03.075.
42. Hansen AM, Kraus TE, Pellerin BA, Fleck JA, Downing BD, Bergamaschi BA (2016) Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. *Limnology and Oceanography* 61(3): 1015–1032. DOI:10.1002/lno.10270.
43. Moran MA, Sheldon WM, Zepp RG (2000) Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 45(6): 1254–1264. DOI:10.4319/lo.2000.45.6.1254.
44. Garcia PE, Queimaliños CP, Diéguez MC (2018) Natural levels and photo-production rates of hydrogen peroxide (H₂O₂) in Andean Patagonian aquatic systems: Influence of the dissolved organic matter pool. *Chemosphere*. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.10.179.
45. Garcia RD, Diéguez MC, Gereá M, Garcia PE, Reissig M (2018) Characterisation and reactivity continuum of dissolved organic matter in forested headwater catchments of Andean Patagonia. *Freshwater Biology* 63(9): 1049–1062. DOI:10.1111/fwb.13114.
46. Helms JR, Mao J, Stubbins A, Schmidt-Rohr K, Spencer RG, Hernes PJ, et al. (2014) Loss of optical and molecular indicators of terrigenous dissolved organic matter during long-term photobleaching. *Aquatic Sciences* 76(3): 353–373. DOI:10.1007/s00027-014-0340-0.
47. Benner R, Kaiser K (2011) Biological and photochemical transformations of amino acids and lignin phenols in riverine dissolved organic matter. *Biogeochemistry* 102(1-3): 209–222. DOI:10.1007/s10533-010-9435-4.
48. Catalán N, Obrador B, Felip M, Pretus JL (2013) Higher reactivity of allochthonous vs. autochthonous DOC sources in a shallow lake. *Aquatic Sciences* 75(4): 581–593. DOI:10.1007/s00027-013-0302-y.
49. Fasching C, Battin TJ (2012) Exposure of dissolved organic matter to UV-radiation increases bacterial growth efficiency in a clear-water Alpine stream and its adjacent groundwater. *Aquatic Sciences* 74(1), 143–153. DOI:10.1007/s00027-011-0205-8.
50. Fellman JB, Petrone KC, Grierson PF (2013) Leaf litter age, chemical quality, and photodegradation control the fate of leachate dissolved organic matter in a dryland river. *Journal of Arid Environments* 89: 30–37. DOI:10.1016/j.jaridenv.2012.10.011.
51. Williamson CE, Saros JE, Vincent WF, Smol JP (2009) Lakes and reservoirs as sentinels, integrators, and regulators of climate change. *Limnology and Oceanography* 54(6part2): 2273–2282. DOI:10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2273.
52. Cirrelli AF (2012) El agua: Un recurso esencial. *Química Viva* 11 (3): 147–170.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 1, año 18, Abril 2019

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Expandiendo las fronteras de la tecnología genómica en Latinoamérica: medicina de precisión Made in Argentina

German Biagioli^{1,3}, Sebastián A. Vishnopolka^{3,4}, Guadalupe Buda^{3,4}, Jonathan Zaiat^{2,4}, Nelba Pérez^{3,4}, María T. Bernardi^{3,4}, Geronimo Dubra², Sergio I. Nemirovsky⁴, Juan P. Bustamante^{4,5}, Adrián G. Turjanski^{3,4} y Marcelo A. Marti^{3,4}

¹ Departamento de Química Biológica, ²Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, ³ BITGENIA, ⁴ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN) CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina ⁵ Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, Oro Verde, Argentina.

marti.marcelo@gmail.com

Recibido: 04/04/2019 - Aceptado: 17/04/2019

Resumen

Con el advenimiento del siglo XXI la medicina está a las puertas de un cambio de paradigma, producto de las tecnologías de secuenciación masiva que permiten obtener, a un costo accesible, la información genómica de un individuo, abriendo el camino a una medicina verdaderamente personalizada y de precisión. Los primeros beneficiados por éste cambio son aquellos pacientes que padecen algunas de las más de 8000 enfermedades genéticas, al poder acceder a un potencial diagnóstico molecular certero. En Argentina, estas enfermedades afectan a más de 1 millón de habitantes, y determinar la mutación responsable es fundamental para arribar a un diagnóstico y permitir el desarrollo de futuros tratamientos. Los esquemas de aplicación de tecnología genómica en la clínica sin embargo, no están exentos de dificultades, particularmente en países en vías de desarrollo debido a la dificultad de acceso a las mismas, y a la escasa formación de los profesionales en los aspectos necesarios para su implementación.

En este contexto en el año 2016, en el marco de una colaboración entre Bitgenia y un grupo de investigación en genómica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires se lanzó la campaña "100 exomas" con el objetivo realizar la secuenciación y análisis sin costo de 100 exomas de pacientes con diagnóstico presuntivo de una enfermedad genética poco frecuente. Los resultados muestran que la tasa de éxito -casos dónde se llegó a diagnóstico – está entre el 30-50% lo que es consistente con estudios realizados a nivel internacional. Varios de los casos, además han permitido encontrar variantes novedales que representan el punto de partida para el estudio de los fenómenos moleculares subyacentes al desarrollo patológico, algunos de los cuales han dado lugar a publicaciones de primer nivel en el marco de colaboraciones internacionales [1] [2].

En resumen el desarrollo exitoso de la campaña "100 Exomas" es una clara prueba de concepto de que es posible implementar a nivel local servicios de diagnóstico molecular basados en secuenciación de próxima generación.

Palabras clave: Secuenciación de próxima generación, NGS, Exoma, Variante, Enfermedades genéticas

Summary

21st century biology promises to revolutionize medicine due to the emergence of Next Generation Sequencing technologies that allow obtaining at an affordable cost, each person genetic profile, thereby leading to a personal and precision medicine. Main beneficiaries of this progress are those patients suffering from one of the over 8000 rare genetic diseases, which now access a potential precise molecular diagnostics. In Argentina rare diseases affect about 3 million people, and determining the underlying causal mutation is the first and key step towards development of a proper treatment. However, application of genomic technologies in the clinical practice is far from simple, particularly in developing countries due to difficulties in the access to the technologies and the limited knowledge of the health care professionals.

In year 2016, in the context of collaboration between our research group at the university of Buenos Aires and Bitgenia (www.bitgenia.com) we launched the 100 exomes project, whose aim was to sequence the exoms of 100 patients harboring a rare disease in order to arrive to a potential molecular diagnostic. Our results show that success rate -those cases where a causal pathogenic mutation was found- was between 30-50% of cases, in agreement with other studies. Moreover, several cases, yield variants that were the starting point of molecular studies that for example lead to international collaborations. Our experience also shows that success rate is maximized when professionals from different reads (Physicians, molecular biologists, geneticists, informatitinas) work together, particularly during variant prioritization and interpretation procedure.

In summary, successful development of the "100 exomes" project is a nice proof of concept showing that it is possible to implement next generation sequencing clinical genomic services locally.

Keywords: Next Generation Sequencing, Mendelian Disease, Mutation.

Introducción

Con el advenimiento del siglo XXI la medicina está a las puertas de un cambio de paradigma producto del desarrollo de las tecnologías NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*) que permiten obtener, a un costo accesible cercano a los mil dólares [3], la información genómica de un individuo, abriendo el camino a una medicina verdaderamente personalizada y de precisión [4]. En este nuevo marco del ejercicio de la medicina se pretende complementar a las manifestaciones clínicas y el fenotipo general del paciente, junto a los tratamientos disponibles, con la información genética de fondo del individuo, permitiendo evaluar la interacción entre estos tres dominios, para realizar decisiones precisas en los tres pilares de la medicina: prevención, diagnóstico y tratamiento [5,6].

Como muestran los trabajos en el área, que datan de hace poco menos de 10 años, los primeros beneficiados por la aplicación de las Tecnologías Genómicas en la clínica, son aquellos pacientes que padecen enfermedades genéticas mendelianas, usualmente poco frecuentes, al poder acceder a un potencial diagnóstico molecular certero [7][8]. Según Orphanet [9], las Enfermedades poco Frecuentes (EpoF) -mal llamadas raras- son aquellas que afectan a uno de cada 2000 individuos. De acuerdo con el catálogo OMIM [10], en la actualidad se conocen alrededor de 8.000 enfermedades genéticas (la mayoría de ellas de tipo monogénicas), que en conjunto afectan al 7% de la población mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [11]. En Argentina, las enfermedades poco frecuentes -de origen genético, crónico y degenerativo- afectan alrededor de 3,2 millones de habitantes. Determinar la variante genética -históricamente llamada mutación- responsable del desarrollo de la enfermedad es fundamental, no solo para arribar a un diagnóstico, sino también para comprender las bases moleculares de la patología y permitir el desarrollo de posibles futuros tratamientos [12].

Los esquemas de aplicación de tecnología genómica en la clínica para el diagnóstico preciso de enfermedades mendelianas y el potencial hallazgo de nuevos genes o variantes asociados a la enfermedad en cuestión no están, sin embargo, exentos de dificultades [13]. En un experimento, de por ejemplo secuenciación exómica (es decir, secuenciación de las regiones codificantes del genoma), se obtienen decenas de miles de variantes, muchas de las cuales son novedosas y otras, aunque reportadas previamente, no se cuenta con información de su frecuencias alélicas y son muchas veces de significado incierto [14]. En este contexto, es fundamental contar con un protocolo informático eficiente para priorizar las variantes encontradas y un entrenamiento en genómica por parte del especialista que permita valorar las mismas de manera adecuada en el contexto de la historia clínica del paciente [15]. En países en vías de desarrollo -como la Argentina- estas dificultades se ven exacerbadas debido a la dificultad de acceso a las tecnologías genómicas y la escasa formación de los profesionales en los aspectos técnicos y clínicos necesarios para su implementación.

En este contexto, en el año 2016, con el objetivo de brindar capacitación y acceso a las tecnologías genómicas y, en el marco de una colaboración entre Bitgenia y un grupo de investigación en genómica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, se lanzó la campaña "100 exomas". La misma tuvo como objetivo realizar la secuenciación y análisis sin costo de 100 exomas de pacientes con diagnóstico presuntivo de una enfermedad genética poco frecuente que requiriese de un diagnóstico molecular y que, por la variedad de genes involucrados y/o la complejidad de la sintomatología clínica, requieran en particular de un análisis de exomas. Buscando, mediante el análisis e interpretación de los resultados obtenidos, trabajar junto a los profesionales de la salud participantes, con la intención de desarrollar y difundir la genómica y capacidad bioinformática en el país. La campaña tuvo alcance nacional, los casos fueron seleccionados de más de 10 provincias Argentinas.

