

REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED



Volumen 2

Número 13

Junio 2021

ISSN: 2594-1445

REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

CINTILLO LEGAL

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 7 No. 13 (Junio-Octubre), es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez del Estado de Durango a través de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicada en Av. Artículo 123 S/N Colonia Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010. Tel (871) 715 8810 ext. 118, www.fcqgp.ujed.mx/remdis, editorremdis@gmail.com, symposiumfcqujed@gmail.com.

Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana. Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN 2594-1445, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 30 de junio de 2021.

Consejo Editorial

Juan Pablo Pardo Vázquez
Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Oscar Flores Herrera
Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Erick Sierra Campos
Biotecnología médica; Facultad de Ciencias Químicas
Gómez Palacio, UJED

Alfredo Téllez Valencia
Medicina molecular; Facultad de Medicina, Durango,
UJED

Claudia Avitia Domínguez
Medicina molecular; Facultad de Medicina, Durango,
UJED

Jaime Héctor Gómez Zamudio
Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Martha Lucía Lázaro Suárez
Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Graciela Castro Escarpullí
Microbiología; Depto. Bacteriología médica,
ENCB IPN

Jorge Alberto González Merchand
Microbiología; Dpto. Microbiología Molecular,
ENCB IPN

Director editorial
Mónica Andrea Valdez Solana

Asistencia editorial
Francisco Carlos López Márquez
Erick Sierra Campos

Diseño
Luis Antonio Montoya Jáquez



Directorio Institucional

M.A. Rubén Solís Ríos
Rector

M.C. Julio Gerardo Lozoya Vélez
Secretario General

Dr. Jesús Espinosa Flores
Contralor General

Dr. José Othón Huerta Herrera
Subsecretario General Académico

Dr. Juan José Martínez García
Director de la Facultad de Ciencias Químicas GP

Lic. Daisy Virginia Rivas Govea
Secretaria Administrativa

M.C. Verónica Yazmín Mejía García
Secretaria Académica

Dra. Concepción García Luján
*Jefa de la División de Estudios de Posgrado e
Investigación*

Dr. José de Jesús Alba Romero
Coordinador de Investigación

Dr. José Rafael Minjares Fuentes
Coordinador Académico

Contenido

EDITORIAL	vi
BIOQUÍMICA	01
La proteína Hsp21 de la chinche de cama <i>Cimex lectularius</i> comparte motivos de chaperona <i>in silico</i> con $\alpha\beta$ -crystallin humana.	2
Martínez Martínez Ignacio	
Potenciales artefactos al medir la actividad del complejo II mitocondrial de hígado bovino mediante el Diclorofenolindofenol.	14
Sierra-Campos E, Ventura-García EK, Valdez-Solana MA.	
Ensamblaje molecular del complejo NDH-1 quinona oxidorreductasa de <i>Moringa oleifera</i>	20
Corral-Guerrero IA, Valdez-Solana MA, Domínguez-Avitia CI, Aguilera-Ortiz M, Téllez-Valencia A, Sierra-Campos E.	
QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA	30
El uso de la ϵ -poli-L-lisina como posible antifúngico para el tratamiento de <i>Candida albicans</i>	31
Ríos-Cifuentes Laura, Sánchez Norma Silvia, Padilla-Garfias Francisco, Calahorra Martha, Peña Antonio	
Evaluación de la enzima nitrato reductasa en células mononucleares en cabras expuestas a la vacuna BCG	42
Martínez- Romero Aurora, Ortega-Sánchez José Luis, López-Sánchez Cesar Abel, Urtiz-Estrada Norma, Cervantes-Flores Maribel, Alba-Romero José de Jesús.	
CIENCIAS BIOMÉDICAS	53
Masa muscular y masa grasa en deportistas con dieta hipocalórica e hiperproteica de un gimnasio de la comarca lagunera.	54
García-Muñiz Juan José, Hernández-Salinas Ileana Patricia, Martínez-Sandoval Alondra, Soraya Amali Zavaleta Muñiz.	
Análisis de la coinfección por microorganismos formadores de biopelícula en pacientes hospitalizados con COVID-19.....	64
Alba-Romero José de Jesús, Martínez-Romero Aurora, Castro-Escarpuli Graciela, Calleros-Rincón Esperanza Yasmín, Ruiz-Flores Pablo, Hernández-González Sandra Isabel, Alba-Romero Damari Lizeth, Pérez-Morales Rebeca.	
MICROBIOLOGÍA	74
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus megaterium</i> (de Bary) sobre <i>Rizoctonia solani</i> Kühn	75
Tepalcatl-Villarreal Marco Antonio, Ibarra-Rubio Claudio, Blanco-Contreras Eduardo, Vásquez-Arroyo Jesús	
Actividad proteolítica de <i>Alternaria</i> spp. obtenidos en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, México. (Proteolytic activity of <i>Alternaria</i> spp. isolates obtained from the Metropolitan Area of Toluca Valley, México).....	83
Mejía-Gochéz Amalinalli Guadalupe, Moreno Alcantara Jaime, Díaz Godoy Raúl Venancio y Castellanos-Moguel Judith.	
Aplicación de dos consorcios microbianos para promover el rendimiento de jamaica criolla (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) en Guerrero, México	96
Orbe-Díaz Diana I, Sampedro-Rosas María Laura, Juárez-López Ana Laura, Palemón Alberto Francisco, Ramírez-Rojas Sergio G, Forero-Forero Ángela Victoria, Toribio-Jiménez Jeiry.	

Editorial

La inteligencia artificial aplicada a la tecnología de los alimentos

La aparente simplicidad de los procesos alimentarios a menudo esconde sistemas complejos, donde los procesos físicos, químicos y biológicos (células o enzimas) coexisten e interactúan para crear el producto final.

Los datos pueden estar plagados de incertidumbre o errores; es probable que haya heterogeneidad de la información disponible; Los datos cualitativos y cuantitativos también pueden coexistir en el mismo proceso, desde la percepción de los expertos sobre la calidad de los alimentos hasta las nano-propiedades de los ingredientes de una formulación alimentaria.

Para obtener modelos confiables, es necesario adquirir información adicional de fuentes externas. Los expertos de un dominio pueden proporcionar información invaluable sobre productos y procesos, pero este valioso conocimiento a menudo está disponible solo en forma de intuición y experiencia implícita mediante análisis sensoriales. La inclusión de información experta en un modelo se puede abordar haciendo que los humanos interactúen con un proceso de inteligencia artificial (IA) a través de la visualización o mediante especialistas en la codificación del conocimiento de dominio implícito debe ayudar a mejorar el conocimiento de los alimentos.

La implementación de la IA en la industria alimentaria ha ido creciendo en los últimos años. Las nuevas tecnologías que involucran el uso de cualquier rama de la IA, como el aprendizaje automático, han cambiado y mejorado las diferentes áreas de la ciencia de los alimentos, como el proceso de producción, la evaluación de la calidad y los métodos para comprender la aceptabilidad de los consumidores. La aplicación de la IA en la industria alimentaria ha llevado al desarrollo de técnicas más confiables, objetivas, rentables, no destructivas y que consumen menos tiempo en comparación con los métodos tradicionales disponibles para la industria.

Algunos estudios que han presentado modelos de IA de objetivos múltiples incluyen la identificación de proteómica a partir del análisis de la espuma de la cerveza, la predicción de los aromas de la cerveza y los datos fisicoquímicos utilizando parámetros relacionados con la espuma obtenidos de un vertedor robótico, la predicción de la aceptabilidad de la cerveza de los atributos sensoriales utilizando datos de la nariz electrónica (e-nose) y la predicción de perfiles sensoriales del vino mediante espectroscopia de infrarrojo cercano o del aroma del café por cromatografía de gases acoplado a masas.

Entonces la IA o cualquiera de sus subdivisiones, tales como, entre otros: visión por computadora, aprendizaje automático, aprendizaje profundo, biometría y robótica, tecnología de sensores e internet de las cosas (IoT), entre otros metodologías para evaluar la calidad de los alimentos, la producción de alimentos y la aceptabilidad sensorial y del consumidor son una buena oportunidad para la formación de nuestros futuros Ingenieros Químicos en Alimentos.

Dr. Erick Sierra Campos

Profesor investigador de la Facultad de Ciencias Químicas

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PERFIL DE INGRESO

Conocimientos básicos e interés en las áreas de: Química, Física, Matemáticas y Biología.

Ser creativo y observador, capacidad de síntesis y análisis crítico, afinidad y gusto por la investigación y el trabajo en el laboratorio.

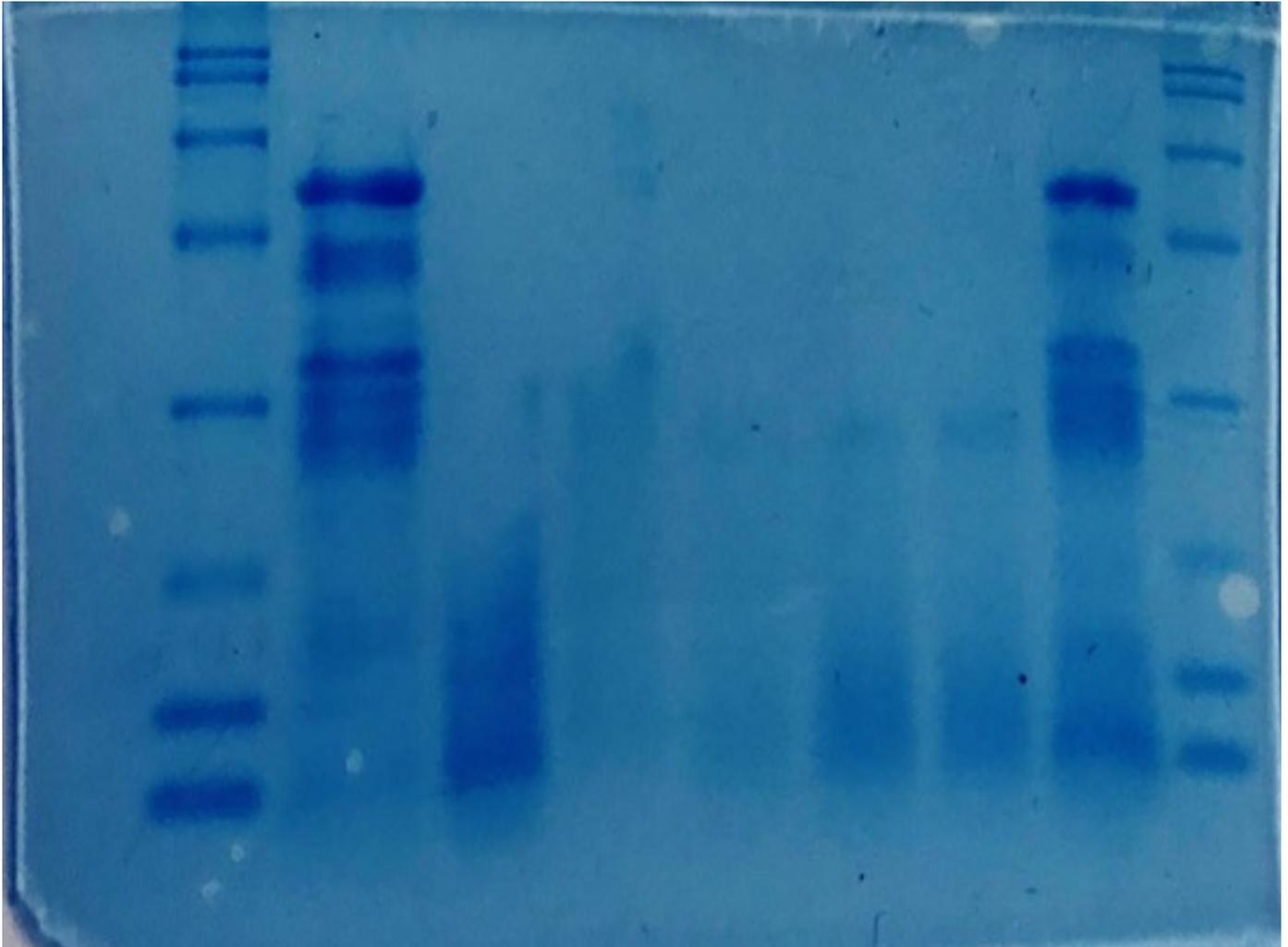
Ser responsable, perseverante, propositivo y tener interés por el mejoramiento sociocultural y económico.

PERFIL DE EGRESO

- Controlar, diseñar y analizar procesos fisicoquímicos y biológicos en alimentos
- Desarrollar tecnología propia para el procesamiento, conservación y empaques de alimentos
- Investigación y desarrollo de nuevos productos alimenticios

BIOQUÍMICA

(Bioenergética, proteínas, metabolismo, productos bioactivos)



*“Lo difícil no es estar con los amigos cuando tienen razón, sino cuando se equivocan”
André Malraux (1901-1976); novelista francés.*

La proteína Hsp21 de la chinche de cama *Cimex lectularius* comparte motivos de chaperona *in silico* con $\alpha\beta$ -crystallin humana.

¹Martínez Martínez Ignacio

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Tercer circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México. Alcaldía Coyoacán. C.P. 04510, Ciudad de México.

*Email de correspondencia: imm@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

La chinche de cama, *Cimex lectularius*, es un ectoparásito hematófago que se alimenta del humano. Esta especie se enfrenta a condiciones de estrés calórico, tanto medioambiental como durante su alimentación. Para sobreponerse a dichas condiciones este insecto cuenta con diversas proteínas de respuesta al choque térmico como Hsp70. Sin embargo, se han anotado en GenBank otras proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, que podrían participar en la respuesta al estrés calórico, cuyas características no se han analizado *in silico*, *in vitro* o *in vivo*. En este trabajo se analizó la secuencia de una proteína de choque térmico de bajo peso molecular de *C. lectularius* (Hsp21) reportada en GenBank. Se estableció su relación con proteínas similares, se identificaron motivos funcionales por homología con otras chaperonas y se generó un modelo tridimensional de la misma. Mediante el análisis bioinformático, se estableció que esta proteína de 20.6 kDa se relaciona filogenéticamente con proteínas similares recientemente descritas en otros insectos y comparte motivos funcionales con la chaperona $\alpha\beta$ -crystallin humana, que le permitirían agregarse en dímeros y oligómeros, así como interactuar con diversas proteínas citoplásmicas. Estos resultados sugieren que ClHsp21 podría participar en la respuesta al estrés calórico.

Palabras clave: Proteína de choque térmico, *Cimex lectularius*, $\alpha\beta$ -crystallin humana.

ABSTRACT

The bed bug, *Cimex lectularius*, is a blood-sucking ectoparasite that feeds on humans. This species faces conditions of heat stress, both environmentally and during its feeding. To overcome these conditions, this insect has several proteins that respond to heat shock such as Hsp70. However, other low molecular weight heat shock proteins, which could participate in the response to heat stress, have been annotated in GenBank, whose characteristics have not been analyzed *in silico*, *in vitro* or *in vivo*. In this work, the sequence of a low molecular weight heat shock protein from *C. lectularius* (Hsp21) reported in GenBank was analyzed. Its relationship with similar proteins was established, functional motifs were identified by homology with other chaperones and a three-dimensional model of it was generated. Through bioinformatic analysis it was established that this 20.6 kDa protein is phylogenetically related to similar proteins recently described in other insects and shares functional motifs with the human $\alpha\beta$ -crystallin chaperone, which would allow it to aggregate into dimers and oligomers, as well as interact with several cytoplasmic proteins. These results suggest that ClHsp21 could participate in the response to heat stress.

Keywords: small heat shock protein, *Cimex lectularius*, human $\alpha\beta$ -crystallin.

INTRODUCCIÓN

La chinche de cama (*Cimex lectularius*) es un ectoparásito humano hematófago, que es considerado un problema de salud pública debido a su capacidad reproductiva, su adaptabilidad a la mayoría de los ambientes y a su convivencia cercana con el hombre. Recientemente se ha reportado el incremento de la infestación por estos insectos en hogares y sitios de descanso como hoteles. Esta especie es considerada una plaga reemergente, particularmente porque se ha vuelto común, incluso en las grandes urbes, y ha desarrollado resistencia a diversos insecticidas de tipo piretroide (Sheele *et al.*, 2019; Zorrila-Vaca *et al.*, 2015). Aunque tradicionalmente se consideraba que la chinche de cama no era transmisora de patógenos humanos, en los últimos años esto se ha puesto en duda, debido a la creciente evidencia de su posible papel en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* y algunas especies de *Rickettsia* (Blakely *et al.*, 2018; Potts *et al.*, 2020). Sin embargo, esta situación permanece en debate.

C. lectularius enfrenta diversas condiciones ambientales que le causan estrés, particularmente por deshidratación y temperaturas extremas (Benoit 2011). Asimismo, durante la alimentación con sangre de mamíferos, la temperatura en el tracto digestivo de la chinche puede incrementarse de 23°C hasta 31°C en solo 1 minuto y mantenerse así hasta por 7 minutos, lo cual representa un choque térmico para el insecto y es uno de los incrementos más rápidos documentado (Araujo *et al.*, 2009; Benoit *et al.*, 2011).

Para poder resistir el drástico cambio de temperatura durante la alimentación, este insecto cuenta con diversos elementos de respuesta, entre los que se encuentran las proteínas de choque térmico (Hsp, por las siglas en inglés de Heat shock proteins). Las Hsp son una amplia familia, cuyos miembros tienen funciones de chaperonas. Tres de los miembros mejor documentados son Hsp60, Hsp70 y Hsp90 (Kampinga *et al.*, 2009).

Se sabe que el proceso de alimentación de *C. lectularius*, y el consecuente choque térmico, induce la rápida expresión de Hsp70, que se mantiene así hasta las 24 horas post-alimentación, a pesar de que la temperatura del insecto se regula dentro de los primeros 30 minutos después de haber comido (Benoit *et al.*, 2011). Se sabe que esta chaperona tiene un papel importante en el re-plegamiento de proteínas después del evento de estrés calórico (Morán-Luengo *et al.*, 2019). Sin embargo,

a partir de otros modelos, también se sabe que otro grupo de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHsp, por las siglas en inglés de small Hsp) son las encargadas de interactuar directamente con las proteínas blanco para evitar su agregación y facilitar el posterior re-plegamiento de las mismas. Las sHsp tienen pesos moleculares entre 10 y 40 kDa, actividad de chaperona, un dominio α -cristalino formado por láminas β , característico de esta familia, y también participan en la respuesta al estrés térmico y oxidante (Haslbeck *et al.*, 2019).

Hasta el momento no se ha reportado ninguna sHsp de *C. lectularius* en respuesta a eventos de estrés, aunque se han identificado diversos genes similares a sHsp en el genoma de este insecto. Dichas proteínas no han sido analizadas *in silico*, *in vitro* o *in vivo*, por lo que no se tienen datos sobre sus características, ni se pueden inferir sus propiedades o papel biológico. Por ello, en el presente trabajo se realizó el análisis bioinformático de una de estas probables proteínas de choque térmico de bajo peso molecular. Se establecen sus características y un modelo tridimensional a partir de su similitud con otras sHsp, particularmente con $\alpha\beta$ -crystallin humana. También se discute su probable interacción con proteínas blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuencias de sHsp utilizadas

Las secuencias empleadas en este trabajo fueron obtenidas de GenBank (GB) o de Protein Data Bank (PDB): Hsp21 de *C. lectularius* (GB XP_014253813.1), Hsp21 de *Bemisia tabaci* (GB AVL92584.1), Hsp28 de *Frankliniella occidentalis* (GB AFX84622.1), Hsp22 de *Laodelphax striatellus* (GB AYP00114.1), Hsp21 de *Nilaparvata lugens* (GB QIB84795.1), Hsp20 de *Triatoma dimidiata* (GB JAP03064.1), Hsp20 de *Pastrongilus megistus* (GB JAC85817.1), Hsp21 de *Plutella xylostella* (GB AHW45924.1), Hsp21 de *Escherichia coli* (GB KAA1346709.1), Hsp20 de *Centipeda periodontii* (GB WP006307775.1), Hsp16 de *Mycobacterium tuberculosis* (GB KDA15745.1), Hsp16 de *Trypanosoma cruzi* (GB AAY78951.2), Hsp16 de *Bodo saltans* (GB AXL08066.1), Hsp16.9 de *Triticum aestivium* (PDB 1GME), Hsp26 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 2H50), HspA de *Xanthomonas axonopodis* (PDB 3GLA), Hsp20 de *Homo sapiens* (GB NP_653218.1), Hsp27 de *H. sapiens* (GB NP_001531), $\alpha\beta$ -crystallin de *H. sapiens* (GB XP_014253813.1) y $\alpha\beta$ -crystallin de *H. sapiens* (GB

NP_001876.1). Para el modelaje de interacción proteína-proteína entre Hsp21 de *C. lectularius* y sus posibles bancos moleculares se emplearon las secuencias de FGF (GB XP_014254542.1), insulina (GB XP_024084204.1), VEGF (GB XP_014257471.1) y β -catenina (GB XP_014244057.1) reportadas para *C. lectularius*.

Características de CIHsp21, similitud con otras sHsp y filogenia

El peso molecular, punto isoeléctrico, coeficiente de extinción molar y carga neta de la proteína fueron determinados mediante el software Pepstats versión 6.6.0 disponible en la plataforma en línea <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web>.

Para establecer la similitud con otras proteínas se empleó el software *on line* BLASTp de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). La predicción de los dominios conservados para identificación de familia proteica se realizó mediante el programa en línea SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Las secuencias fueron alineadas mediante el software MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation) y se estableció la filogenia mediante un análisis de Neighbor joining, por el método estadístico de Bootstrap (10, 000 réplicas), empleando el Software Mega6 (Edgar 2004; Tamura *et al.*, 2013). Para el análisis solo se consideraron aquellas posiciones con una cobertura del 95%. Los cladogramas resultantes fueron visualizados mediante el Software FigTree Ver 1.4.3 (Rambaut 2006)

Modelaje tridimensional de CIHsp21

El modelo tridimensional de la proteína fue generado a partir de la secuencia completa, utilizando dos plataformas de análisis en línea independientes: Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) y Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) para realizar un modelado por homología (Kelley *et al.*, 2015; Waterhouse *et al.*, 2018). La disposición estérica de los aminoácidos y la confiabilidad de la estructura fueron validados mediante el programa Procheck, mientras que la tasa general de frecuencias de error fue establecida mediante el software ERRAT, ambos incluidos en la paquetería SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). El dímero de la proteína fue modelado utilizando el software

Symmdock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/php.php>) (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005). El modelo del oligómero se obtuvo a partir de los resultados reportados por Swiss-Model.

Identificación de los motivos funcionales de CIHsp21

La identificación de los aminoácidos conservados en otras sHsp se realizó mediante un alineamiento con las proteínas humanas Hsp27, α A-crystallin y α B-crystallin, así como con Hsp17 de *T. aestivium*, Hsp26 de *S. cerevisiae* y HspA de *X. axonopodis*, como se ha reportado para otras proteínas (Clark *et al.*, 2011). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:expresso>) y MUSCLE (Di Tommaso *et al.*, 2011; Edgar 2004). Las discrepancias entre ambas fueron corregidas manualmente.

El establecimiento de los motivos funcionales (formación de oligómeros, actividad antiapoptótica, actividad de chaperona, interacción con proteínas), motivos de fosforilación y de unión a metales fueron establecidos a partir de la comparación con las proteínas humanas y con secuencias reportadas previamente en la literatura (Clark *et al.*, 2011; de Jong *et al.*, 1993; Fakruddin *et al.*, 2000; Gaestel *et al.*, 1991; Ghosh *et al.*, 2007; Nahomi *et al.*, 2015; Pasta *et al.*, 2003; Pasta *et al.*, 2004).

Modelado de interacción proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína entre CIHsp21 y los posibles blancos moleculares (FGF, Insulina, VEGF y β -Catenina) fueron modelados mediante la plataforma en línea HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) (Yan *et al.*, 2017). En cada caso se eligió el modelo con el valor más bajo de energía de docking y con el valor más alto de desviación de la raíz cuadrada media del ligando (RMSD) como ha sido reportado en trabajos previos (Mohammad *et al.*, 2020). Todas las estructuras tridimensionales predichas y los modelos de interacción proteína-proteína fueron visualizados y comparados utilizando el software PyMol Molecular Graphics System Ver. 2.4.0 (Janson *et al.*, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CIHsp21 está relacionada filogenéticamente con sHsp de insectos y de humano

En Genbank hay depositadas 5 secuencias de proteínas tipo α A-crystallin deducidas a partir del genoma de *C.*

lectularius (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA298750>). La matriz de distancias genéticas y un análisis mediante Neighbor joinin mostró que son muy similares entre si (Figura suplementaria 1). Por ello se decidió usar la secuencia XP_014253813.1 como representativa y se le denominó CIHsp21. El análisis mediante Pepstat estableció que el peso molecular de esta proteína es de 20.6 kDa con un punto isoeléctrico de 6.64, carga eléctrica de 0.5 y coeficiente de extinción molar a 280 nm de 9970. El análisis de la secuencia mediante el software SMART sugirió la pertenencia a la familia de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular.

Al establecer la homología de CIHsp21 con otras proteínas mediante BLASTp se encontró alta similitud con la recién descrita proteína Hsp21 de *B. tabacci*, con la que comparte una identidad del 61%; así como con la proteína Hsp22 de *L. striatellus*. Interesantemente, se ha demostrado que ambas proteínas incrementan su

expresión en condiciones de estrés calórico, por lo que se esperaría algo similar de CIHsp21 (Bai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

La similitud entre esas proteínas fue corroborada mediante el análisis filogenético de Neighbor joining (Figura 1). Asimismo, puede observarse que CIHsp21 se encuentra en un clado adyacente a las sHsp de humano incluidas en este análisis. Esta cercanía filogenética entre sHsp de insecto y humano había sido observada previamente con la Hsp22 de *L. striatellus* que forma parte del mismo clado de *C. lectularius* (Wang *et al.*, 2019). Dado que el análisis Neighbor joining plantea semejanzas fenotípicas (en este caso aminoácidos conservados o iguales entre secuencias) el filograma resultante sugiere que CIHsp21 es más parecida a las chaperonas de humano (particularmente $\alpha\beta$ -crystallin) que a las de otros hematófagos como *T. dimidiata* y *P. megistus*, lo cual puede observarse al comparar la longitud de las ramas en el cladograma.