Los resultados de la campaña, como se describen a continuación, junto con esfuerzos previos del mismo grupo de trabajo, han tenido un enorme impacto en la comunidad biomédica, generando conocimiento de gran relevancia que ha trascendido las fronteras nacionales [1] [9].

Métodos

Protocolo de enrolamiento clínico.

El reclutamiento de casos se llevó a cabo a través de la difusión de la campaña "100 exomas" en instituciones de la salud, tanto públicas como privadas, dentro del territorio argentino. Se realizaron entrevistas con el personal médico interesado, durante las cuales se presentaron aquellos casos que se pensara pudieran beneficiarse de una secuenciación exómica. Como criterio de selección se dio prioridad a aquellos casos para los cuales se tuviera un fuerte indicio de enfermedad hereditaria monogénica, con un buen diagnóstico clínico y conocimiento previo de la etiología molecular, es decir, que existieran evidencias previas de mutaciones en genes candidatos que resulten en el fenotipo asociado al diagnóstico. También fue necesario descartar en esta etapa aquellos casos que tuvieran una alta probabilidad de ser causados por modificaciones genéticas no detectables por medio de la secuenciación de exomas, como inserciones y deleciones grandes (mayores a 150 pares de bases), variaciones en el número de copias, re arreglos cromosómicos o mutaciones en regiones no codificantes del genoma.

Una vez preseleccionados los casos, se procedió a realizar para cada uno un reporte de factibilidad. El mismo consistió en analizar: i) la historia clínica y familiar del paciente, ii) las asociaciones genotipo-fenotipo conocidas para la patología, ii) trabajos previos que dieran cuenta del uso de tecnologías NGS para casos similares, y iv) la existencia de paneles de secuenciación comerciales que cubran las enfermedades descritas relacionadas con el diagnóstico presuntivo. A partir de esto se confeccionó una lista de genes candidatos para los cuales se analizó la cobertura horizontal teórica para el kit de captura utilizado y, finalmente, se asignó a cada caso un nivel de factibilidad cualitativo (bajo - medio - alto), junto con una propuesta sobre a quiénes secuenciar del grupo familiar.

De esta manera, cada análisis de factibilidad confeccionado fue entregado a los médicos responsables de los casos clínicos, quienes, en base al nivel de factibilidad asignado y la propuesta de secuenciación, tomaron la decisión final sobre continuar o no con el estudio. En caso afirmativo, en cada caso se procedió a secuenciar el exoma de cada paciente/ grupo familiar.

Secuenciación de las muestras

Una vez firmado el consentimiento por parte de los pacientes (ver sección "Consentimiento informado y hallazgos incidentales"), se procedió a la extracción de sangre periférica y la purificación de ADN de linfocitos circulantes, mediante kits comerciales a una concentración final mínima de 50 ng/ul y una pureza mayor a 1,8 en relación de absorbancia 260nm/280nm. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 2% para evaluar la calidad del ADN. La captura exómica se realizó con el kit de "Agilent SureSelect Human All Exon V5" y las muestras fueron secuenciadas mediante la tecnología "Illumina HiSeq 4000" con una longitud de lectura de 100 pares de bases y una profundidad promedio de 100X. Todas las muestras fueron anonimizadas en todos los pasos del análisis desde la extracción de sangre hasta la entrega de resultados finales al médico responsable.

Protocolo de procesamiento de datos

Las lecturas pareadas obtenidas fueron alineadas contra el genoma de referencia de "The Genome Reference Consortium" en su versión 37 (GRCh37), por medio del software *Barrow Wheelers Aligner* (BWA) [16]. El procesamiento de las lecturas alineadas se llevó a cabo según las recomendaciones del *Genome Analysis Toolkit* (GATK) [17-19]. En primer lugar se procedió a marcar las lecturas que puedan ser producto de duplicaciones de PCR por medio del software PICARD, se detectaron regiones con varias lecturas de baja calidad y se realizó un realineado local con el fin de detectar posibles deleciones o inserciones pequeñas. El siguiente paso consistió en detectar las diferencias entre el consenso

de las lecturas obtenidas y el genoma de referencia, en un proceso denominado “llamado de variantes” (del inglés “*variant calling*”) mediante la herramienta “*Haplotype Caller*” de GATK. A partir de la información de calidad de las variantes se realizó un filtrado, con el protocolo “*Hard Filtering*”, según las recomendaciones detalladas por GATK, con el fin de detectar y filtrar aquellos variantes llamadas de baja calidad. Como último paso se procedió a anotar el VCF (vincular las variantes con datos biológicos) con información externa de bases de datos utilizando el paquete de software SnpEff/SnpSift [20,21]. Para ello se utilizaron las siguientes fuentes: dbSNP, ExAC [22], 1000 Genomas [23] para frecuencia poblacional, ClinVar [24] para la relevancia clínica y Polyphen [25], SIFT [26] y MutationTaster [27] para las predicciones de patogenicidad.

Protocolo de priorización de variantes

A partir de la información anotada en las variantes, se seleccionaron aquellas con mayor probabilidad de ser causantes del cuadro clínico presentado, en un proceso denominado priorización de variantes. Para ello se utilizó la herramienta informática B_Platform, desarrollada por Bitgenia en conjunto con el grupo de investigación en genómica de FCEN de la UBA. Este software funciona dentro de un servidor accesible por la red que facilita las consultas sobre los datos de variantes de cada caso, así como el acceso a los datos por parte del equipo médico. Todos los casos fueron sometidos al protocolo de priorización de variantes diseñado previamente, con la finalidad de descartar variantes que no cumplieran con los requisitos para ser consideradas como “patogénicas” o “posiblemente patogénicas” según los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) [28] y de enriquecer los resultados con aquellas variantes candidatas a ser las causales de la sintomatología presentada. Dicho protocolo consta de grupos de filtros (descritos en el figura 1), que se aplican secuencialmente y para los cuales se analizan los resultados de manera detallada.

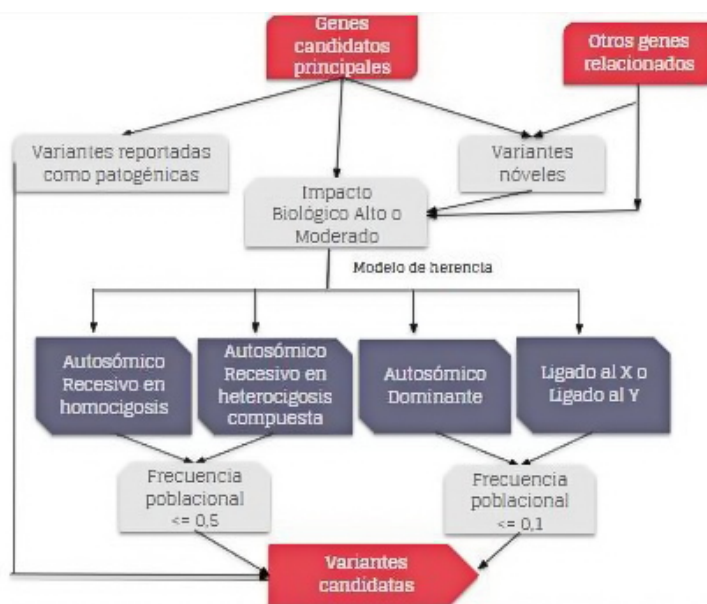


Figura 1: Esquema de priorización de variantes. Según la historia clínica, se seleccionaron genes candidatos a albergar variantes patogénicas que puedan explicar la patología clínica. En primer lugar se buscaron variantes con reportes previos de patogenicidad en bases de datos de asociaciones clínicas. Luego se procedió a buscar variantes con alto impacto y baja frecuencia poblacional, según el modelo de herencia ó variantes novedales en los genes candidatos. En casos donde no se encontraron variantes relevantes en estos primeros pasos, se continuó con la búsqueda de variantes novedales de impacto alto o moderado por fuera del panel de genes propuesto, pero aún en genes relacionados a la patología.

Cada variante fue categorizada primero de acuerdo a su impacto a nivel molecular. Se le asignó un impacto alto a aquellas variantes que resultan en ganancia o pérdida de codones de inicio, finalización de la traducción y/o cambios en el marco de lectura. El impacto se consideró moderado cuando las modificaciones a nivel proteico involucran cambios no sinónimos de un único aminoácido y/o pequeñas inserciones o deleciones que mantengan el mismo marco de lectura. El resto se consideró de impacto bajo. Luego, para cada variante se analizó su frecuencia poblacional (si la hubiera), la evidencia previa de asociaciones clínicas (calificación de ClinVar considerando valores de ClinSig 4 o 5, correspondientes a las categorías “*Likely pathogenic*” y “*Pathogenic*”, respectivamente), el efecto fenotípico previsto, el modelo de herencia para mutaciones ya reportadas en ese gen según OMIM y, si fuera posible, el efecto sobre la estructura y función proteica.

Consentimiento informado y hallazgos incidentales.

Todos los casos analizados formaron parte de: i) protocolos investigación aprobados por los comités de ética de las instituciones que atienden los pacientes, con los consentimientos informados correspondientes; o alternativamente ii) casos enmarcados en un proceso de innovación clínica [29] donde el médico responsable del caso otorga y explica el consentimiento informado al paciente. En todos los casos el análisis se limitó a aquellos genes previamente consensuados con el profesional como directamente relacionados con el diagnóstico presuntivo, para disminuir la posibilidad de hallazgos incidentales. En ninguno de los casos se presentó un hallazgo incidental.