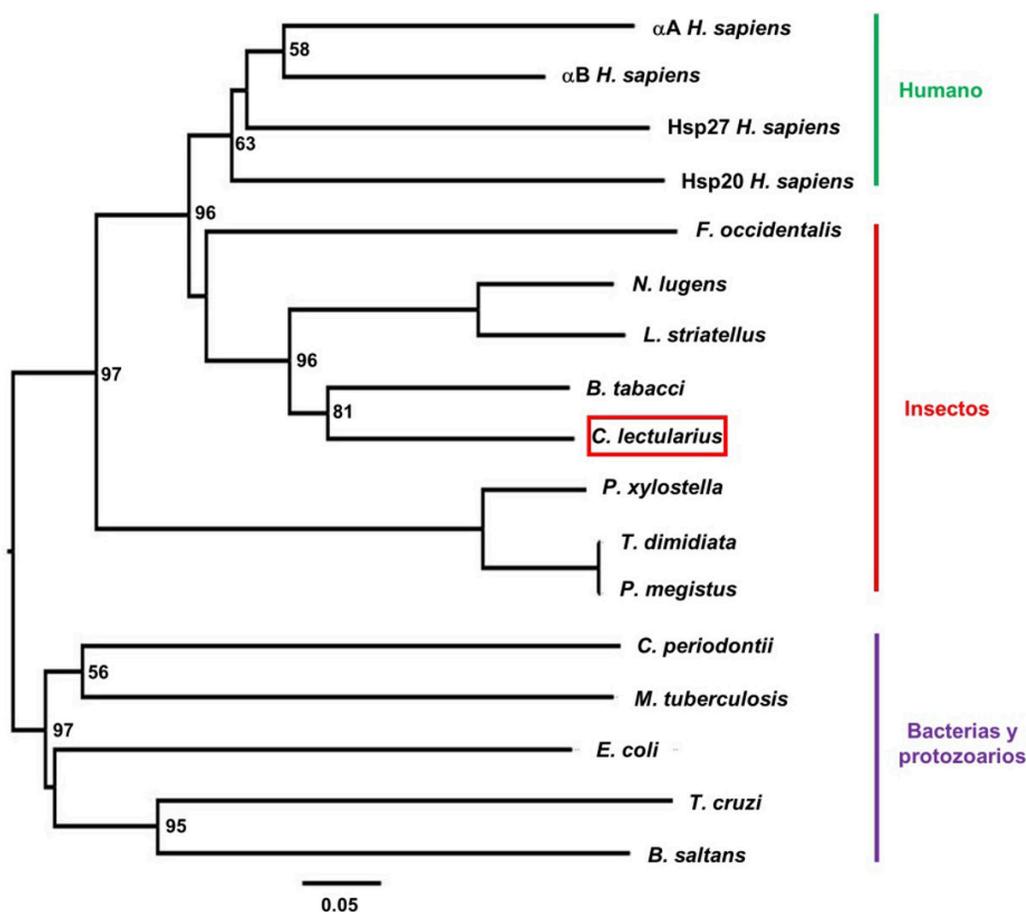


Figura 1. Filogenia de la proteína CIHsp21 (XP_014253813.1, caja roja). El análisis de Neighbor joining se realizó empleando las secuencias de sHsp y procedimientos referidos en materiales y métodos. Los valores de bootstrap en los nodos se obtuvieron a partir de 10, 000 réplicas. Las distancias genéticas para el análisis evolutivo fueron determinadas por el método *p-distance*. La escala mostrada representa el número de diferencias en aminoácidos por sitio en la secuencia. Un total de 111 posiciones fueron empleadas en la construcción del cladograma.

El modelo 3D de ClHsp21 muestra alta similitud con $\alpha\beta$ -crystallin humana

El modelo tridimensional de ClHsp21 obtenido por Phyre2 y Swiss-model fue muy similar en la disposición de las láminas β antiparalelas, en el dominio alfa-cristalino (Figura suplementaria 2). En ambos casos los resultados señalaron la proteína 2YGD ($\alpha\beta$ -crystallin humana) del Protein Data Bank (PDB) como el templado por homología. La validación del modelo mediante la gráfica de Ramachandran mostró que el 92.1% de los residuos se encuentran en la región favorable, indicando una buena fiabilidad de la estructura. Mientras que la gráfica de ERRAT mostró un factor del 91.55%, lo que indica una buena calidad del modelo. Al visualizar el modelo tridimensional de ClHsp21 y compararlo con $\alpha\beta$ -crystallin humana, se observó similitud en la disposición estructural de las láminas β de ambas proteínas (Figura 2). Puede observarse la presencia de las láminas β_3 a β_9 en el modelo, con una lámina β_{6+7} extendida, característica de mamíferos y otros eucariontes (Haslbeck *et al.*, 2019).

También puede observarse que la lámina β_2 , no está representada en el modelo obtenido. Sin embargo, esto no es completamente inesperado, ya que diversos reportes han señalado que la estructura de esta lámina tiene cierta variabilidad. Ejemplo de ello es la propia $\alpha\beta$ -crystallin, cuya secuencia β_2 puede adoptar o no una estructura laminar, o bien parte de su secuencia integrarse a β_3 , siendo observable solo esta última (Clark *et al.*, 2011). Al comparar el modelo de ClHsp21 con la estructura reportada para $\alpha\beta$ -crystallin humana, puede observarse que la disposición de los tres dominios (N-terminal, α -cristalino y C-terminal) es muy similar entre ambas (Figura 2C).

ClHsp21 comparte motivos de chaperona con $\alpha\beta$ -crystallin

Debido a la similitud observada entre $\alpha\beta$ -crystallin humana y ClHsp21, así como la escasa información sobre las características de sHsp de insectos, se compararon ambas secuencias con otras sHsp (Figura 3). El análisis inicial mostro que la región N-terminal de ClHsp21 comparte escasas características con otros

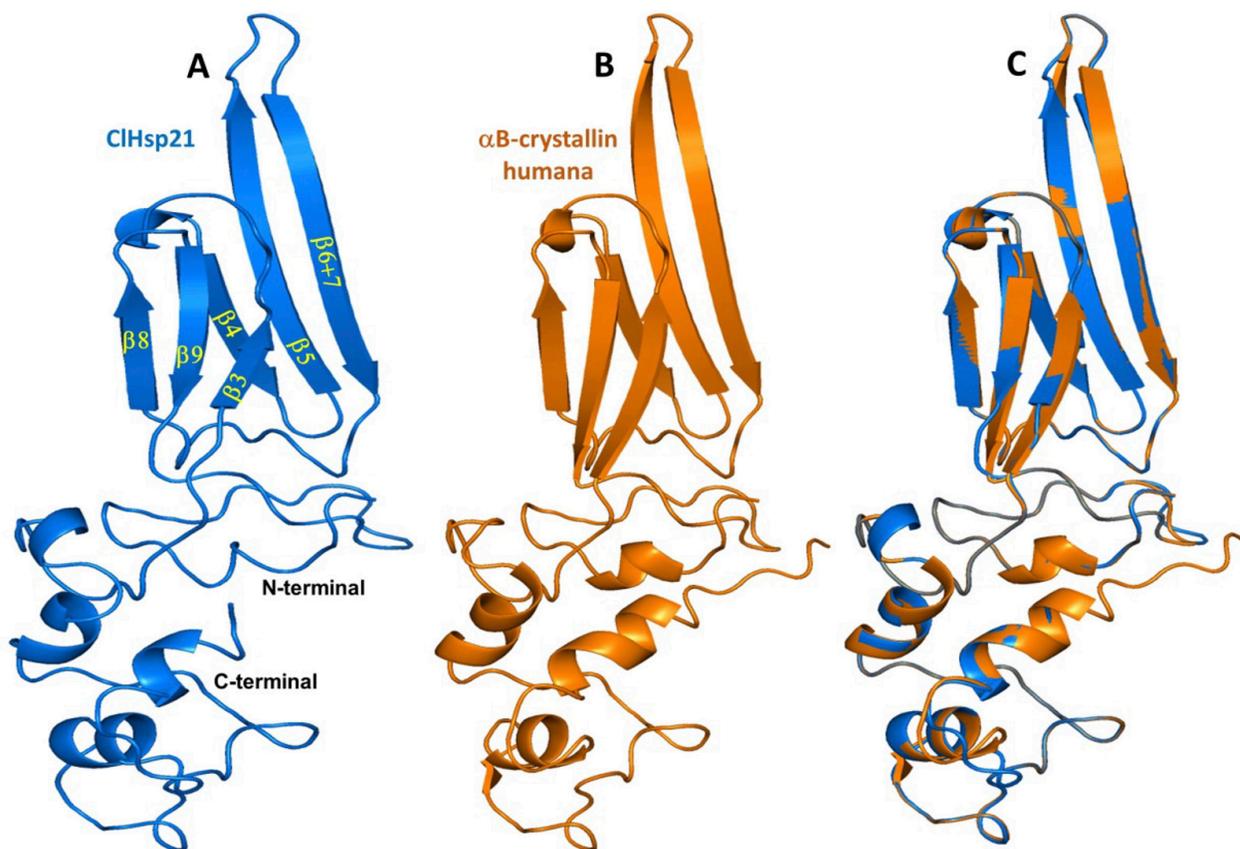


Figura 2. Modelo 3D de ClHsp21 (XP_014253813.1) obtenido mediante Phyre2. A) Monómero en el que puede observarse la disposición de láminas beta antiparalelas (β_3 -9). B) $\alpha\beta$ -crystallin humana (PDB 2YGD). C) Superposición de ClHsp21 (azul) y $\alpha\beta$ -crystallin (naranja).

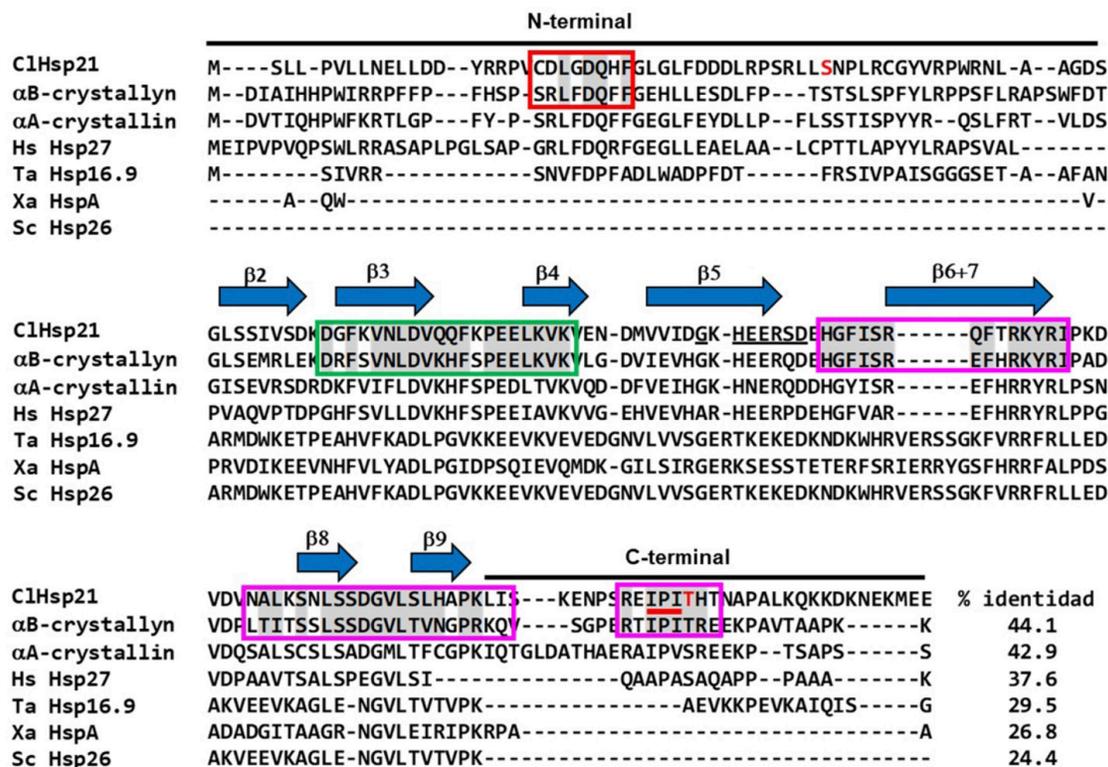


Figura 3. Análisis de la secuencia de aminoácidos de CIHsp21. Las láminas β 2– β 9 del dominio α -cristalino se señalan con flechas. En fondo gris se indican los aminoácidos similares entre CIHsp21 y α B-crystallin, relevantes para la formación de oligómeros (caja roja y subrayado rojo), con actividad antiapoptótica (caja verde) y con capacidad de interacción con proteínas (cajas rosa) reportadas para el humano. Los aminoácidos con características de unión a metales, incluido el motivo EXXXD, se indican con subrayado negro. La serina fosforilable (S43) en el dominio N-terminal y la treonina (T162) susceptible de ser N-acetilglucosaminada en el dominio C-terminal se indican en color rojo. Se incluyeron secuencias de *H. sapiens* (Hs), *T. aestivum* (Ta), *X. axonopodis* (Xa) y *S. cerevisiae* (Sc).

miembros de esta familia, lo cual no es inesperado pues trabajos previos han planteado que este dominio ha evolucionado de forma independiente al dominio α -cristalino, resultando en una amplia variabilidad y en una diversificación de probables blancos de unión (Kriehuber α B., 2010). Sin embargo, el resto de la secuencia mostró que la mayor identidad se comparte con α B-crystallin humana. Al comparar ambas secuencias se identificó un motivo de 9 aminoácidos (CDLGDQHF) en el extremo amino terminal, que comparte un 50% de similitud con la secuencia reportada para α B-crystallin humana (SRLFDQFF). Previamente se ha establecido que la estructura anfipática adoptada por esta última, contribuye al ensamblaje apropiado y la estabilidad de los oligómeros de diversas sHsp (Pasta *et al.*, 2003). También se identificó el motivo IxI (IPI) en el dominio C-terminal, el cual es característico de las sHsp y tiene un papel importante en la oligomerización de la proteína, al interactuar con el dominio α -cristalino (Delbecq *et al.*, 2012). La capacidad para formar oligómeros es importante para estas proteínas, pues se ha reportado que la incorporación y desincorporación de dímeros a las estructuras de mayor tamaño (oligómeros) es un sistema dinámico, que se ajusta a los requerimientos

fisiológicos de la célula (Basha *et al.*, 2012). Asimismo, la forma oligomérica es la más estable en el citoplasma.

También se identificó el motivo DGFKVNLDVQQFKPEELKVK en el dominio α -cristalino, que comparte un 85% de similitud con una secuencia de la proteína α B-crystallin humana. Se ha demostrado previamente que este péptido confiere propiedades anti-apoptóticas y de chaperona a las proteínas Hsp20, Hsp27, α B y α A-crystallin humanas (Nahomi *et al.*, 2015). Esta similitud sugiere la posible participación de CIHsp21 en la regulación del proceso apoptótico en las células de *C. lectularius*.

Asimismo, se identificaron tres motivos en la secuencia de CIHsp21 (HGFISRQFTRKYRI, NALKSNLSSDGVLSLHAPKLI y REIPIHT) que comparten 93%, 71% y 75% de similitud con secuencias homólogas en α B-crystallin (Figura 3). Trabajos previos han establecido que estas secuencias de α B-crystallin pueden interactuar con diversas proteínas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la β -catenina, la insulina y el factor de crecimiento nervioso β (NGF- β)

(Ghosh *et al.*, 2007). La presencia de estos motivos sugiere que ClHsp21 podría unirse a proteínas citoplásmicas como las mencionadas, cuyos homólogos en insectos ya han sido descritos (Ahmed *et al.*, 2020; Lin and Smaghe 2019; Sohr *et al.*, 2019; Tsai and Galko 2019).

Para explorar la capacidad de interacción proteína-proteína de ClHsp21 con diversos blancos moleculares se realizó un modelado mediante la plataforma HDock. Para ello se emplearon secuencias de proteínas de *C. lectularius* reportadas en GenBank cuya naturaleza es similar a los blancos naturales propuestos para esta chaperona. En los modelos generados se identificaron los aminoácidos de unión a moléculas tipo β -catenina, VEGF, insulina y FGF de *C. lectularius* (Figura 4). Los aminoácidos de interacción con las proteínas analizadas están distribuidos en tres de los motivos identificados en el análisis de secuencia. Ambos resultados apoyan el papel que ClHsp21 puede tener en la interacción con diversas proteínas, para protegerlas durante eventos de estrés.

Dimerización y oligomerización de ClHsp21

La presencia de la lámina $\beta 6+7$ en la secuencia analizada y su disposición tridimensional en el modelo generado, sugieren que esta estructura podría participar en la formación de homodímeros, como se ha propuesto para otras sHsp de eucariontes (Hochberg and Benesch 2014). Esta propiedad es importante, pues en algunos casos los dímeros de sHsp son los que interactúan con los sustratos para formar complejos que protejan a estos últimos (Santhanagopalan *et al.*, 2018). El software en línea SymmDock permitió establecer la estructura del homodímero de esta proteína (Figura 5A). Se observó la interacción entre las láminas $\beta 6+7$ de cada monómero como ha sido descrito para otras proteínas, incluida la αB -crystallin (Braun *et al.*, 2011; Haslbeck *et al.*, 2019). También muestra que el dominio N-terminal de uno de los monómeros podría adoptar una posición espacial diferente. Esta modificación permitiría el correcto ensamblaje de los dímeros en la estructura oligomérica. Se ha descrito anteriormente que debido a la naturaleza variable de las regiones N-terminal de esta familia de

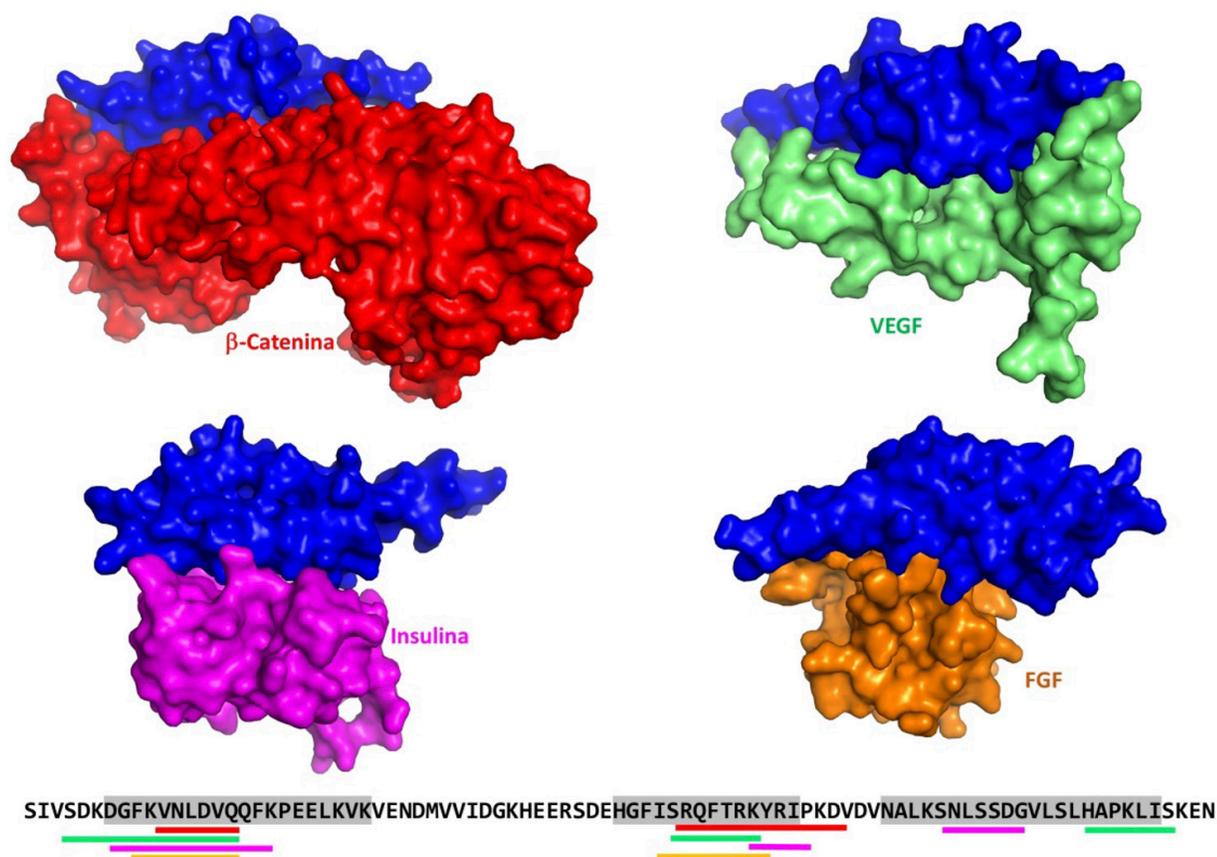


Figura 4. Interacción proteína-proteína entre ClHsp21 y proteínas blanco. Los modelos fueron generados *in silico* mediante HDock como se indica en materiales y métodos. Se analizó la interacción entre ClHsp21 (azul) y proteínas de *C. lectularius*: β -catenina (GB XP_014244057.1), VEGF (GB XP_014257471.1), insulina (GB XP_024084204.1) y FGF (GB XP_014254542.1). Los aminoácidos involucrados en la unión a las proteínas blanco se muestran en la parte inferior subrayados con una línea de color, correspondiente a la proteína con la que interactúan. Las cajas grises en la secuencia indican los motivos predichos por el análisis de secuencia.

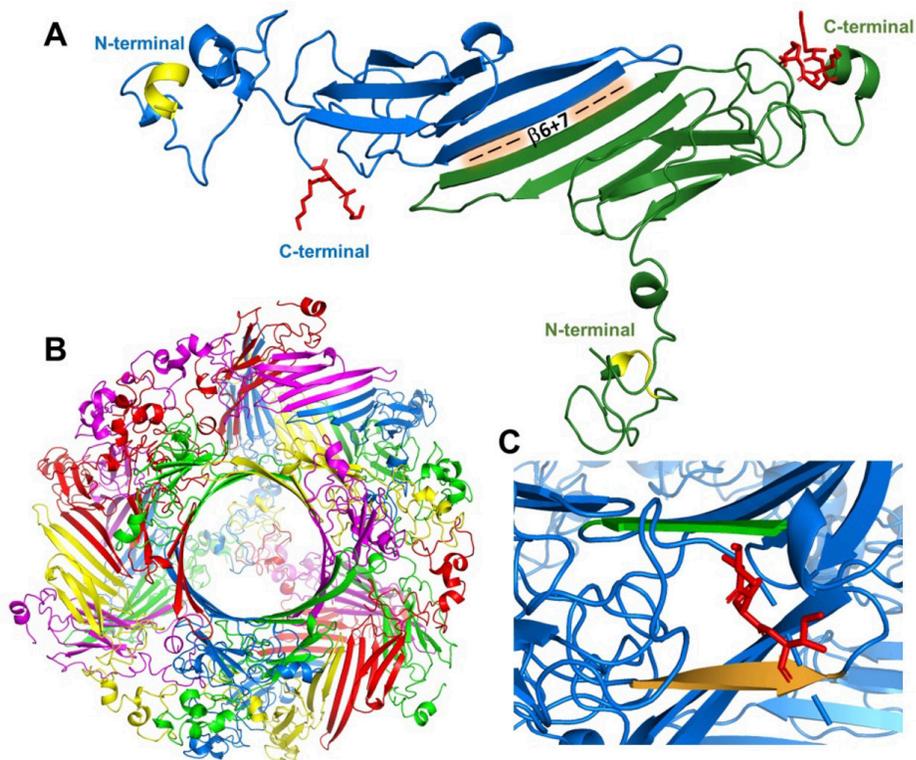


Figura 5. Dímero y oligómero de CIHsp21. A) Dímero en el que puede observarse la interacción de dos monómeros (azul y verde) a través de la lámina $\beta 6+7$. En amarillo la región N-terminal y en varillas rojas el motivo IPI (C-terminal). B) Oligómero de CIHsp21 formado por 24 unidades de la proteína. C) Vista de la interacción del dominio IPI (varillas rojas) de un monómero con el surco formado por las láminas $\beta 4$ (verde) y $\beta 8$ (naranja) de un monómero adyacente

proteínas, la conformación espacial de este dominio puede adoptar diferentes formas cuando se encuentra en estado de monómero, dímero u oligómero (Hanazono *et al.*, 2013). Por ello, no es inesperado lo que se observó en el modelado de CIHsp21. Adicionalmente, el modelo de oligómero propuesto estaría formado por 24 unidades, en las cuales la secuencia IPI de un monómero se insertaría en el surco formado por las láminas $\beta 4$ y $\beta 8$ del monómero adyacente, como se ha descrito para otras sHsp (Figura 5B y 5C) (Delbecq *et al.*, 2012). La posibilidad de que esta proteína forme oligómeros tiene relevancia, dado que en la literatura se ha descrito que en el citoplasma celular son los oligómeros la forma en que estas proteínas se encuentran presentes (Dabbaghizadeh *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la incorporación o desincorporación de los monómeros y dímeros de diversas sHsp, incluida la $\alpha\beta$ -crystallin, a las estructuras oligoméricas, está condicionado por su estado de fosforilación y N-acetilglucosaminación (Ecroyd *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2001; Roquemore *et al.*, 1996; Roquemore *et al.*, 1992). En el análisis de la secuencia de CIHsp21 se estableció la presencia del motivo RLLS en el dominio N-terminal, que cumple con la estructura RXXS

propuesta previamente como blanco de fosforilación y cuya serina (S43) podría ser modificada por la adición de un grupo fosfato por un mecanismo dependiente de MAPK p38 (Aggeli *et al.*, 2008). También se estableció que la treonina 162 en el extremo C-terminal es susceptible de ser modificada por la adición de N-acetilglucosamina (Figura 3).

Por otra parte, se identificaron dos aminoácidos (G101 y H103) y el motivo EXXXD (EERSD) con la capacidad de unión a metales (Fe^{++} y Zn^{++}). Esta secuencia se encuentra conservada en CIHsp21, $\alpha\beta$ -crystallin y Hsp27 de humano (Figura 3). Se ha descrito que las láminas β del dominio α -cristalino tienen la propiedad de interactuar con las proteínas blanco, por lo que la presencia de este motivo podría conferirle a la proteína CIHsp21 la capacidad de unirse a metaloproteínas como la transferrina, ferritina o citocromo C, que pudieran ser tóxicos para la célula (Kajarabille and Latunde-Dada 2019). De esta forma CIHsp21 podría regular la muerte celular apoptótica inducida por hierro (ferroptosis), como lo hace la proteína Hsp27 humana (Sun *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo sugieren que CIHsp21 podría estar presente en el citoplasma celular en forma de oligómeros y por eventos de fosforilación y N-acetilglucosaminación, separarse en dímeros o monómeros con funciones de chaperona. La capacidad de esta sHsp para interactuar con diversas proteínas y evitar su agregación durante eventos de estrés térmico (por ejemplo, durante la alimentación con sangre), podría estar dada por los motivos que comparte con $\alpha\beta$ -crystallin humana. Asimismo, queda abierta la posibilidad de que esta proteína esté involucrada en evitar la muerte celular apoptótica en este insecto hematófago.