Resultados

La campaña 100 exomas fue desarrollada bajo el concepto de que la cooperación interinstitucional y la complementariedad disciplinar son esenciales para el éxito de un programa de genómica clínica. En el contexto de Argentina, con 40 millones de habitantes distribuidos heterogéneamente a lo largo y ancho del país con acceso dispar a servicios de salud y con una variedad de especialidades médicas que mostraron interés, se priorizó el contacto directo con los médicos responsables de los casos; limitando el número de casos de cada institución participante. Participaron del proyecto 58 médicos agrupados en 32 instituciones de salud tanto públicas como privadas que incluyen principalmente Hospitales y laboratorios de análisis clínicos (Ver Anexo I). El grupo de análisis fue conformado por bioinformáticos y biólogos moleculares con experiencia en análisis de datos genómicos. En total se procesaron y analizaron 129 exomas correspondientes a 100 casos, con diagnósticos presuntivos de enfermedades asociadas a uno o unos pocos genes -como el síndrome de Sotos, epilepsia mioclónica

progresiva- a enfermedades con asociación a decenas (como desórdenes de glicosilación), o incluso centenas de genes -como las inmunodeficiencias primarias- (Ver listado completo de diagnósticos presuntivos en el Anexo II).

Para analizar el grado de éxito alcanzado, cada caso fue clasificado en una de las siguientes categorías de acuerdo al tipo y nivel de evidencia disponible para las variantes encontradas, y al grado de asociación clínica entre el diagnóstico presuntivo (o los síntomas) del probando y el fenotipo patológico reportado para defectos en el gen que las contenga: i) categoría 1, casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa (ClinSig 4 o 5) de asociación con el diagnóstico presuntivo ii) categoría 2, casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta (categoría 2A), o sola en un modelo de herencia dominante (categoría 2B). En caso de que se hayan encontrados dos variantes de estas características en el mismo gen en un modelo de heterocigosis compuesta se clasificó al caso como 2C. iii) Categoría 3, aquellos casos donde se encontró una variante nueva potencialmente patogénica en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico y iv) categoría 4, casos donde no se encontró ninguna variante relevante para ser informada.

Tabla 1: Clasificación de los casos de acuerdo a las categorías 1 a 4.

Categoría	Descripción	# de Casos	# de Variantes encontradas
1	Casos donde se encontró una o más variantes conocidas con evidencia previa de asociación con el diagnóstico presuntivo.	31	45
2	2A Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica, acompañada de una variante conocida en un modelo de heterocigosis compuesta.	27	6
	2B Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, una variante nueva potencialmente patogénica en un modelo de herencia dominante.		14
	2C Casos donde se encontró, dentro de los genes asociados al diagnóstico presuntivo, dos variantes nuevas potencialmente patogénicas en el mismo gen en un modelo de heterocigosis compuesta.		7
3	Casos donde se encontró una variante nueva potencialmente patogénica en genes con moderada asociación con el fenotipo clínico.	17	25
4	No se encontró ninguna variante relevante para ser informada.	25	0
Total	Total de casos secuenciados	100	136

De los 100 casos analizados durante la campaña (Tabla 2), 31 corresponden a la categoría 1, que consideramos como casos exitosos y que, dado el conocimiento previo de la variante y su asociación con el fenotipo patológico, representan un diagnóstico certero. Un ejemplo del mismo se presenta en la BOX1.

BOX 1. Caso categoría 1.

Un ejemplo de diagnóstico exitoso y certero lo comprende el caso de un paciente masculino adulto, aportado por el Dr. César Crespi del Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos San Juan de Dios de La Plata, con un diagnóstico clínico presuntivo para la enfermedad de Wilson, una patología autosómica recesiva que entre los síntomas principales presenta cirrosis hepática, niveles altos de cobre en orina, con anillos de Kayser-Fleischer y cataratas. Se procedió a secuenciar al probando y al padre, y se priorizo un panel de 11 genes. No se encontraron variantes relevantes en homocigosis por lo que se procedió a buscar la coincidencia de dos variantes heterocigotas en el mismo gen (modelo de heterocigosis compuesta).

Se encontraron en el probando dos variantes (una compartida con el padre) en el gen ATP7B, que codifica para la proteína transportadora de cobre ATPasa de tipo P, denominada también proteína de la enfermedad de Wilson, una proteína transmembrana altamente conservada evolutivamente que posee roles esenciales en la fisiología humana, relacionados con el metabolismo del Cobre. Individuos que carecen de proteína ATP7B funcional, evidencian grandes dificultades en las vías de excreción de cobre, dando lugar a la enfermedad de Wilson. Ambas variantes encontradas se encuentran reportadas en Clinvar como patogénicas (NM_000053.3(ATP7B):c.3207C>A; y NM_000053.3(ATP7B):c.3955C>T) y han sido relacionadas a la enfermedad de Wilson por varios autores [30-34], poseen una frecuencia alélica muy baja en la base de datos de ExAC (no existen individuos en homocigosis para ninguna de ellas) y son predichas como "disease causing" por los softwares de predicción de patogenicidad.

La primera variante corresponde a un cambio de histidina por glutamina en la posición 1069 de la proteína, ha sido ampliamente estudiada y es la mutación más frecuentemente asociada a la enfermedad de Wilson. El mecanismo por el cual la mutación afecta la función, se cree está asociado a la desestabilización del sitio de unión a ATP. La otra mutación generaría un codón de terminación prematuro, que se supone da origen a una proteína truncada no funcional. El hecho de que ambas mutaciones hayan sido previamente reportadas como patogénicas y asociadas a la enfermedad de Wilson, y su correcta cigosidad y segregación en el probando y su padre, resultan en un diagnóstico de máxima confianza.

En la categoría 2 clasificamos 27 casos. Estos son, desde una perspectiva de descubrimiento, los más interesantes, ya que representan aquellos donde se han encontrado variantes nuevas con un potencial significativo para explicar el fenotipo patogénico. En estos casos es fundamental la evaluación del potencial patogénico de la variante, para lo cual se consideran importantes diversos factores. Por un lado, se debe verificar que la variante posee una cigosidad correcta de acuerdo al modelo de herencia y verificación de la correcta segregación en el grupo familiar. Por

ejemplo, en casos de herencia autosómica dominante (AD) la misma debe estar presente en heterocigosis en el probando y ausente en ambos padres (y si hubiera hermanos) sanos. En casos de enfermedades recesivas (AR), usualmente, si no hay consanguinidad, se presenta un modelo de heterocigosis compuesta, donde cada una de las variantes encontradas, está presente en heterocigosis en el probando y en uno (y sólo uno) de los padres.

Por otro lado, es fundamental determinar el potencial patogénico de la variante desde una perspectiva molecular analizando su impacto a nivel del gen o la proteína. En el caso de variantes que introducen un stop prematuro o producen un cambio en el marco de lectura, es razonable suponer que las mismas den lugar a una proteína no funcional. En el caso de que la variante resulte en un cambio de aminoácido, se debe profundizar el análisis considerando el tipo de cambio de residuo, la conservación del mismo en términos evolutivos, la frecuencia poblacional de la variante (si la hubiere), la predicción de patogénicidad por parte de algoritmos bioinformáticos, y si hubiere un análisis del efecto de la misma sobre la estructura proteica. Idealmente, las variantes candidatas deben ser predichas como patogénicas por todas estas propiedades. Ejemplos de estos casos se presentan en el BOX 2, BOX 3 y BOX 4.

BOX 2. Caso Categoría 2A.

Paciente masculino con diagnóstico clínico tentativo de epilepsia mioclónica progresiva, aportado por el Dr. Santiago Chacón, del Hospital Centenario de Gualaguaychú, Entre Ríos. En base a toda su historia clínica, se confeccionó una lista de 65 genes a priorizar basándose en paneles existentes, genes extraídos de publicaciones científicas, y aquellos identificados mediante cruce de datos de distintas procedencias, tales como sintomatología del paciente y genes involucrados en patologías similares.

Al analizar el exoma del paciente se halló una variante en heterocigosis en el gen EPM2A, siendo éste uno de los dos genes responsables de la patología. La variante resultó causar el cambio de aminoácido arginina 108 por cisteína (c.322C>T) en la proteína laforina, la cual según Genetic Home Reference [35], parece jugar un rol fundamental en la supervivencia de las neuronas. El impacto de dicha variante sobre la estructura de la laforina puede observarse en la Figura 2, realizada mediante un análisis estructural de la proteína a nivel molecular. Dicha variante se encuentra descrita por Clinvar como variante patogénica para epilepsia mioclónica progresiva con código de acceso rs137852915. Por otra parte, en el mismo gen se halló una delección en carácter también heterocigota, no descrita previamente, la cual produce la pérdida de 11 aminoácidos, con el consiguiente corrimiento en el marco de lectura. Dicha delección se encuentra localizada dentro del dominio CBM20 amino terminal (family 20 carbohydrate-binding module) de la proteína laforina, y muy cerca del sitio de unión a maltohexosa.

En este contexto, si bien la delección de 11 aminoácidos no ha sido previamente informada (y por ende es de significado incierto), se encuentra en la región de unión a la maltohexosa, por lo que su efecto a nivel molecular y aparición en compañía de la otra variante patogénica ya reportada, ambas en heterocigosis, fortalecen la hipótesis de un caso de heterocigosis compuesta, siendo fuertes candidatas causales de la sintomatología presentada.

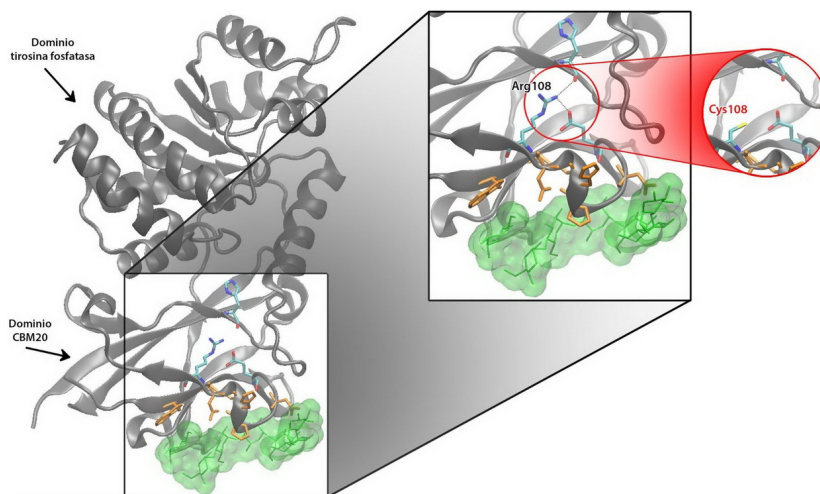


Figura 2: Representación de la estructura cristalográfica de la proteína laforina. Pueden observarse sus dos dominios: tirosina fosfatasa y CBM20. Este último posee un sitio de unión a maltohexosa un azúcar (resaltada en verde), y los aminoácidos involucrados en la unión de dicha molécula se encuentran resaltados en naranja. En la vista ampliada, puede verse cómo la Arg108 contribuye, mediante interacciones de puente de hidrógeno con otros residuos, a la estabilización de la estructura terciaria de CMB20. En la región resaltada en rojo puede observarse que la mutación Arg108 -> Cys imposibilita la formación de los puentes de hidrógeno mencionados, lo cual desestabiliza la estructura del sitio de unión a maltohexosa, resultando en una proteína no funcional.