Perspectivas

En la literatura se ha establecido la importancia de generar modelos, particularmente de proteínas poco estudiadas o poco caracterizadas, para proponer líneas de trabajo que esclarezcan su papel biológico (Mesdaghi *et al.*, 2020). Los datos generados en el presente trabajo muestran la necesidad de comprobar la expresión de la proteína CIHsp21 ya sea por RT-PCR o mediante anticuerpos dirigidos contra proteínas similares como $\alpha\beta$ -crystallin humana, tanto en condiciones basales como de estrés térmico (por ejemplo, durante la alimentación). También sería necesario obtener la proteína recombinante, para realizar ensayos de protección *in vitro* sobre enzimas modelo, como la Malato deshidrogenasa, y comprobar de esta forma su papel de chaperona. Asimismo, será interesante profundizar en el análisis filogenético mediante modelos bayesianos, para determinar si CIHsp21, así como otras sHsp de insectos, comparten un ancestro común con las sHsp de humano.

REFERENCIAS

- Aggeli IK, Beis I, Gaitanaki C. Oxidative stress and calpain inhibition induce alpha B-crystallin phosphorylation via p38-MAPK and calcium signalling pathways in H9c2 cells. *Cell Signal* 2008; 20: 1292-1302.
- Ahmed S, Zia A, Mehmood SA, *et al.* Change in malate dehydrogenase and alpha amylase activities in *Rubus fruticosus* and *Valeriana jatamansi* treated granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Brazilian Journal of Biology* 2020; 2020: 1-5.
- Araujo RN, Costa FS, Gontijo NF, *et al.* The feeding process of *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) and *Cimex hemipterus* (Fabricius 1803) on different bloodmeal sources. *J Insect Physiol* 2009; 55: 1151-1157.
- Bai J, Liu XN, Lu MX, Du YZ. Characterization of genes encoding small heat shock proteins from *Bemisia tabaci* and expression under thermal stress. *PeerJ* 2019; 7: 1-5.
- Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 106-117.
- Benoit JB. Stress tolerance of bed bugs: a review of factors that cause trauma to *Cimex lectularius* and *C. Hemipterus*. *Insects* 2011; 2: 151-172.
- Benoit JB, Lopez-Martinez G, Patrick KR, *et al.* Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 8026-8029.
- Blakely BN, Hanson SF, Romero A. Survival and Transstadial Persistence of *Trypanosoma cruzi* in the bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 2018; 55: 742-746.
- Braun N, Zacharias M, Peschek J, *et al.* Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone $\alpha\beta$ -crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20491-20496.
- Clark AR, Naylor CE, Bagnéris C, *et al.* Crystal structure of R120G disease mutant of human $\alpha\beta$ -crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol* 2011; 408: 118-134.
- Dabbaghizadeh A, Finet S, Morrow G, *et al.* Oligomeric structure and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* mitochondrial small heat shock protein Hsp22 and arginine mutants in the alpha-crystallin domain. *Cell Stress and Chaperones* 2017; 22: 577-588.
- de Jong WW, Leunissen JA, Voorter CE. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10: 103-126.
- Delbecq SP, Jehle S, Klevit R. Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif. *EMBO J* 2012; 31: 4587-4594.

- Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, *et al.* T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: W13-17.
- Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, *et al.* Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin affects its chaperone activity. *Biochem J* 2007; 401: 129-141.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1792-1797.
- Fakruddin JM, Biswas S, Sharma YD. Metalloprotease activity in a small heat shock protein of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Infection and Immunity* 2000; 68: 1202-1206.
- Gaestel M, Schröder W, Benndorf R, *et al.* Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J Biol Chem* 1991; 266: 14721-14724.
- Ghosh JG, Shenoy AK, Jr., Clark JI. Interactions between important regulatory proteins and human alphaB crystallin. *Biochemistry* 2007; 46: 6308-6317.
- Hanazono Y, Takeda K, Oka T, *et al.* Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure* 2013; 21: 220-228.
- Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem* 2019; 294: 2121-2132.
- Hochberg GK, Benesch JL. Dynamical structure of alphaB-crystallin. *Prog Biophys Mol Biol* 2014; 115: 11-20.
- Ito H, Kamei K, Iwamoto I, *et al.* Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J Biol Chem* 2001; 276: 5346-5352.
- Janson G, Zhang C, Prado MG, Paiardini A. PyMod 2.0: improvements in protein sequence-structure analysis and homology modeling within PyMOL. *Bioinformatics* 2017; 33: 444-446.
- Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1-12.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 2009; 14: 105-111.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015; 10: 845-858.
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, *et al.* Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J* 2010; 24: 3633-3642.
- Lin X, Smagghe G. Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth. *Peptides* 2019; 122: 169923.
- Mesdagh S, Murphy DL, Sánchez Rodríguez F, *et al.* In silico prediction of structure and function for a large family of transmembrane proteins that includes human Tmem41b. *F1000Res* 2020; 9: 1395.
- Mohammad A, Marafie SK, Alshawaf E, *et al.* Structural analysis of ACE2 variant N720D demonstrates a higher binding affinity to TMPRSS2. *Life Sci* 2020; 259: 118219.
- Morán-Luengo T, Mayer MP, Rüdiger SGD. The Hsp70-Hsp90 chaperone cascade in protein folding. *Trends Cell Biol* 2019; 29: 164-177.
- Nahomi RB, Di Mauro MA, Wang B, Nagaraj RH. Identification of peptides in human Hsp20 and Hsp27 that possess molecular chaperone and anti-apoptotic activities. *Biochem J* 2015; 465: 115-125.
- Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 51159-51166.
- Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M. The IXI/V motif in the C-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies. *Mol Vis* 2004; 10: 655-662.
- Potts R, Molina I, Sheele JM, Pietri JE. Molecular detection of *Rickettsia* infection in field-collected bed bugs. *New Microbes and New Infection* 2020; 34: 100646-100652.
- Rambaut A. FigTree: tree figure drawing tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg, USA. 2006. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, Hart GW. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry* 1996; 35: 3578-3586.
- Roquemore EP, Dell A, Morris HR, *et al.* Vertebrate lens alpha-crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 555-563.
- Santhanagopalan I, Degiacomi MT, Shepherd DA, *et al.* It takes a dimer to tango: Oligomeric small heat shock proteins dissociate to capture substrate. *J Biol Chem* 2018; 293: 19511-19521.
- Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research* 2005; 33: W363-367.
- Sheele JM, Crandall CJ, Chang BF, *et al.* Risk factors for bed bugs among urban emergency department patients. *J Community Health* 2019; 44: 1061-1068.
- Sohr A, Du L, Wang R, *et al.* Drosophila FGF cleavage is required for efficient intracellular sorting and intercellular dispersal. *J Cell Biol* 2019; 218: 1653-1669.
- Sun X, Ou Z, Xie M, *et al.* HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene* 2015; 34: 5617-5625.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-2729.
- Tsai CR, Galko MJ. Casein kinase 1 α decreases β -catenin levels at adherens junctions to facilitate wound closure in *Drosophila* larvae. *Development* 2019; 146: 1-11.
- Wang L, Zhang Y, Pan L, *et al.* Induced expression of small heat shock proteins is associated with thermotolerance in female *Laodelphax striatellus* planthoppers. *Cell Stress and Chaperones* 2019; 24: 115-123.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: W296-W303.
- Yan Y, Zhang D, Zhou P, *et al.* HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: W365-w373.
- Zorrila-Vaca A, Silva-Medina M, Escandon-Vargas K. Bedbugs, *Cimex* spp.: their current world resurgence and healthcare impact. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015; 5: 342-352.

La proteína Hsp21 de la chinche de cama *Cimex lectularius* comparte motivos de chaperona *in silico* con $\alpha\beta$ -scrystallin humana.

¹Martínez Martínez Ignacio

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Tercer circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México. Alcaldía Coyoacán. C.P. 04510, Ciudad de México.

*Email de correspondencia: imm@iibiomedicas.unam.mx

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Gene	Proteína ID	Nucleótido ID	Hsp26	α A-1	α A-2	α A-3	α A-4	α A-5	α B
Hsp26	XP_014259088.1	XM_014403602.1							
α A-1	XP_024085842.1	XM_024230074.1	0.9288						
α A-2	XP_024085068.1	XM_024229300.1	0.9177	0.2479					
α A-3	XP_014253813.1	XM_014398327.2	0.8957	0.0570	0.4096				
α A-4	XP_014253812.1	XM_014398326.2	0.8820	0.2591	0.2357	0.4043			
α A-5	XP_014251098.1	XM_014395612.2	0.8820	0.2567	0.2303	0.4032	0.0131		
α B	XP_014248856.1	XM_014393370.1	0.7219	0.8562	0.9440	0.9494	0.9799	0.9530	

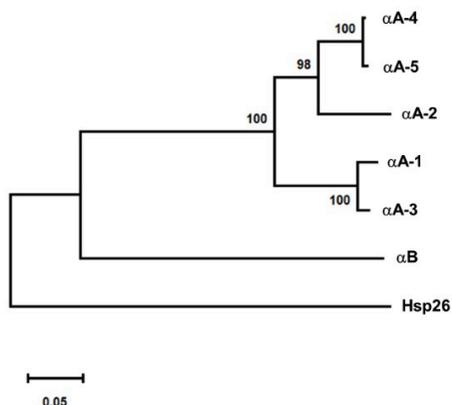


Figura suplementaria 1. Similitud entre proteínas α A-crystallin (α A-1 a 6) de *C. lectularius*. Panel superior: tabla de distancias genéticas. El análisis se realizó empleando las secuencias de nucleótidos de cada proteína, usando el modelo de máxima verosimilitud compuesta, mediante el programa Mega 6. Panel inferior: análisis mediante Neighbor joining. Los valores en los nodos representan el valor de Bootstrap a partir de 10,000 réplicas. La escala representa el número de cambios por posición analizada. Las secuencias de α B-crystallin humana y Hsp26 de *C. lectularius* fueron incluidas como grupos externos en el análisis.

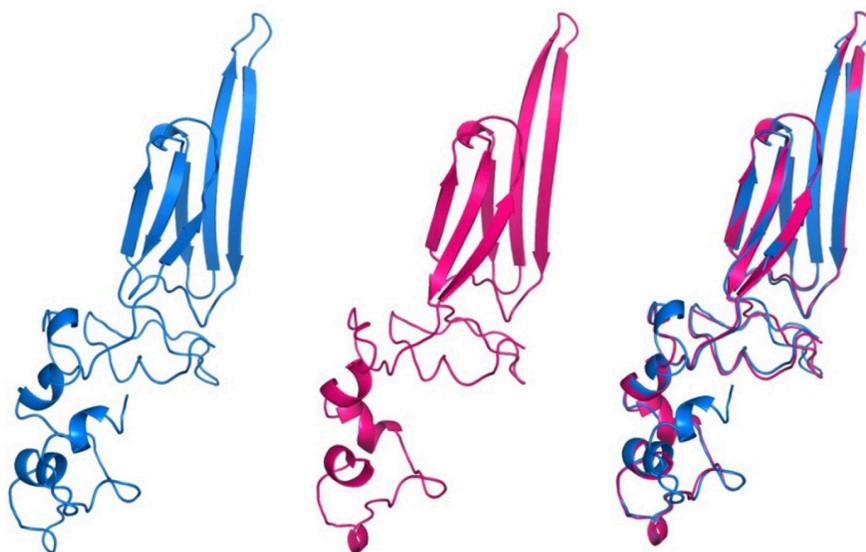


Figura suplementaria 2. Modelos de CIHsp21. Los modelos generados mediante Phyre2 (azul) y Swiss-model (rosa) fueron superpuestos para ser comparados.

Potenciales artefactos al medir la actividad del complejo II mitocondrial de hígado bovino mediante el Diclorofenolindofenol.

¹Sierra-Campos E, ¹Ventura-García EK, ¹Valdez-Solana MA.

¹Laboratorio A de Investigación. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango Campus Gómez Palacio. Av. artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Dgo. C.P 35010. México.

*Email: ericksier@ujed.mx

RESUMEN

El flujo de electrones en el complejo II mitocondrial depende del potencial de electrodo estándar, donde el FADH_2 tiene un $E^\circ = -0.18 \text{ V}$ y este a su vez los dona a la poza de ubiquinona en la membrana. Por lo cual la actividad del complejo no se puede medir directamente y es necesario emplear un aceptor de electrones como el DCIP con un $E^\circ = +0.217 \text{ V}$ y que en su forma oxidada es azul y a medida que se reduce se vuelve incoloro. Sin embargo, el coeficiente de absorptividad debe calcularse cada vez que se emplea el DCIP ya que se ve afectado por la composición y pH del medio de reacción, además del tiempo de preparación. En base a las condiciones de ensayo en este trabajo el coeficiente de absorptividad del DCIP fue $6.84 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y la actividad para el complejo II fue de 11.1 U/mg para mitocondrias de hígado de bovino después de restar la reducción inespecífica por los otros componentes presentes en el medio de reacción.