BOX 3. Caso Categoría 2B

Paciente masculino con diagnóstico clínico tentativo de Disregulación Inmune no caracterizada, aportado por la división de Inmunología del "Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan", sin un modelo de herencia definido. En base a análisis genéticos previos, los profesionales ya habían descartado la presencia de mutaciones en 4 genes (ALP, CASP8, CASP10, FAS) relacionados con los síntomas del paciente. Confeccionamos una lista de genes candidatos, tomando como punto de partida los genes causantes de más de 150 formas distintas de inmunodeficiencias primarias, a los que agregamos panel de genes para Linfocitosis congénita de células B y genes contenidos en paneles comerciales para disregulaciones inmunes. En total el panel de genes a priorizar contenía 207 genes. Realizando filtros en las variantes obtenidas de este conjunto de genes, (frecuencia poblacional menor al 1%, heterocigosis e impacto alto/moderado) se encontró una variante de tipo missense dentro de la región codificante del gen CARD11 (Caspase Recruitment Domain family member 11).

La variante encontrada produce el cambio de la treonina 117 por una prolina (p.Thr117Pro, NM_032415(CARD11):c.349A>C) y es considerada como patogénica por los predictores bioinformáticos SIFT, Polyphen y Mutation Taster; habiéndose reportado previamente en bibliografía un cambio aminoacídico en la misma posición (p.Thr117Ala) también en heterocigosis, en un paciente con un trastorno genético poco frecuente asociado con linfocitosis congénita de células B [36]. La prolina es un aminoácido no cargado que tiende a rigidizar la estructura y afectar, de esta forma, la función de la proteína resultante. Mutaciones similares en CARD11 han sido asociadas a la ganancia de función de un dominio funcional de la proteína, que normalmente desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la misma en un estado inactivo, activando en las mutantes espontáneamente a NF- κ B y promoviendo la supervivencia de células B humanas de linfoma in vitro [37]. El gen CARD11 se encuentra asociado con el desarrollo de "Expansión de células B con NFKB y anergia de células T" (OMIM: 616452); trastorno con el que el paciente presenta muchos síntomas solapados, y en un modelo Dominante, consistente con la cigosidad de la variante encontrada. De esta forma, se la considera como potencialmente responsable del fenotipo observado con un alto grado de confianza, si bien es una variante novel y por lo tanto de significado incierto.

BOX 4: Caso Categoría 2C

Un ejemplo de esta categoría lo comprende el caso de un paciente femenino adulto con un diagnóstico clínico presuntivo de síndrome atáxico-oculomotor de tipo 2 (OMIM: 606002), una patología autosómica recesiva que presenta varios síntomas neuromotores. Para analizar el mismo se secuenció al probando y se analizó un panel de 222 genes. No se encontraron variantes relevantes en homocigosis, por lo que se procedió a buscar la coincidencia de dos variantes heterocigotas en un mismo gen (modelo de heterocigosis compuesta). Con este modelo de herencia, se encontraron dos variantes noveles en el gen SETX (OMIM: 608465), un gen que codifica para la proteína senataxina y se expresa en un amplio rango de tejidos, incluyendo el cerebro, la médula espinal y los músculos. La primera variante (p.Ser507fs: c.1518dupA) es de alto impacto funcional, ya que produce el corrimiento del marco de lectura por la adición de un nucleótido; mientras que la segunda (p.Val2385Gly: c.7154T>G) es una variante de cambio de aminoácido, de una valina a una glicina, un aminoácido más pequeño y no quiral. Ambas variantes son predichas como "disease causing" por "Mutation Tester". Mutaciones reportadas en este gen están asociadas al desarrollo de un trastorno neurodegenerativo caracterizado por el inicio en la edad adulta de ataxia cerebelosa progresiva, neuropatía periférica senso-motora axonal y aumento de la alfa-fetoproteína sérica [38,39], síntomas que se solapan con la Historia Clínica del probando.

En resumen, la predicción del efecto patogénico de ambas variantes y su presencia en el principal gen candidato, sugieren fuertemente que ambas variantes combinadas podrían ser las responsables del fenotipo observado.

La categoría 3, con 17 casos, comprende aquellos que representan hipótesis de trabajo, tanto clínicas como moleculares. En estos casos, si bien se han encontrado variantes de significado incierto, éstas son desde el punto de vista molecular potencialmente patogénicas cumpliendo la mayoría de los criterios de análisis a nivel gen y/o proteína. En este contexto, los pasos a seguir son por un lado verificar la correcta segregación y cigosidad de la variante en el grupo familiar y en concordancia con el modelo de herencia de la enfermedad, si el mismo estuviera establecido. Por otro lado, se podría -al igual que con los casos de la categoría 2- avanzar con ensayos in-vitro para analizar el efecto de la mutación sobre la función proteica. En relación con la clínica, el objetivo debe tender a una revisión del solapamiento entre los síntomas presentados por el paciente, y aquellos reportados para otros pacientes con defectos en el gen que contiene la(s) variante(s). Un ejemplo de un caso con este tipo de resultados se presenta en el BOX 5.

BOX 5. Caso Categoría 3

Paciente pediátrico masculino sin antecedentes familiares relevantes, cariotipo normal y diagnóstico tentativo de Síndrome de Sotos, un desorden autosómico dominante caracterizado, entre otros síntomas, por macrocefalia y crecimiento corporal excesivo en la infancia acompañado de retraso mental, problemas de conducta e hipotonía. La mayoría de los casos de síndrome de Sotos (95%) se producen por mutaciones de novo en el gen NSD1, o deleciones en la región 5q35.3, en la persona afectada. También se reportan algunos casos para mutaciones heterocigotas en el gen NFIX, o mutaciones en el gen APC2, en este último caso siguiendo un modelo autosómico recesivo.

A partir de la secuenciación exómica del probando se buscaron, en un primer momento, variantes presentes en los tres genes reportados para el síndrome Sotos, sin encontrarse ninguna con relevancia clínica. Extendiendo la búsqueda a genes asociados a los síntomas reportados en la historia clínica del probando se encontró una variante novel en heterocigosis (NM_000264(PTCH1):c.1906A>G), en el gen PTCH1, que se traducen en el cambio aminoacídico de asparagina por ácido aspártico en la posición 636 de la proteína Patched-1. Mutation Taster la reporta como patogénica. El gen PTCH1 es considerado un gen supresor de tumores por su rol en la prevención de la proliferación celular incontrolada. Dentro de las patologías asociadas a este gen se encuentra el síndrome de Gorlin o Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) (OMIM #109400) y es considerada por la bibliografía como una condición que puede confundirse con Síndrome de Sotos [40]. Existe un solapamiento fenotípico moderado con los signos y síntomas del probando, aunque es posible que algunos de ellos que permitan la realización de un diagnóstico diferencial aún no se hayan desarrollado, dada la edad pediátrica del paciente. El síndrome NBCCS presenta herencia autosómica dominante que es compatible con la variante del probando. De esta forma, la variante encontrada se considera como potencialmente responsable del fenotipo observado, si bien es una variante novel y por lo tanto de significado incierto. Una vez informada al médico la analizará junto a la evidencia clínica para validar o rechazar el nuevo diagnóstico hipotético; de ser confirmado, permitirá acompañar la evolución del paciente de manera eficiente.

Finalmente, la categoría 4 comprende aquellos 25 casos donde no se ha encontrado ninguna variante que pueda explicar el fenotipo observado. Estos casos, si bien se los puede considerar abiertos, la falta de una hipótesis de trabajo luego de un análisis exhaustivo, que puede involucrar dos o hasta tres ciclos de evaluación de genes candidatos, sugiere que poseen una causa molecular subyacente que no ha podido ser determinada por la técnica utilizada.

Discusión

Los resultados de la iniciativa “100 Exomas”, si bien no representan una cantidad de casos suficientes como para realizar afirmaciones estadísticamente significativas sobre la capacidad de la secuenciación exómica para diagnosticar de manera precisa las causas moleculares de las EPoFs o para avanzar en el descubrimiento de nuevos genes y variantes patogénicas, permiten evaluar en las capacidades locales, con sus virtudes y dificultades, para la implementación de estas tecnologías en contextos de investigación científica e innovación clínica, y compararlos con experiencias realizadas en los países del denominado “primer mundo”. Para llevar adelante la campaña, armamos un protocolo de trabajo con una fuerte base interdisciplinaria, desde los médicos responsables de los casos clínicos a biólogos, bioinformáticos y expertos en computación, que permitió un entendimiento completo y exhaustivo de las características fenotípicas del paciente a las causas moleculares intrínsecas.

Si consideramos aquellos casos donde se encontraron variantes de asociación clínica conocida (categoría 1) o con altas chances de ser patogénicas (categoría 2) como exitosos, vemos que la tasa de éxito es superior al 50%, lo que es levemente superior a lo reportado en la literatura [6]. La aparente performance superior podría deberse a dos motivos: ya sea una selección más sesgada de los casos con alta chance de obtener un diagnóstico y/o la definición de caso exitoso. Si, por ejemplo, consideramos como casos exitosos sólo aquellos incluidos en la categoría 1, entonces el porcentaje de casos que han llegado a un diagnóstico se acerca más al 30%, que es el valor usualmente tomado como de referencia para análisis exómico.

Desde una perspectiva de ciencia básica, los casos más interesantes son los de categoría 2, donde se encuentran una (o dos) variantes novedales, con una alta chance de ser responsable del fenotipo observado. Estas variantes muchas veces representan el punto de partida para el estudio de los fenómenos moleculares subyacentes al desarrollo patológico, al señalar cómo su efecto sobre la función proteica repercute en la fisiología molecular y celular. Un ejemplo exitoso de este tipo de caso, derivado de la presente campaña, es el de una inmunodeficiencia combinada que se origina en una mutación en heterocigosis en el gen CARD11, la cual comprende una inserción de 14 aminoácidos. La misma fue estudiada en colaboración con un grupo del Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH), junto con otras tres mutaciones, todas en heterocigosis en diferentes dominios de CARD11, mostrando que el efecto patogénico se debía a una pérdida de función con interferencia sobre la proteína salvaje. Esto dió lugar a un cuadro autosómico dominante, que puso en evidencia detalles del funcionamiento de diferentes vías de señalización de los linfocitos T, algo que culminó en un trabajo en la prestigiosa revista Nature Genetics [9].

Otros de los casos de esta categoría que han dado lugar a resultados del mismo tipo se encuentran actualmente siendo analizadas en el grupo y en el marco de colaboraciones nacionales e internacionales.

Es interesante también analizar cuáles son los motivos subyacentes que resultan en casos donde no se ha llegado al diagnóstico molecular, es decir, aquellos casos de categoría 3 o 4 donde falle la hipótesis, no se confirme la asociación propuesta entre genotipo (variante) y fenotipo del paciente y/o la variante propuesta no segregue adecuadamente en el grupo familiar. En este sentido, hay diversos motivos asociados a un resultado de este tipo, dependiendo principalmente de la naturaleza del caso. En algunos casos puede suceder que las mutaciones responsables no fueron reveladas por el tipo de experimento de secuenciación, ya sea por que están en exones pobremente capturados y/o regiones no codificantes o porque corresponden a inserciones o deleciones de tamaño superior al que puede ser determinado por la secuenciación exómica (comúnmente conocidas como variaciones en el número de copias). En estos casos la única posibilidad para avanzar hacia el diagnóstico es realizar una secuenciación genómica completa. En otros casos, un resultado de este tipo puede estar asociado a la falta de mejores -en términos de la precisión sintomatológica- relaciones genotipo-fenotipo. Este área es una de las de mayor expansión, y existen varias iniciativas internacionales para promover su desarrollo. Una de ellas, PhenomeCentral es un portal centralizado que permite cargar casos de EPoF no resueltos. Dicho portal utiliza un sistema automático para evaluar similitud de fenotipos y alertar a los investigadores sobre las coincidencias halladas para, mediante la evaluación de múltiples casos y cooperación internacional, poder reforzar hipótesis de asociación variante-fenotipo y/o avanzar hacia ensayos de validación funcional.

Finalmente, resulta relevante evaluar los resultados de la campaña desde una perspectiva asociada al trabajo conjunto de los distintos tipos de profesionales, con sus experiencias y conocimientos especializados requeridos para la implementación de un servicio de diagnóstico genómico. La experiencia de esta campaña permite darle peso y reforzar la siguiente filosofía de trabajo interdisciplinario: si bien la división de tareas es un proceso lógico, práctico y adecuado para muchos trabajos, tales como el relevamiento de la historia clínica por parte del médico, la toma y procesamiento de la muestra por el bioquímico de laboratorio, el procesamiento de datos por parte del bioinformático, la priorización de variantes por parte de bioquímicos/biólogos moleculares y finalmente la interpretación de las mismas y devolución al paciente por parte del médico; la eficiencia y las chances de éxito se maximizan cuando todos los profesionales trabajan en conjunto. Particularmente, esto sucede con mayor hincapié en la etapa de priorización e interpretación de las variantes, la cual requiere integrar conocimientos asociados al experimento de NGS (cobertura, profundidad, calidad de la variante, entre otras), al impacto a nivel molecular de la misma y, por supuesto, a su potencial relación con la clínica. En este contexto, a través de esta experiencia, se destaca que la mayor probabilidad de éxito se asocia a un diagnóstico presuntivo preciso, y a un profundo conocimiento por parte del equipo médico de los genes y variantes patogénicas conocidas en casos similares. Todo esto contribuye a evidenciar y reforzar la importancia de brindar, a nuestros futuros médicos, conocimientos y capacitación en el área de la genómica clínica.

Perspectivas Futuras

El desarrollo exitoso de la campaña “100 Exomas” sirve, en una primera instancia, como prueba de concepto de que es posible implementar a nivel local servicios de diagnóstico molecular basados en secuenciación de próxima generación. Dicha implementación se sustenta en el conocimiento y capacidad de los profesionales locales, y es un ejemplo que puede servir como semilla para extenderlo a escala regional. Esta prueba de concepto es fundamental para la nacionalización de este tipo de servicios que hoy en día se encuentran disponibles internacionalmente. Para avanzar en este sentido, es inminente ampliar la red de profesionales capacitados con acceso a estas tecnologías, para lo cual es necesario un continuo flujo de fondos que permitan cubrir los gastos asociados a la secuenciación. En este contexto, es importante destacar la reciente adquisición por parte de diversas instituciones públicas y privadas nacionales de equipos de NGS con capacidad para realizar secuenciación exómica. También es relevante mencionar iniciativas como las “Escuelas de genómica clínica” (<http://www.celfi.gob.ar/programas/detalle?p=48>) financiadas por el MINCYT en el marco del programa CELFI, coordinadas por los autores del presente trabajo, las cuales buscan reunir y sobre todo capacitar a investigadores y profesionales interesados en el área.

Agradecimientos

Agradecemos a todos los médicos, instituciones y pacientes que participaron del proyecto (Anexo I), a Bitgenia, al CONICET y la Universidad de Buenos Aires.

Referencias:

1. Nemirovsky SI, Córdoba M, Zaiat JJ, Completa SP, Vega PA (2015) Whole genome sequencing reveals a de novo SHANK3 mutation in familial autism spectrum disorder. *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116358>
2. Ma CA, Stinson JR, Zhang Y, Abbott JK, Weinreich MA, Hauk PJ et al (2017) Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nature Genetics* 49: 1192–1201
3. Natrajan R, Reis-Filho JS (2011) Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostic* 11: 425-444. Ng SB, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J (2010). Massively parallel sequencing and rare disease. *Human Molecular Genetics* 19: R119-124.
4. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER (2013) The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155(1):27-38. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.006.
5. Ku, CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R (2012) Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Annals of Neurology* 71: 5-14.
6. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald MD, et al (2014) The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genetics in Medicine* 16: 176–182. doi:10.1038/gim.2013.99
7. Rabbani, N, Mahdieh, K, Hosomichi, H, Nakaoka, I, Inoue I (2012) Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *Journal of Human Genetics* 57 (10) :621-32. 8. Yang Y, Muzny DM, Reid JG et al (2013) Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *New England Journal of Medicine* 369: 1502-1510.
9. Orphanet: an online rare disease and orphan drug database. Copyright, INSERM 1997. Disponible en <http://www.orpha.net>. Accessed : August 21, 2017.
10. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), August 17, 2017. World Wide Web URL: <https://omim.org>
11. Organización Mundial De La Salud. Consejo Ejecutivo EB116/3. 116a reunión 21 de abril de 2005. Control de las enfermedades genéticas.
12. Baudhuin LM, Donato LJ, Uphoff TS (2012) How novel molecular diagnostic technologies and biomarkers are revolutionizing genetic testing and patient care. *Expert Review of Molecular Diagnosis* 12: 25-37.
13. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics* 12, 745-755.
14. Xue Y, Ankala A, Wilcox W, Hegde M (2015) Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/ genome sequencing. *Genetics in Medicine* 17(6):444-51. doi: 10.1038/gim.2014.122.
15. Hong H, Zhang W, Shen J, Su Z, Ning B et al (2013) Critical role of bioinformatics in translating huge amounts of next-generation sequencing data into personalized medicine. *Science China Life Sciences* 56 (2): 110-118.
16. Li H, Durbin R (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760.
17. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis, K et al (2010) The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 20(9): 1297-1303.
18. De Pristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, et al (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics* 43(5): 491-498.
19. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, et al (2013). From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics*, 11-10.
20. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen, T Wang L et al. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms. SnpEffSNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 6(2): 80-92
21. Cingolani P, Patel V M, Coon M, Nguyen T, Land S J, Ruden D M, Lu X (2012) Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift. *Frontiers in genetics* <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00035>
22. Lek M, Karczewski K J, Minikel E V, Samocha K E, Banks E, Fennell, T et al (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536(7616): 285-291.
23. 1000 Genomes Project Consortium.(2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571): 68-74.
24. Landrum MJ, Lee J M, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S. et al (2015) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research* 44(D1), D862-D868.
25. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics* 7-20.
26. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4(7): 1073-1081.
27. Schwarz JM, et al. (2010) Mutation Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods* 78: 575-576.
28. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*: 17(5): 405-424.
29. Holzer F, Mastroleo I (2017) Ethical aspect in precision medicine: an introduction to the ethics and concept of clinical innovation. In *Precision Medicine : Tools and Quantitative Approaches USA: Academic Press Inc.*
30. Rodriguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P (2008) Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *Journal of Molecular Biology* 28: 383(5):1097-111. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.065.
31. Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P (2002) Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *American Journal of Medical Genetics* 15:108(1):23-8.
32. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW (1995) The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics*. 9(2):210-7. Erratum in: *Nature Genetics* 9(4):451.
33. Czlonkowska A, Rodo M, Gajda J, Ploos van Amstel HK, Juyn J, Houwen RH (1997) Very high frequency of the His1069Gln mutation in Polish Wilson disease patients. *Journal of Neurology* 244(9):591-2.
34. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Büttner J, Schmidt H (2008) Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *Journal of Human Genetics* 53(8):681-7. doi: 10.1007/s10038-008-0298-7.
35. Genetic Home Reference, National Library of Medicine (NLM). World Wide Web URL: <https://ghr.nlm.nih.gov/>
36. Chan W, Schaffer TB, Pomerantz JL (2013) A quantitative signaling screen identifies CARD11 mutations in the CARD and LATCH domains that induce Bcl10 ubiquitination and human lymphoma cell survival *Molecular and Cell Biology* 429-43. doi: 10.1128/MCB.00850-12.
37. Brohl AS, Stinson J, Su HC, Badgett T, Jennings CD, Sukumar G et al (2015) CARD11 mutation in a patient with severe congenital B cell lymphocytosis *Journal of Immunology* 35: 32-46
38. Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, and 28 others (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature Genetics* 36: 225-227..
39. Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H et al (2013) Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *Journal of Neurology. Neurological Science* 331: 158-160.
40. Tatton-Brown K, Trevor RP, Rahman, N. (2004) Sotos Syndrome. World Wide Web URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1479/>

Anexo I: Listado de Profesionales e instituciones que han contribuido al presente trabajo y participado de la campaña 100 exomas.