ABSTRACT

Electron flux in mitochondrial complex II depends on the standard electrode potential, where FADH_2 has an $E^\circ = -0.18 \text{ V}$ and this in turn donates them to the ubiquinone pool in the membrane. Therefore, the activity of the complex cannot be measured directly and it is necessary to use an electron acceptor such as DCIP with an $E^\circ = +0.217 \text{ V}$ and which in its oxidized form is blue and as it is reduced it becomes colorless. However, the absorptivity coefficient must be calculated each time the DCIP is used as it is affected by the composition and pH of the reaction medium, as well as the preparation time. Based on the test conditions in this work, the absorptivity coefficient of the DCIP was $6.84 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and the activity for complex II was 11.1 U/mg for bovine liver mitochondria after subtracting the nonspecific reduction by the other components present in the reaction medium.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un orgánulo especializado presente en la célula eucariota cuya función más conocida es la síntesis de ATP a partir de los productos de la degradación oxidativa de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Sin embargo, aunque esta función es clave para mantener la viabilidad de la célula, existen diversos procesos de señalización y muerte en donde la mitocondria desempeña un papel clave (Friedman JR y Nunnari J, 2014). Por tanto, los investigadores están muy interesados en entender la función de este orgánulo en diversas patologías como diabetes, obesidad y cáncer (Herst PM y cols., 2017).

Además, existen las enfermedades mitocondriales las cuales son poco conocidos debido a su baja frecuencia en la población mexicana que resultan de diversas mutaciones en los genes del DNA mitocondrial y/o nuclear de algunas de las subunidades de los complejos mitocondriales (Gorman GS y cols., 2016).

Los complejos mitocondriales son un conjunto de subunidades que se distribuyen en la membrana mitocondrial interna y cuya función principal es la transferencia de electrones de los equivalentes

reductores (NADH y FADH_2) que se forman en la matriz mitocondrial durante la oxidación de acetil-CoA en el ciclo de Krebs, la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos (Figura 1). Este flujo de electrones está acoplado a un bombeo de protones que permiten la formación de un gradiente electroquímico que más adelante utiliza el sistema fosforilante mitocondrial a través del complejo V y el transportador de fosfatos para la síntesis de ATP (Figura 1) (Spinelli JB y Haigis MC, 2018).

En el laboratorio se estudia la actividad de los diferentes componentes de la cadena respiratoria de la mitocondria por diversos métodos espectrofotométricos. Para ello es necesario utilizar los sustratos respiratorios (NADH , succinato, citocromo c), diversos inhibidores clásicos (rotenona, antimicina A, cianuro) y diversos agentes reductores artificiales de la familia de Hill como el 2,6-diclorofenolindolifenol (DCPIP o DCIP) (Janssen AJM y cols., 2007; Hatefi Y y Stiggall DL, 1978).

El complejo II realiza la transferencia de electrones del succinato al FAD^+ para formar fumarato y FADH_2 , el cual posteriormente dona sus electrones a la quinona para producir ubiquinol.

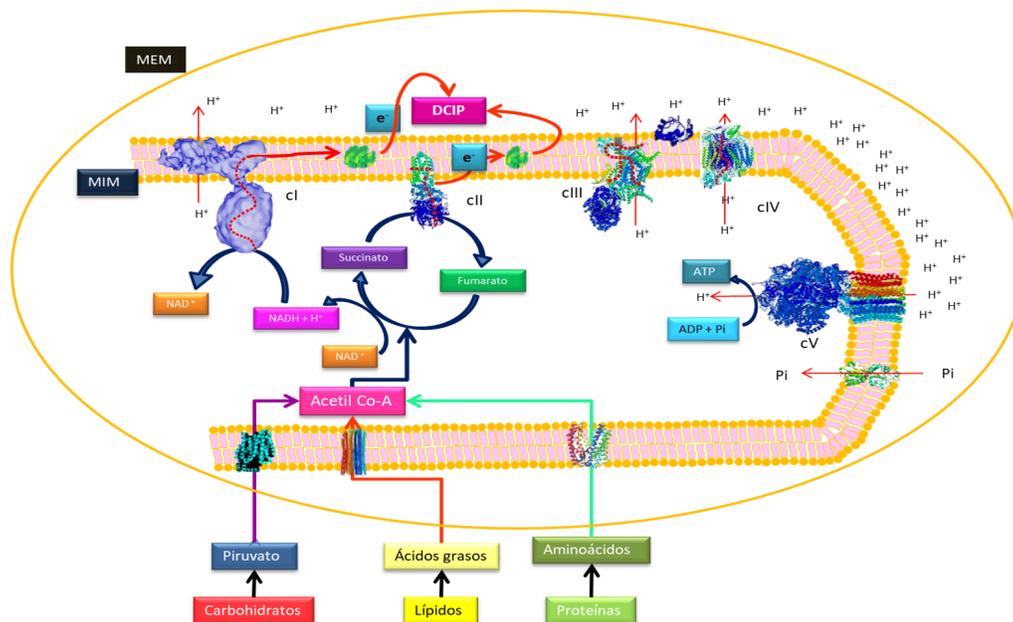
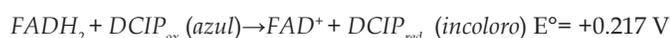


Figura 1. Esquema de la mitocondria que representa como los carbohidratos, lípidos y proteínas mediante diferentes vías como la glucólisis, β -oxidación y vías anapleróticas del ciclo de Krebs. Respectivamente llegan a la mitocondria al convertirse en acetil Co-A, así en el ciclo de Krebs genera coenzimas como NAD^+H^+ y FADH_2 que son utilizados por complejo I y complejo II, respectivamente para el transporte de electrones y el bombeo de protones que generan un gradiente electroquímico utilizado por Complejo V para la formación de ATP.

El DCIP es un colorante redox que es un forma oxidada tiene un color azul intenso con un máximo de absorción a los 600 nm; cuando esta molécula capta dos electrones y dos protones se reduce completamente y el color azul intenso se vuelve incoloro. Por tanto, la disminución de la absorbancia a 600 nm en un curso temporal puede ser empleado para determinar la actividad de los complejos I y II de la mitocondria. Sin embargo, el estudiante debe tener cuidado al emplear el DCIP ya que este compuesto puede aceptar electrones de algunos componentes del medio de reacción o de los sustratos sin la participación del complejo mitocondrial o enzima.

En el caso del complejo II, el DCIP acepta los electrones del FADH₂ que se formó durante la oxidación del succinato en la reacción anterior.



Otro concepto básico importante que el estudiante confunde con facilidad es el coeficiente de extinción molar o absorptividad específica que tiene cada sustancia y que es necesario para calcular la actividad enzimática. En el caso del DCIP, no existe un solo valor de absorptividad ya que depende de tiempo de elaboración, del pH empleado en el ensayo experimental y de las sustancias presentes tanto en la muestra y en el medio de reacción (Jahn B y cols., 2020). Por tanto, se sugiere que el valor de absorptividad se determine a través de una curva estándar bajo las mismas condiciones experimentales del ensayo enzimático.

Para evitar los potenciales artefactos al determinar la actividad enzimática de una reacción de óxido-reducción es necesario que el estudiante se familiarice con el uso de controles positivos y negativos que faciliten la eliminación de los errores experimentales al valorar la actividad de los complejos mitocondriales. En base a todo lo anterior este manuscrito pretende facilitar la comprensión de las buenas prácticas para la medición de las enzimas mitocondriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de medio de aislamiento

Solución preparada con 200 mM de Manitol, 50 mM de Sacarosa, 1 mM EDTA, 20 mM Tris y 1 mM PMSF (inhibidor de proteasas); disueltos en 1L de agua desionizada y pH ajustado a 7.4 con albumina de suero de bovino (BSA) 0.1%

Preparación de medio de oximetría

Solución de 250 mM de Sacarosa, 10 mM Fosfato monobásico de potasio, 5 mM EDTA, 2.5 mM Cloruro de magnesio y Tris; disueltos en 100 mL de agua desionizada y pH ajustado a 7.4.

Aislamiento de Mitocondrias

Después de obtener el tejido (hígado de res), se realizan cortes y lavados con solución salina; para después homogenizar empleando medio de aislamiento con BSA. Se centrifuga el homogenado obtenido a 5,000 rpm x 10 min 4°C, para conservar el sobrenadante y centrifugar a 12,000 rpm x 10 min 4°C. El precipitado se resuspende en medio de aislamiento sin BSA y se centrifuga a la misma velocidad y para volver a resuspender la pastilla obtenida en el mismo medio.

Ensayo espectrofotométrico

Para medir actividad del complejo II mitocondrial se registro la reducción de la absorbancia por el DCIP (80 µM) en presencia de 50 µg/mL de proteína mitocondrial, succinato 7.7 mM (sustrato), antimicina 1.6 µg/ml y rotenona 3.3 µM, como inhibidores en un volumen total de 600 µL a una longitud de onda de 600 nm.



Figura. 2 Diagrama de flujo para la determinación de actividad de complejo II y sus controles en presencia de inhibidores para evitar artefactos.

RESULTADOS

Los espectrofotómetros permiten realizar la medición de la absorbancia en un lapso de tiempo continuo que se conoce en cinética enzimática como curso temporal. Es decir, se registra la aparición o desaparición de una sustancia en un determinado tiempo. En el caso del DCIP, se registra la disminución de la absorbancia en un tiempo corto de tiempo (1-5 min) en presencia de los sustratos e inhibidores necesarios para solo valorar la actividad de un complejo respiratorio a la vez.

Para determinar la actividad del complejo II en mitocondrias rotas de hígado de bovino se empleó como sustrato al succinato y se adicionaron los inhibidores del complejo I y III, rotenona y antimicina A, respectivamente. Por último, se agrega el DCIP para

iniciar la reacción (Figura 2). Una vez que los datos se registran como coordenadas (A vs t), la distribución de puntos se ajusta a una ecuación polinómica de segundo grado y se obtiene el valor de la pendiente (0.1335), el cual será empleado más adelante para calcular la actividad enzimática.

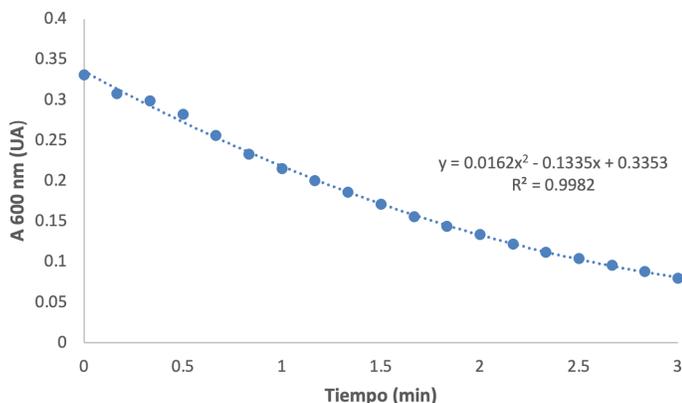


Figura 3. Curso temporal de la actividad del complejo II en mitocondrias aisladas de hígado de bovino.

Antes de transformar el valor de la pendiente del trazo anterior en actividad del complejo II se deben realizar una serie de controles importantes para evitar subestimar o sobrevalorar la actividad de la enzima. Por lo cual, se debe eliminar la posible interferencia química entre el DCIP con otros componentes mitocondriales y sus inhibidores. La Figura 3 muestra los cursos temporales obtenidos por la proteína mitocondrial en presencia de rotenona y antimicina de manera individual o combinada. Es interesante mencionar que la presencia del inhibidor del complejo I (rotenona) disminuye la reducción del DCIP ya que presenta el valor de pendiente más bajo (0.0173). Sin embargo, la presencia de antimicina A favorece la reducción inespecífica del DCIP y su combinación con rotenona no afectó la reacción química. Por tanto, se debe restar el valor de la pendiente del ensayo combinado (0.0272) al valor inicial calculado en presencia de succinato (0.1335). Al realizar el ajuste de los controles de la figura 4 se obtuvo un valor de pendiente de 0.1063 para la actividad específica del complejo II.

A continuación se debe realizar la curva estándar del DCIP y para ello es necesario medir la absorbancia a diferentes concentraciones del compuesto de acuerdo a la siguiente tabla 1. Esta curva se realiza por triplicado para mejorar la precisión de los resultados.

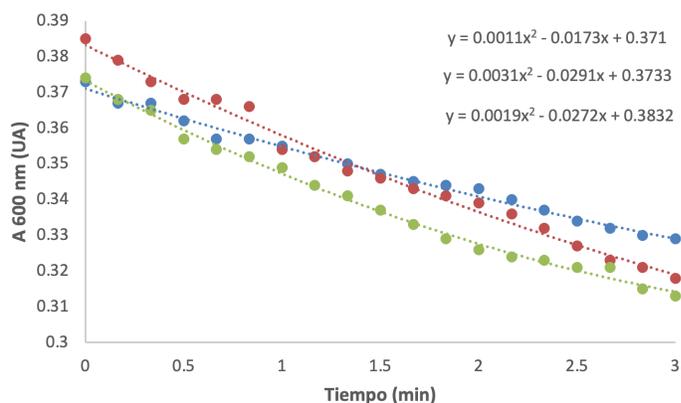


Figura 4. Curso temporal de la reducción del DCIP por mitocondrias aisladas de hígado de bovino en ausencia de succinato y presencia de inhibidores (rotenona, azul; antimicina A, naranja y ambos, gris).

Tabla 1. Curva estándar de DCIP empleando el medio de oximetría.

[] DCIP μM	μl DCIP	μl Medio oximetría
0	0	600
20	1	599
40	2	598
60	3	597
120	6	594
160	8	592
200	10	590

La Tabla 2 muestra los valores promedio de absorbancia (X) que se obtuvieron para cada una de las concentraciones del DCIP. Además de muestra la desviación estándar (DE) y el porcentaje del coeficiente de variabilidad de los datos (CV).