Bioq. Mónica Natale, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez
Dr. Cesar Crespi, Hospital San Juan de Dios
Dr. Christian Martín Moya, Hospital Público de Autogestión Dr. Arturo Oñativia
Dr. Claudio Cantisano, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde
Dr. Cristian Ricardo Calandra, Hospital de Clínicas

Dr. Ernesto Veber, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde
Dr. Jorge Ota, Rosario. Santa Fe
Dr. Juan Nicola, CIBICI, CONICET, Univ. Nacional de Córdoba
Dr. Marcelo Rugiero, Hospital Italiano de Buenos Aires
Dr. Matías Juanes, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Dr. Matías Oleastro, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Dr. Rodrigo Mendez, CENAGEM
Dr. Santiago Chacon, Hospital Centenario de Gualeguaychú, Entre Ríos
Dr. Sebastián Gacio, Instituto de Neurociencias, Universidad Favaloro. Hospital Fernández
Lic. Rodrigo Fernando Ernesto Bogado, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones Dra. Alejandra Chaves, Hospital de Niños de Córdoba
Dra. Andrea Solari, CENAGEM
Dra. Andrea Vanesa Soto, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones
Dra. Carla Asteggiano, Hospital de Niños de Córdoba
Dra. Cecilia Montes, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba
Dra. Claudia Arberas, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez
Dra. Emilia Gatto
Dra. María Dolores Mansilla, Hospital Roffo
Dra. Inés Noher de Halac, CEMECO, Córdoba.
Dra. Lia Mayorga, IHEM (CONICET-UNCuyo) Mendoza
Dra. Lilién Chertkoff, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Dra. Mariana Guzmán, CEMIC
Dra. María Eugenia Heis Mendoza, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones
Dra. Rossana Espindola, Instituto de Genética Humana - IGeHM, Misiones
Dra. Silvia Danielian, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Dra. Vanesa Zaslavsky, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde
Dra. Virginia Bañares, CENAGEM

Anexo II: Listado de diagnósticos presuntivos asociados a los casos campaña.

Albinismo Ocular Ligado al X.
Anemia hemolítica
Artrogriposis vs Cutis laxa Ataxia
Atrofia Espinal Congénita
Baraitser-Winter syndrome 1 or 2
CAMRQ
Cardiopatía Congénita
CDLS - Cornelia de Lange
Charcot Marie Tooth
Cowden
Desorden Congénito de Glicosilación (CDG-X)
Displasia Ectodérmica
Distonía, sensible a la L-Dopa (DRD)
Encefalopatía epiléptica
Enfermedad de Parkinson Juvenil
Enfermedad mitocondrial por depleción de ADN mitocondrial (genes de mantenimiento del ADNmt)
Epidermolisis bullosa de la unión - tipo Herlitz
Epilepsia mioclónica
Hallermand-Streiff Syndrome
Hipercolesterolemia familiar homocigota
Hipomagnesemia severa
Hipotiroidismo congénito dishormonogénico causado por la inhabilidad de la glándula tiroides de acumular yoduro.
Hipotonía, Macrocefalia
Inmunodeficiencia Combinada
Inmunodeficiencia Primaria con Susceptibilidad Hereditaria al infección por Epstein Barr Virus (EBV)
Insuficiencia hipofisaria combinada con respuesta deficiente al tratamiento con hormona del crecimiento
Li Fraumeni
Linfedema Primario Congénito (LPC)
Lipofuscinosis Ceroidea
Lupus Pernio Familiar
Nefrocalcinosis
Osteogénesis Imperfecta Tipo 3
Paciente sindrómico, con manchas café con leche, Restricción del Crecimiento IntraUterino (RCIU) y dismorfias.
Paraparesia espástica hereditaria
Parkinsonismo/Hipotonía
Retraso de crecimiento, retraso madurativo, malformaciones esqueléticas
Síndrome de Angelman atípico
Síndrome de Asperger
Síndrome de Disregulación inmune no caracterizado
Síndrome de Gitelman
Síndrome de Hiper IgM

Síndrome de Intolerancia al Ejercicio (o esfuerzo) y rabdmiolisis recidivante.
Síndrome de Malabsorción
Síndrome de Noonan
Síndrome de RETT
Síndrome de Sotos
Síndrome de Temple Baraitser
Síndrome de Wilson
Síndrome Myhre - Poliposis Familiar juvenil
Síndrome progeria Hutchinson-Gilford



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista *QuímicaViva*

Número 1, año 18, Abril 2019

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos etanólico y acuoso de hojas de *Calotropis procera* (Aiton) Dryand.

Mijail Mijares Bullaín Galardis¹, Raúl Carlos López Sánchez¹, Roberto Carlos Muñoz Leyva², José Ángel Morales León³, Róbinson Hermosilla Espinoza³

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal y ²Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. ³Centro de estudios de Química Aplicada. Facultad de Ciencias Técnicas. Universidad de Granma. Peralejo. Provincia Granma. Cuba.

mbullaing@udg.co.cu

Recibido: 12/03/2019 - Aceptado: 14/03/2019

Resumen

En Cuba *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. se emplea como planta medicinal. De las hojas se obtuvieron los extractos etanólico y acuoso mediante la extracción asistida por ultrasonido y se llevaron a sequedad por rotoevaporación. La actividad antibacteriana y antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby con modificaciones. Los extractos no mostraron actividad frente a las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*; y tampoco inhibieron el crecimiento de las levaduras *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. El tamizaje fitoquímico preliminar mostró la presencia de grupos de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana pero en pequeñas cantidades lo que pudo influir en los resultados obtenidos.

Palabras clave: *Calotropis procera*, actividad antibacteriana, actividad antifúngica, tamizaje fitoquímico

Summary

In Cuba *Calotropis procera* (Aiton) Dryand is used as a medicinal plant. From the leaves, the ethanolic and aqueous extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction and brought to dryness by rotoevaporation. The antibacterial and antifungal activity of the extracts was evaluated by means the diffusion method in agar by superficial disc dissemination of Bauer-Kirby with modifications. The extracts showed no activity against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*; and they also did not inhibit the growth of the yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The preliminary phytochemical screening showed the presence of groups of secondary metabolites with antimicrobial activity but in small quantities which could influence the results obtained.

Keywords: *Calotropis procera*, antibacterial activity, antifungal activity, phytochemical screening

Introducción

Desde tiempos inmemoriales, en las diferentes culturas, el hombre ha utilizado las plantas medicinales para tratar y curar diversas enfermedades causadas por microorganismos patógenos. En la actualidad se observa un fenómeno de multirresistencia a los agentes antimicrobianos convencionales debido, entre otras causas, a su uso indiscriminado.

Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales [1].

Debido a esta problemática, una de las más serias que enfrenta la ciencia médica en la actualidad, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han promovido el desarrollo de programas para la identificación, investigación, cultivo y conservación de plantas medicinales como fuente natural de principios activos para la obtención de nuevos agentes antimicrobianos.

Para realizar este trabajo resulta importante tener en cuenta el conocimiento empírico acumulado por la población en cuanto al manejo y uso de estas especies de plantas e incorporar los conocimientos técnicos especializados para optimizar estos procesos y favorecer de forma efectiva la conservación de estos importantes recursos filogenéticos [2].

La flora cubana es muy rica y variada, presenta más de un 50% de endemismo y, en algunas zonas entre el 70% y 80% de las especies tienen propiedades medicinales, sin embargo, ha sido poco estudiada, lo que ha limitado su explotación y aprovechamiento [3-5].

Calotropis procera (Aiton) Dryand., de la familia Apocynaceae, es conocida por los nombres comunes algodón de ceda, bomba, tula [6], algodón de la India [7], en Cuba se le nombra algodón americano, algodón de Judea, algodón de seda, algodón de playa, árbol de Judea, árbol de seda, cazuela, estrella de Holanda y estrella del norte [8].

Las raíces, el látex y la corteza de las raíces de la planta se emplean en la medicina tradicional para inducir el vómito y como laxante natural. Es también utilizada para combatir los síntomas provocados por diferentes enfermedades cutáneas (lepra, infecciones cutáneas bacterianas) y otras enfermedades como la sífilis [9]. Se le atribuyen también propiedades antiinflamatorias y antisépticas [10].

Los reportes hallados en las fuentes consultadas sugieren que los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera* representan actividad antibacteriana y antifúngica.

Materiales y métodos

Colecta, identificación y selección del material vegetal

La colecta del material vegetal se realizó el 20 de mayo de 2018 en Blanquital, municipio Manzanillo, provincia Granma, Cuba (coordenadas 20°20'43.476" N -77°5'4.416") a las 8:00 am., a una temperatura de 32°C y una humedad relativa de 78%.

La planta fue identificada en el Jardín Botánico Cupaynicú, por el Dr. C. Luis Catasús Guerra, (número de Voucher: 251)[11].

La clasificación del material vegetal se realizó según la NRSP 309 [12]. Se desecharon las hojas que no reunían las condiciones para ser utilizadas en la investigación. La desinfección se realizó según el procedimiento reportado por Carballo y col [13], con modificaciones: lavado con agua potable e inmersión en disolución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos.

Las hojas se secaron a la sombra sobre planchas de cartón perforadas durante 10 días removiendo el material tres veces al día, y luego en una estufa universal (Memmert UNB 200, Alemania) con circulación de aire a 40°C durante 3 horas. Se obtuvo un polvo empleando un molino (IKA, modelo MF 10 Basic, Alemania).

Obtención de los extractos

50 g del polvo de las hojas se humectaron con etanol al 70 % y con posterioridad se adicionaron 250 mL de la misma solución. Se realizó una extracción asistida por ultrasonido (Ultrasonic Cleaner SB-120DT, China) a una temperatura de 40°C, frecuencia de 40 KHz durante dos horas [14,15]. Luego de la extracción se retiró el extracto etanólico del balón y se dejó reposar el material vegetal durante 24 horas a temperatura ambiente. El procedimiento fue repetido empleando agua como disolvente. Como resultado se obtuvieron los extractos etanólico y acuoso.

Los extractos se filtraron a presión reducida y se almacenaron en recipientes de color ámbar, se dejaron en reposo durante 48 horas a 8°C, transcurrido este tiempo se filtraron.

Obtención de los extractos secos

Los extractos secos fueron obtenidos mediante un procedimiento de evaporación rotatoria a 60rpm. Se utilizó un rotoevaporador (IKA, RV10 digital, Alemania) conectado a un baño con termostato (IKA, HB10, Alemania), un termostato de refrigeración y recirculación (LAUDA ALPHA RA 24, Alemania) y una bomba de vacío (PC 500 series, Alemania).

Evaluación de la actividad antibacteriana

El ensayo se realizó en una cabina de flujo laminar vertical (FASTER, TWO 30, Italia) por el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby [16,17], con modificaciones.

Los inóculos se elaboraron de colonias aisladas incubadas por 24 horas, se ajustaron al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL).

La inoculación de las placas se realizó mediante la siembra en césped sobre agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 4100001) (pH 7,3 \pm 0,2) con hisopos con punta de algodón estériles.

Fue utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente para obtener disoluciones stock de cada extracto a una concentración de 248 mg/mL.

Sobre una placa de Petri se colocaron discos de papel de filtro (MACHEREY-NAGEL, Alemania) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados y se les adicionó 5 μ L de la disolución stock cargándolos con 1240 μ g/disco. Con la ayuda de una pinza se situaron los discos impregnados de cada extracto sobre las placas previamente inoculadas.

Las placas inoculadas y con los discos cargados de ambos extractos se incubaron a 37 \pm 0,1 °C durante 24 horas en una incubadora (Memmert INB 200, Alemania). Las zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de los discos fueron medidas en milímetros.

Se utilizaron como controles negativos, discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 5 μ L de DMSO; y como controles positivos, discos de los antibióticos comerciales Azitromicina, Ciprofloxacina y Gentamicina (Sensi-Disc, Francia) de 15, 5 y 10 μ g/disco, respectivamente. Los resultados se declararon como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento. A cada tratamiento se le realizaron tres repeticiones.

Bacterias evaluadas

Se emplearon cinco géneros bacterianos, dos de referencia internacional, depositadas en el American Type Culture Collection (ATCC) y dos salvajes aisladas en el Centro de Higiene y Epidemiología del municipio Manzanillo, provincia Granma.

- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633)
- *Escherichia coli* (salvaje)
- *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)
- *Staphylococcus aureus* (salvaje)

Evaluación de la actividad antifúngica

El método empleado fue difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby [18].

Fueron utilizadas las levaduras *Candida albicans* (salvaje), aislada en el Centro de Higiene y Epidemiología del municipio Manzanillo, provincia Granma, Cuba y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763). La siembra e inoculación de las placas con *Candida albicans* se realizó en agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 4100001) (pH 7,3 \pm 0,2) suplementado con 2 % de glucosa y 0,5 μ g/mL de azul de metileno, mientras que la siembra e inoculación de las placas con *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en agar dextrosa Sabouraud (BioCen, Cuba, lote: 3500004) (pH 5,6 \pm 0,2). Los inóculos se elaboraron de colonias aisladas incubadas por 24 horas, se ajustaron al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Las placas inoculadas y con los discos cargados con los extractos a evaluar se incubaron durante 48 horas a 29 \pm 1°C. Se utilizó como control negativo el mismo que se empleó en la evaluación de la actividad antibacteriana y como

control positivo, discos del antifúngico Fluconazol de 30 µg/disco (Sensi-Disc, Francia). El ensayo se realizó por triplicado bajo estrictas condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar vertical (FASTER, TWO 30, Italia).

Tamizaje fitoquímico

Se realizó para identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera*, los ensayos realizados fueron los establecidos para cada extracto teniendo en cuenta el solvente empleado en su extracción según la metodología empleada por Rondina y Coussio [19] y Sandoval y Suárez [20].

Resultados

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad bacteriana de los extractos de las hojas de *C. procera* son reportados en la Tabla 1. Como se observa, estos productos son inactivos frente a las cepas ensayadas.

Tabla 1: Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *C. procera*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a cepas bacterianas			
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) Gram-positiva X ± S	<i>Staphylococcus aureus</i> (Salvaje) Gram-positiva X ± S	<i>Escherichia coli</i> (Salvaje) Gram-negativa X ± S	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) Gram-negativa X ± S
etanólico	-	-	-	-
acuoso	-	-	-	-
gentamicina	26,3±0,6	18,7±0,6	19,3±0,6	18,3±0,6
ciprofloxacina	16,3±0,6	21,3±0,6	-	19,0±1,0
azitromicina	18,3±0,6	27,7±0,6	-	17,3±0,6
DMSO	-	-	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO:dimetilsulfóxido; X: media; s: desviación estándar.

El dimetilsulfóxido, solvente empleado para resuspender los extractos y utilizado como control negativo en el ensayo no inhibió el crecimiento bacteriano, lo que sugiere que su empleo en la obtención de las disoluciones stock no alteró los resultados obtenidos.

Los antibióticos comerciales empleados como controles positivos se comportaron según lo esperado ya que las cepas bacterianas empleadas en este ensayo mostraron la resistencia y sensibilidad previstas. Esto indica que las condiciones en que se realizó el ensayo y los procedimientos realizados cumplieron las normas establecidas.

De igual modo, los extractos tampoco inhibieron el crecimiento de las levaduras empleadas en el estudio (Tabla 2).

Tabla 2: Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las hojas de *C. procera*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a levaduras	
	<i>Candida albicans</i> (Salvaje) X ± S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763) X ± S
etanólico	-	-
acuoso	-	-
fluconazol	18,3±0,6	22,3±0,6
DMSO	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO:dimetilsulfóxido; X: media; s: desviación estándar.

Tanto en la evaluación de la actividad antibacteriana como en la antifúngica, el dimetilsulfóxido no inhibió el crecimiento de las cepas empleadas, por consiguiente, es un disolvente adecuado para la elaboración de las disoluciones stock. El fluconazol, utilizado como control positivo se comportó según lo previsto al inhibir el crecimiento de ambos microorganismos.

El tamizaje fitoquímico practicado demostró que los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta son alcaloides, aminoácidos libres, azúcares reductores, fenoles, flavonoides, quinonas, resinas, saponinas, taninos y triterpenos (Tabla 3).

Tabla 3: Tamizaje fitoquímico realizado a los extractos acuoso y etanólico de hojas de *C. procera*.

Metabolitos	Hojas	
	Ac	Et
Alcaloides	+	+
Aminoácidos libres		+

Antocianinas		-
Azúcares reductores	-	+
Coumarinas		-
Esteroles		-
Fenoles	+	+
Flavonoides	+	+
Mucílagos	-	
Quinonas		+
Resinas		+
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Triterpenos		++

Ac: Extracto acuoso; Et: Extracto etanólico; (-): Ausente; (+): Presente; (++): Abundante; (en blanco): No se realizó el ensayo.

Discusión

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de *C. procera* confirman los estudios anteriores de Mossa y col (1991) que plantearon que los extractos de *C. procera* están desprovistos de cualquier actividad antibacteriana y antifúngica [21]. Una observación similar fue realizada por Mainasara y col (2012) que demostraron la inactividad el extracto etanólico de las raíces frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhimurium* [22]. Sin embargo, entran en contradicción con los obtenidos por Shobowale y col (2013) quienes reportaron la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. typhimurium* y *C. albicans* bajo la acción de los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera* [23], no obstante, ambos extractos no mostraron actividad frente a *B. subtilis*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

En el caso de las levaduras, los resultados corroboran el reporte de Farouky col (2016) quienes observaron que el extracto acuoso de hojas y los extractos etanólicos y acuosos de flores, frutos y látex de *C. procerano* inhibieron el crecimiento de *C. albicans*; tampoco mostraron actividad frente a *C. albicans* los extractos de hojas, flores, frutos y látex obtenidos con el empleo de acetona y alcohol isoamílico [24]. Nenaah (2013) constató que el extracto de hojas obtenido con el éter de petróleo como solvente no fue activo frente a *S. cerevisiae* [25].

La mayor parte de los grupos de metabolitos secundarios detectados en el tamizaje fitoquímico coinciden con los identificados por otros autores, con la excepción de los triterpenos, en ningún caso su presencia fue abundante.

Mainasara y col (2012) observaron la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides en el extracto acuoso y etanólico de hojas de *C. procera*. También observaron la presencia de saponinas en el extracto acuoso y la ausencia de estas y de esteroles en el extracto etanólico [22].

Un resultado similar obtuvieron Zaman y col (2017) quienes determinaron la presencia de alcaloides, taninos, aminoácidos libres y flavonoides en el extracto etanólico de hojas, sin embargo, como elemento contradictorio también observaron la presencia de saponinas en este extracto [26]. Akindele y col (2017), también determinaron la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y saponinas en el extracto acuoso y etanólico de hojas, aunque en esta investigación no se observó la presencia de saponinas en el extracto etanólico [27].

Morsy y col (2016) reportaron la presencia de flavonoides y saponinas, pero no observaron taninos, alcaloides, coumarinas y antocianinas en el extracto metanólico de hojas [28]. La ausencia de antocianinas, coumarinas y la presencia de flavonoides en esta investigación corrobora los resultados obtenidos por estos autores.

La actividad biológica de los extractos de origen vegetal está determinada por la presencia y concentración de determinados metabolitos secundarios, por ejemplo, la actividad antimicrobiana está relacionada con la presencia de alcaloides, azúcares reductores, fenoles, quinonas, saponinas y taninos [29-33].

Además, la presencia y concentración de los metabolitos secundarios en las plantas están sujetas a un control genético, y su expresión puede sufrir modificaciones resultantes de la integración de procesos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos. Por consiguiente, la síntesis de metabolitos secundarios puede considerarse como una adaptación química de las plantas los cambios del ambiente [34].

En muchos casos los cambios en las concentraciones de metabolitos secundarios pueden ser resultado del desarrollo foliar y del surgimiento de nuevos órganos, lo que puede provocar una disminución de su concentración y al mismo tiempo, aumentar debido al crecimiento de la biomasa [35, 36].