Tabla 2. Valores promedio, desviación estándar y variación para cada concentración de DCIP.

[] DCIP μM	\bar{X} Abs	Desviación E.	%C.V.
0	0	-	-
20	0.287	0.006164414	2.147879444
40	0.459	0.05103158	11.1099232
60	0.559	0.02426245	4.34033164
120	0.742	0.03132979	4.21855301
160	1.118	0.06521929	5.83182905
200	1.404	0.07677384	5.4669241

Al graficar los datos de la tabla 2 y ajustarlos a la ecuación de la línea recta se obtuvo $y = 6.84 \cdot 10^{-3}x + 9.62 \cdot 10^{-3}$. Por tanto, el valor de absorptividad del DCIP se obtiene directamente de la pendiente de la ecuación anterior y ajustando las unidades de concentración quedó en $6.84 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A continuación se emplea la siguiente ecuación de actividad enzimática en la cual se sustituyen el valor de la pendiente ajustada (m) de 0.1063 y de absorbividad (ϵ) de $6.84 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\text{Actividad enzima} = \frac{\left(\frac{m}{\epsilon}\right) \times F.D}{p} = \frac{\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}}{\text{mg}} = \frac{U}{\text{mg}}$$

Donde FD es el factor de dilución; p es la concentración de proteína.

$$\text{Actividad enzima} = \frac{\left(\frac{0.1063}{6.84}\right) \times 600}{0.84} = \frac{\frac{\mu\text{M}}{\text{min}}}{\text{mg}} = \frac{U}{\text{mg}}$$

La actividad del complejo II que se obtuvo fue de 11.1 U/mg para mitocondrias de hígado de bovino. Es importante recordarle al estudiante que cada trazo mostrado en este trabajo fue realizado mínimo por triplicado y que es importante reportar la actividad enzimática con su valor promedio y su desviación estándar en caso de querer comparar sus datos con otros publicados en la literatura.

DISCUSIÓN

Medir la actividad enzimática es una herramienta muy importante para conocer los procesos metabólicos y por lo cual siempre que sea posible debe ser valorado mediante cursos temporales, los cuales deben ser ajustados de acuerdo al patrón de distribución de puntos que en este estudio para determinar la actividad del complejo II en mitocondrias de hígado de bovino fue a través de la ecuación polinómica de segundo grado. Es importante destacar que nuestro valor de absorbividad es semejante a otros reportados en la literatura, pero estos valores son muy diversos y debe calcularse cada vez que se emplea el DCIP. Aunque es importante mencionar que nuestro valor es de los más pequeños reportados, ya que en general varían de 12 hasta $21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kolaj-Robin O y cols., 2011; Basner A y Antranikian G, 2014; Chen-juan Ke y cols., 2014). Sin embargo, su valor es afectado por la composición y el pH del medio de reacción y además el tiempo de su preparación.

Otro aspecto importante es que la presencia de los inhibidores respiratorios afectan de manera diferente la reducción de DCIP y requieren una valoración más precisa ya que tanto el complejo I y III utilizan una gran cantidad de grupos prostéticos y cofactores que pueden influir en el flujo de electrones hacia el DCIP. Sin embargo, tales mecanismos están fuera de los objetivos de este trabajo.

CONCLUSIÓN

El DCIP es un colorante que tiene una gran capacidad para captar electrones y se utiliza para ensayar reacciones redox por su fácil manejo. Sin embargo, este compuesto es inespecífico ya que no se une directamente a la enzima como un sustrato. Este es el caso para los complejos mitocondriales (I y II), ya que ambas enzimas generan ubiquinol y esta molécula cede los electrones al DCIP. Por tanto, es necesario emplear inhibidores específicos de los complejos (rotenona, malonato y antimicina) para realizar la corrección de la actividad. En este trabajo se demostró que en ausencia de succinato ocurre una reducción inespecífica del DCIP por componentes mitocondriales y que su velocidad de reacción se afecta por la presencia de los inhibidores. Además, que en nuestras condiciones experimentales el DCIP tiene un valor de absorbividad muy bajo de $6.84 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que corresponde a la mitad del valor reportado en la literatura y por tanto no se debe dar como un hecho que estos valores serán empleados porque así esta reportado en otros estudios.

REFERENCIAS

- Basner, A., & Antranikian, G. (2014). Isolation and biochemical characterization of a glucose dehydrogenase from a hay infusion metagenome. *Plos one*, 9(1), e85844.
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335-343.
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews Disease primers*, 2(1), 1-22.
- Hatefi, Y., & Stiggall, D. L. (1978). Preparation and properties of succinate: Ubiquinone oxidoreductase (complex II). In *Methods in enzymology*, 53 (1), 21-27.
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M., & Berridge, M. V. (2017). Functional mitochondria in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, 8, 296.
- Jahn, B., Jonasson, N. S., Hu, H., Singer, H., Pol, A., Good, N. M., & Daumann, L. J. (2020). Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1-14.

- Janssen, A. J., Trijbels, F. J., Sengers, R. C., Smeitink, J. A., Van den Heuvel, L. P., Wintjes, L. T., & Rodenburg, R. J. (2007). Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clinical chemistry*, 53(4), 729-734.
- Ke, C. J., He, Y. H., He, H. W., Yang, X., Li, R., & Yuan, J. (2014). A new spectrophotometric assay for measuring pyruvate dehydrogenase complex activity: a comparative evaluation. *Analytical Methods*, 6(16), 6381-6388.
- Kolaj-Robin, O., O'Kane, S. R., Nitschke, W., Léger, C., Baymann, F., & Soulimane, T. (2011). Biochemical and biophysical characterization of succinate: quinone reductase from *Thermus thermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(1), 68-79.
- Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*, 20(7), 745-754.

Ensamblaje molecular del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa de *Moringa oleifera*.

¹Corral-Guerrero IA, ¹Valdez-Solana MA, ²Domínguez-Avitia CI,
¹Aguilera-Ortiz M, ²Téllez-Valencia A, ¹Sierra-Campos E.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango.
Av. Artículo 123 S/N Fracc. Filadelfia. Gómez Palacio, Dgo.

²Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango.
Av. Universidad y Fanny Anitúa S/N. Durango, Dgo.

*Email: ericksier@ujed.mx

RESUMEN

Moringa oleifera es un árbol con distintas propiedades terapéuticas, como anticancerígeno, antidiabético, gran potencial antioxidante, y otras. Es una planta resistente a los climas calurosos, condiciones de sequía, de crecimiento rápido, con poca exigencia para los nutrientes del suelo, que se puede cultivar fácilmente en zonas áridas y tropicales. Uno de los mecanismos adaptativos de las plantas ante condiciones poco favorables, como fluctuaciones en la cantidad de luz captada por los fotosistemas por efecto de la zona de desarrollo del organismo, es el transporte cíclico de electrones mediado por el complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa en el cual se centra este estudio. En *M. oleifera*, solo se ha estudiado a la región transmembranal sin caracterizar a la parte citosólica, y en ninguna de estas se ha desarrollado una estructura tridimensional, nosotros mediante herramientas bioinformáticas de libre acceso como Phyre² y ClusPro 2.0 proponemos por medio de ensamblaje molecular un modelo tridimensional del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa para *M. oleifera*. Mediante Phyre² se realizó la búsqueda de homólogos estructurales para las todas las subunidades reportadas en el genoma y que aún no están caracterizadas en esta planta. Se encontraron 6 subunidades de la porción citosólica (J, I, M, N, S y O) y 7 subunidades en la porción membranal (A, B, C, D, E, F y G). Además, se elaboró un modelo tridimensional con todas las subunidades encontradas mediante acoplamiento molecular con ClusPro 2.0 y HDOCK server. Aunque desconocemos los alcances de nuestros resultados, nosotros consideramos que este estudio puede ayudar a entender la relación metabólica entre la actividad del complejo, con la resistencia y fácil desarrollo de la *M. oleifera*, ante condiciones adversas.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa, modelo tridimensional y bioinformática.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a tree with different therapeutic properties, such as anticancer, antidiuretic, great antioxidant potential, and others. It is a plant resistant to hot climates, drought conditions, fast growing, with little demand for soil nutrients, which can be easily cultivated in arid and tropical areas. One of the adaptive mechanisms of plants under unfavorable conditions, such as fluctuations in the amount of light captured by photosystems due to the effect of the organism's grow region, is the cyclical transport of electrons mediated by the NDH-1 quinone oxidoreductase complex in which this study focuses on. In *M. oleifera*, only the transmembrane region has been studied without characterizing the cytosolic part, and in none of these has a three-dimensional structure been developed, we, using free access bioinformatic tools such as Phyre² and ClusPro 2.0, propose by means of molecular assembly a three-dimensional model of the NDH-1 quinone oxidoreductase complex for *M. oleifera*. Using Phyre², the search for structural homologues was carried out for all the subunits reported in the genome and that are not yet characterized in this plant. There were 6 subunits of the cytosolic portion (J, I, M, N, S and O) and 7 subunits in the membrane portion (A, B, C, D, E, F and G). In addition, a three-dimensional model was made with all the subunits found by molecular coupling with ClusPro 2.0 and HDOCK server. Although we do not know the scope of our results, we consider that this study can help to understand the metabolic relationship between the activity of the complex, with the resistance and easy development of *M. oleifera*, in the face of adverse conditions.

Keywords: *Moringa oleifera*, NDH-1 quinone oxidoreductase complex, three-dimensional model and bioinformatics.

INTRODUCCIÓN

En su habitat natural, los organismos fotosintéticos (plantas y cianobacterias) deben adaptarse ante condiciones adversas como cambios climáticos, pocos nutrientes y fluctuaciones en la cantidad de luz solar que pueden recibir, ya sea por falta de esta o un exceso de la misma. Los organismos fotosintéticos de manera evolutiva han desarrollado distintos mecanismos protectores, como es el caso del transporte cíclico de electrones, el cual funge como regulador en la fotosíntesis ante fluctuaciones en la cantidad de luz recibida (Nikkanen, L y cols, 2018).

La fotosíntesis es un proceso oxigénico que convierte la luz solar en energía química, y del cual se sostiene la mayoría de la vida en la tierra. Este proceso ocurre en dos fases, la lumínica en donde los fotosistemas I y II por medio del complejo antena captarán fotones que excitan las moléculas de clorofila para generar ATP y NADPH en un transporte lineal de electrones (figura 1), y una fase oscura donde se consumen estos productos en una fijación de carbono (Laughlin, TG. y cols, 2020; Shikanai, T, 2016).

Frente a cantidades no constantes de luz solar, la fotosíntesis tiende a ser regulada por el complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa como mecanismo

de protección, en una ruta distinta con un transporte cíclico de electrones, en la cual no hay producción de NADPH y los electrones giran en torno al fotosistema I y el citocromo b_6/f en una síntesis exclusiva de ATP (figura 2, Laughlin, TG y cols, 2020).

El complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa está formado por 11 a 16 subunidades dependiendo de la especie. Las mejores estructuras que se conocen del complejo son de *Arabidopsis thaliana* y *Thermosynechococcus elongatus*, las cuales se encuentran depositadas en la base de datos de proteínas (Protein Data Bank; <https://www.rcsb.org/>) (Shikanai, T, 2016; Sato, S y cols., 1999). Las subunidades OPS son altamente conservadas por formar parte de la actividad catalítica. Además, su nombre se atribuye a su parecido estructural y funcional con el NADH deshidrogenasa mitocondrial, aunque a diferencia de su homólogo este se encuentra en el cloroplasto y los electrones le son transferidos por la ferredoxina (Figura 2; Laughlin, TG y cols 2019).

La NDH-1 quinona oxidoreductasa cumple un papel regulador en organismos fotosintéticos cuando las condiciones lumínicas no son favorables, es por esto que el estudio de este complejo en especies que hacen frente a condiciones inhóspitas se vuelve de gran interés, ya que con ello se podría elucidar la relación entre el complejo y la capacidad de supervivencia.

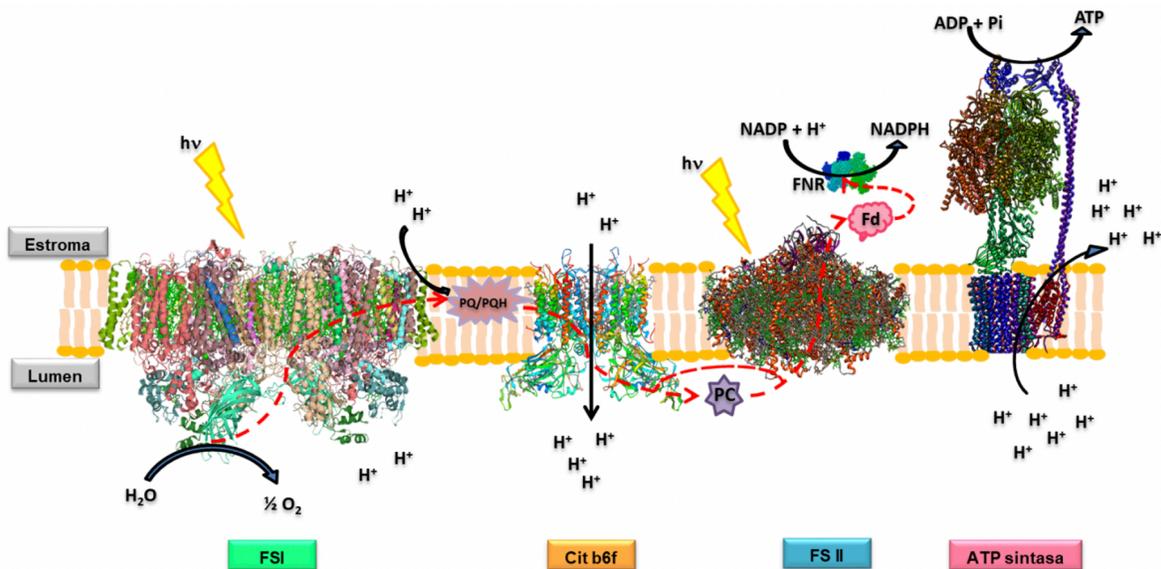


Figura 1. Transporte lineal de electrones en la fase lumínica de la fotosíntesis. FSII, fotosistema II; Cyto- b_6/f , complejo del citocromo b_6/f ; FSI, fotosistema I; PQ, plastoquinona; PQH_2 , plastoquinol; FNR, complejo ferredoxina/nitrato reductasa; Fd, Ferredoxina; ATP, Adenosín trifosfato; Pi, fosfato inorgánico; $NADP^+$, Nicotinamida-Adenina dinucleótido fosfato. Tomado y modificado de Laughlin, TG. y cols, (2020).

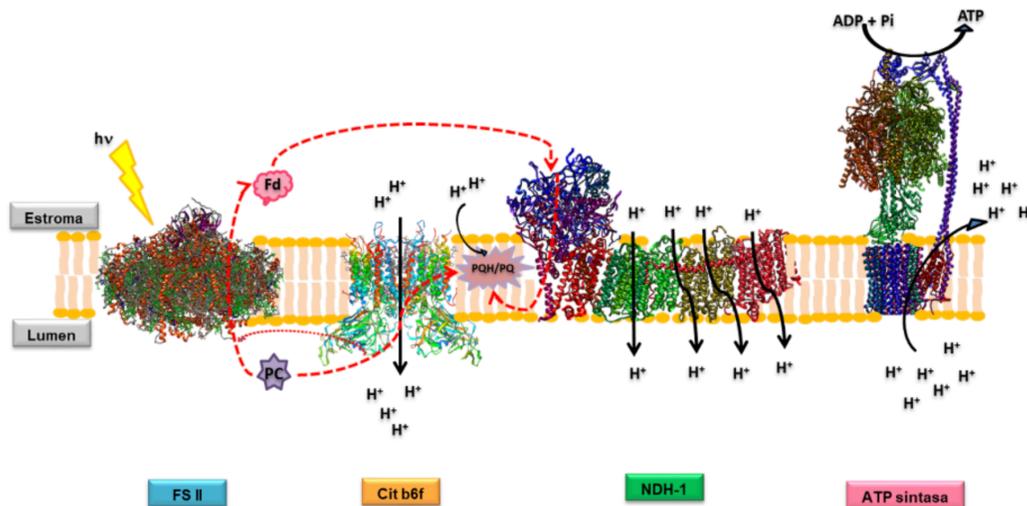


Figura 2. Transporte cíclico de electrones como mecanismo regulatorio de la fase luminosa de la fotosíntesis. La línea roja punteada indica el flujo de electrones entre los componentes FSII, Cit b6f y NDH-I. Tomado y modificado de Laughlin, TG. y cols, (2020).

La *Moringa oleifera* es una planta tolerante a la sequía de rápido crecimiento con propiedades agronómicas, nutricionales y farmacéuticas de gran valor. Recientemente se reportó el genoma del cloroplasto completo de esta planta a través del ensamblado a partir de lecturas de secuenciación de alto rendimiento de genoma completo, como un recurso para futuros estudios sobre la filogenia y la evolución de Moringaceae. Además, a pesar del número reducido de genes en el genoma compacto de *Moringa*, se encontró que 101 familias de genes, que agrupan 957 genes, se expandieron significativamente. Las familias expandidas están altamente enriquecidas para funciones cloroplastídicas y fotosintéticas. De hecho, casi la mitad de los genes que pertenecen a las familias expandidas de *Moringa* se agruparon con sus ortólogos codificados por plastidios de *A. thaliana* (Ojeda-López, J y cols., 2020).

El árbol de *Moringa oleifera* es cultivado en ciertos países en desarrollo por su alto contenido nutricional y su adaptabilidad a ambientes áridos y semiáridos. En 2015, se realizó un proyecto de alta calidad sobre la secuencia del genoma de la *M. oleifera*. En este estudio se ensambló un 91,78% del tamaño estimado del genoma y contiene 19,465 genes que codifican proteínas. El análisis genómico comparativo entre *M. oleifera* y los genomas de plantas leñosas relacionadas ayuda a aclarar la evolución general de esta especie, mientras que la identificación de varias familias de genes específicos de la especie y genes seleccionados positivamente en *M. oleifera* puede ayudar a identificar genes relacionados con el alto contenido de proteínas

de *M. oleifera* contenido, crecimiento rápido, tolerancia al calor y al estrés (Tian Y *et al.*, 2015).

El genoma del cloroplasto tiene 160,600 pares de bases (pb) de longitud, con una región grande de copia única (LSC) de 88,577 pb, una región pequeña de copia única (SSC) de 18,883 pb, separada por dos regiones de repetición invertida (IR) de 26,570 pb cada una y se predijo que contiene 131 genes, con un contenido global de GC del 36,78% (Lin, W y cols., 2019).

A nivel de proteína, existe muy poca información sobre las estructuras de las proteínas que participan en los diversos procesos metabólicos que ocurren en la *M. oleifera*. Sin embargo, las herramientas bioinformáticas que se tienen pueden ser de apoyo para comenzar a elucidar la caracterización estructural de complejos multiproteicos como la NDH-1 quinona oxidoreductasa.

Phyre² es un conjunto de herramientas disponibles en la web para predecir y analizar la estructura, función y mutaciones de las proteínas. El enfoque de Phyre² es proporcionar a los biólogos una interfaz simple e intuitiva para herramientas de bioinformática de proteínas de última generación (Kelley LA *et al.*, 2015).

El servidor ClusPro (<https://cluspro.org>) es una herramienta ampliamente utilizada para el acoplamiento proteína-proteína. El servidor proporciona una página de inicio simple para uso básico, que requiere solo dos archivos en formato Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, ClusPro también ofrece una serie de opciones avanzadas para modificar la búsqueda; Estos

incluyen la eliminación de regiones de proteínas no estructuradas, la aplicación de atracción o repulsión, las restricciones de distancia por pares, la construcción de homo-multímeros, la consideración de datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y la ubicación de los sitios de unión de heparina (Kozakov *et al.*, 2017).

En base a todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue emplear los servidores online Phyre² y ClusPro para elucidar el modelo estructural de la NDH-1 quinona oxidoreductasa y mediante este enfoque poder generar conocimiento sobre la relación metabólica entre la actividad del complejo, con la resistencia y su fácil desarrollo de la *M. oleifera*, ante condiciones adversas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las secuencias de residuos de aminoácidos para cada subunidad disponible del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa fueron recuperadas de UniProt (<https://www.uniprot.org>) como un formato FASTA para las especies de *Moringa oleifera* y *Arabidopsis thaliana*.

Con las subunidades de *Arabidopsis thaliana* correspondientes a la región citosólica del complejo, se realizó un análisis de alineamiento básico de secuencias (BLAST) en el servidor de la National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sobre el genoma de *Moringa oleifera* (secuenciado por método shotgun). Una vez ubicada cada subunidad en el genoma de moringa, estas fueron cargadas en un motor de búsqueda y reconocimiento de homólogos proteicos a estructuras curadas o caracterizadas en el servidor de Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/phyre2/html/page.cgi?id=index>), en donde se recuperaron los archivos PDB con las coordenadas atómicas para construir los modelos tridimensionales. Se ensambló cada subunidad del complejo por medio de acoplamiento molecular (docking) a partir de los servidores ClusPro (<https://cluspro.bu.edu>) y HDock server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), finalmente se generó un candidato a modelo completo tanto de la región citosólica como la transmembranal del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa de *Moringa oleifera*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante alineamiento de secuencias tipo “Blast” se encontraron similitudes entre las secuencias de nucleótidos del genoma reportado de *M. oleifera* con aquellas conocidas para otras plantas y de esta forma encontrar los genes que forman parte de cada subunidad del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa, Las subunidades membranales del complejo NDH-1 ya fueron reportadas previamente (Ojeda-López, J. y cols., 2020), sin embargo, no existe información sobre las subunidades citosólicas y por tanto no se cuenta registro en *M. oleifera*, entonces se decidió tomar las secuencias de *A. thaliana* por ser un modelo vegetal bien caracterizado en este aspecto.

Además, el genoma de *M. oleifera* únicamente se encuentra disponible en forma de fragmentos o andamios (scaffolds), ya que fue secuenciado por el método SHOTGUN, por lo que las subunidades se situaron en el scaffold del genoma en base al mayor puntaje de homología o probabilidad entre los 57,000 fragmentos disponibles. En este caso el valor E fungió como guía durante la elección de scaffolds, ya que al tratarse de fragmentos y no precisamente de genes, la longitud de estos puede contribuir a la disminución del porcentaje de cobertura entre las secuencias. Tomando en cuenta lo anterior, se situó en la región más probable a cada una de las subunidades del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa, que podrían corresponder al gen que codifica para cada una de las subunidades del complejo (tabla 1).

En base a la información disponible en la tabla 1 se procedió con el modelado de la estructura tridimensional de cada subunidad con ayuda del servidor Phyre², donde se introdujo cada una de las secuencias de residuos de aminoácidos, para que este servidor predijera los motivos estructurales por medio de una comparación entre la secuencia de las subunidades y las de estructuras existentes bien caracterizadas y cuya estructura está disponible en el banco de datos de proteínas (PDB), la forma más probable en la que estas podrían generar una conformación tridimensional. Este servidor de búsqueda relacionó las secuencias introducidas con las subunidades del complejo para la especie de *Thermosynechococcus elongatus*, en donde se predijo con una confianza del 100%, aunque con porcentaje de identidad variable de 41 a 66% entre secuencia y estructura homóloga, que el modelo más apegado a cada subunidad del complejo NDH-1

Tabla 1. Análisis tipo BLAST entre el genoma de *Moringa oleifera* y la secuencia de cada subunidad del complejo, con un * como distintivo a aquellas subunidades que se tomaron de *Arabidopsis thaliana* y corresponden a la región catalítica.

Subunidad	Andamio	Cobertura de la secuencia	Valor E	Porcentaje de identidad	Longitud del andamio
A	38847	82%	5.00E-67	79.17%	3364
B	6159	64%	4.00E-46	59.69%	7742
C	56448	49%	8.00E-30	93.22%	1381
D	34400	58%	4.00E-35	88.75%	1562
E	15002	63%	2.00E-15	59.38%	3413
F	2089	98%	2.00E-102	67.37%	1324
G	40989	80%	1.00E-46	85.71%	1213
H	40898	58%	8.00E-111	77.17%	1038
I	3093	61%	5.00E-35	80.28%	16288
J	7236	80%	6.00E-42	60.31%	2065
K	37393	77%	1.00E-53	98.39%	1979
*L	5339	60%	4.00E-21	44.90%	25881
*M	2718	98%	3.00E-49	60.26%	25737
*N	43357	100%	7.00E-61	49.63%	31043
*O	42384	48%	2.00E-10	41.11%	25415
*S	15639	90%	2.00E-75	58.15%	83761

Tabla 2. Análisis de homología estructural por medio del servidor Phyre² en la región transmembranal del complejo y función de cada subunidad.

Subunidad	A	B	C	D	E	F	G
Especie de referencia	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>
Especie de la propuesta del templado	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
Confidencia	100	100	100	100	100	100	100
Porcentaje de identidad	60	49	60	53	55	51	42
Función	Soporte y vínculo de los canales de protones a la membrana plasmática	Canal de protones	Soporte y vínculo de los canales de protones a la membrana plasmática	Canal de protones	Soporte y vínculo de los canales de protones a la membrana plasmática	Canal de protones	Soporte y vínculo de los canales de protones a la membrana plasmática

Tabla 3. Análisis de homología estructural por medio del servidor Phyre² en la región citosólica del complejo y función de cada subunidad.

Subunidad	H	I	J	K	L	M	N	O	S
Especie de referencia	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Especie de la propuesta del templado	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
Confidencia	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Porcentaje de identidad	41	63	54	66	41	49	45	44	52
Función	Brinda soporte y estructura al complejo en general.	Alberga el final de los grupos Fe-S	Brinda soporte y estructura al complejo en general.	Brinda soporte y estructura al complejo en general.	Brinda soporte y estructura al complejo en general.	Estabilidad estructural, aporta hidrofobicidad	Estabilidad estructural	Unión a ferredoxina	Unión a ferredoxina

quinona oxidorreductasa de *M. oleifera* corresponde a una cianobacteria como se muestra en la tabla 2 y 3, sin embargo este servidor genera únicamente una estructura ya existente que será homóloga a la secuencia que se le ingrese.

El acoplamiento molecular de las regiones citosólica y transmembranal del complejo NDH-1 quinona oxidorreductasa se realizó en base a las subunidades que el servidor Phyre² de búsqueda arrojó como plantados de la especie *Thermosynechococcus elongatus*, para mostrar la estructura más probable a desarrollarse por parte de la especie *Moringa oleifera