La edad y el desarrollo de la planta y de los órganos vegetales también son de gran importancia y pueden influir en la cantidad y variedad de metabolitos producidos, pues en muchas especies los tejidos nuevos generalmente poseen mayor tasa biosintética de metabolitos [37].

Otro factor que influye en el desarrollo de las plantas, y por tanto en la producción de metabolitos secundarios, es la frecuencia con la que ocurren las variaciones anuales, mensuales y diarias en la temperatura del lugar donde crece la planta [38].

Por otro lado, varios procesos fisiológicos, tales como fotosíntesis, movilización de reservas, comportamiento estomático, expansión foliar y crecimiento pueden ser alterados por el potencial hídrico de la planta y por consiguiente provocar cambios en el metabolismo secundario y la producción de metabolitos [39-41].

La disponibilidad de nutrientes es otro factor que puede ser responsable de diferencias en la producción de metabolitos secundarios, su déficit no sólo afecta el metabolismo primario, sino que también afecta la producción de diferentes metabolitos secundarios [42]. El pH del suelo también es determinante en el desarrollo de las plantas y en el metabolismo primario y secundario [38].

Tienen una gran influencia en la producción de metabolitos secundarios y en sus concentraciones los estímulos mecánicos como los causados por la lluvia, el viento, la invasión por patógenos, ataques de herbívoros [38,43-45].

La época de recolección es uno de los factores de mayor importancia ya que la cantidad y la naturaleza de los metabolitos secundarios no es constante durante algunos períodos. Puede inferirse entonces que la ausencia de saponinas en el extracto etanólico y la presencia de estas en el extracto etanólico en la investigación realizada por Zaman y col (2017) pudo estar determinada por diferencias en la época de recolección pues la colecta del material vegetal se realizó en el mes de enero [26].

La extracción de metabolitos secundarios depende, entre otros factores, de la naturaleza del grupo al que pertenece, estructura, grado de polimerización y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción [46]. Esto puede ser la causa de que Morsy y col (2016) observaron la presencia de saponinas y la ausencia de alcaloides y taninos en el extracto metanólico de hojas [28], mientras que en esta investigación al emplear el etanol como solvente los resultados para estos grupos de metabolitos fueron totalmente opuestos.

Un ejemplo de esto lo constituye lo observado por Do y col (2014) en un estudio relacionado con la extracción de fenoles con distintos solventes y métodos de extracción, quienes reportan que la extracción fue más efectiva aumentando el contenido de agua, lo que puede estar relacionado con la solubilidad de los compuestos en este solvente [47].

El método de extracción empleado también pudo influir en los resultados de la actividad antimicrobiana y del tamizaje fitoquímico, pues en este proceso influyen varios parámetros en el rendimiento de la extracción de metabolitos como por ejemplo, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación solvente/sólido y el número de etapas de extracción [48,49]. Es por ello que las diferencias entre los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana y los obtenidos por Shobowale y col (2013) podrían estar dadas en que estos autores emplearon la maceración como método de extracción [23].

El método utilizado para realizar el ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana también pudo influir en las diferencias observadas entre estas investigaciones, variables como la concentración del inóculo, el medio de cultivo empleado, el tipo de difusión, el tiempo y la temperatura de incubación de las placas tienen gran efecto en los resultados. Tal es el caso de los resultados obtenidos por Shobowale y col (2013) en la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólico y acuoso de hojas que mostraron actividad frente a *C. albicans* donde emplearon el método de difusión en pozos de agar, como medio de cultivo el agar papa dextrosa y una concentración del inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL [23].

Referencias:

1. Kelmanson JE, Jäger AK, Van Staden J (2000) Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 241-246. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00147-6
2. <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-001.html/>, accesado 4/11/2017
3. https://www.ecured.cu/Flora_cubana/, accesado 6/11/2017
4. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000200006/, accesado 7/11/2017
5. <http://www.medulardigital.com/?act=dnews&s=24&n=6178/>, accesado 10/11/2017
6. Mari J (2016) Flores comunes de Puerto Rico. San Juan: Edicionesdigitales.info.3a edición.
7. Rueda EE (2013) Citotoxicidad in vitro de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus thymaloides* (L.) Poit. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12: 476 – 492. DOI: 10.13140/2.1.3567.6802
8. Roig JT (1988) Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tomo 2, M-Z. La Habana: *Editorial Científico-Técnica*. 3ª edición.
9. <https://naturalezatropical.com/calotropis-procera/>, accesado 13/11/2017
10. Taciana M (2017) Propiedades antiinflamatorias de proteasas cisteínicas del látex de la planta medicinal *Calotropis procera* (Ait) R. Br. Aplicadas al control de infecciones por *Salmonella*. *Biblioteca Central*. Recife-PE, Brasil.
11. Regalado L, Ventosa I, Morejón R (2008) Revisión histórica de los herbarios cubanos con énfasis en las series de especímenes. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 29: 101-138.
12. Norma Ramal de Salud Pública 310. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. *Especificaciones generales*. Vig.1992,1992.5 pp
13. Carballo C (2005) Desinfección química de *Pedilanthus thymaloides* (L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2: 45-49.
14. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Extracci%C3%B3n-De-Sustancias-Asistida-Por-Ultrasonido/1950573.html/>, accesado 10/9/2014
15. Torres E, Guillén Z, Hermosilla R, Arias Q, Vogel C, Almeida M (2014) Empleo del ultrasonido en la extracción de curcumina a partir de su fuente natural. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19: 14-20.
16. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.
17. CLSI (2009) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. CLSI (2009) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
19. Rondina RVD, Coussio JD (1969) Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas (I). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* (Serie 2. Biología y Producción Vegetal) 6: 352-66.
20. Sandoval D, Suárez O (1990) Estudio fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia* 24:288–296.
21. Mossa JS, Tariq M, Moshin A, Angeel AM, Al-Yahya MA, Al-Said MS, Rafatullah S (1991) Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American Journal of Chinese Medicine* 19: 223–231. DOI: 10.1142/S0192415X91000302
22. Mainasara MM, Aliero BL, Aliero AA, Yakubu M (2012) Phytochemical and Antibacterial Properties of Root and Leaf Extracts of *Calotropis procera*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* 20: 1-6.
23. Shobowale OO, Ogbulie NJ, Itoandon EE, Oresegun MO, Olatope SOA (2013) Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of Aqueous and Organic Extracts of *Calotropis procera* Ait Leaf and Latex. *Nigerian Food Journal* 31: 77 – 82. DOI: 10.1016/S0189-7241(15)30059-X
24. Farouk AA, Ahamed N T, AlZahrani O, AlamerKH, Bahobail AA (2016) Antimicrobial Activities Evaluation from the Extracts of Leaves, Flowers, Fruits and Latex of *Calotropis procera* from Taif. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5:240-256. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.511.026
25. Nenaah G (2013) Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:1255–1262. DOI 10.1007/s11274-013-1288-2
26. Zaman HU, Ahmad S (2017) Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of *Calotropis procera*. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* 1: 19-21.
27. Akindele PO, Fatunla OA, Ibrahim KA, Afolayan CO (2017) Antibacterial and Phytochemical Screening of *Calotropis procera* Leaf Extracts against Vancomycin and Methicillin Resistant Bacteria Isolated from Wound Samples in Hospital Patients. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research* 2(1): 16-30. DOI: 10.9734/JOCAMR/2017/30975

28. **Morsy N, Al Sherif EA, Abdel-rassol MA** (2016) Phytochemical analysis of *Calotropis procera* with antimicrobial activity investigation. *Main Group Chemistry* 15: 267–273. DOI 10.3233/MGC-160206
29. **Domingo D, López-Brea M** (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16: 385-393.
30. **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2003) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte I. *Vitae* 10: 61-71.
31. **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2004) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte II. *Vitae* 11: 35-41.
32. **Aguilera M, Reza MC, Chew RG, Meza JA** (2011) Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnica* 13: 16-22.
33. **Astrid G** (2008) Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. *Acta Biológica Colombiana* 13: 27-36.
34. **Kutchan TM** (2001) Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Journal of Plant Physiology* 125: 58–60. DOI: 10.1104/pp.125.1.58
35. **Spring O, Bienert U** (1987) Capitule Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *Journal of Plant Physiology* 130: 441-448. DOI:10.1016/S0176-1617(87)80209-2
36. **Hendriks H, Anderson-Wildeboer Y, Engels G, Bos R, Woerdenbag HJ** (1997). The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Medica* 63: 356-359 DOI: 10.1055/s-2006-957700
37. **Hartmann T** (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 177-188. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00914.x
38. **Evans WC** (1996) Trease and Evans' Pharmacognosy. London: *WB Saunders Company*. 14a edición.
39. **Salisbury FB, Ross CW** (1992) Plant Physiology. Belmont: *Wadsworth Publishing Co*. 4a edición.
40. **Hsiao TC** (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570. DOI: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511
41. **Bazaaz F, Chiariello N, Coley P, Pitelka L** (1987) Allocating Resources to Reproduction and Defense. *Bioscience* 37: 58-67. DOI: 10.2307/1310178
42. **Gershenson J** (1984) Changes in the Levels of Plant Secondary Metabolites Under Water and Nutrient Stress. *Recent Advances in Phytochemistry* 18: 273-320. DOI: 10.1007/978-1-4684-1206-2_10
43. **Zheng Z, Wu M** (2004) Cadmium Treatment Enhances the Production of Alkaloid Secondary Metabolites of *Catharanthus roseus*. *Plant Science* 166: 507-514. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.10.022
44. **Vázquez F, Carrillo M, Minero Y, Miranda ML** (2004) Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 623-628. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.06.010
45. **Cipollini DF** (1997) Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia* 111: 84-90. DOI: 10.1007/s004420050211
46. **Bochi VC, Barcia MT, Rodrigues D, Speroni CS, Giusti MM, Godoy HT** (2014) Polyphenol extraction optimisation from ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry* 164:347-354. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.031
47. **Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH** (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296-302. DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001
48. **Guntero VA, Longo MB, Ciparicci SA, Martini RE, Andreatta AE** (2015) Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. Congreso Argentino de Ingeniería Química. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.
49. **Dueñas A, Alcívar U, Sacon E, Bravo L, Villanueva G** (2016) Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Chuquiraga Jussieuif* Gmel usando la lixiviación de muestras sólidas. *Tecnología Química* 36: 166-175.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Número 1, año 18, Abril 2019

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar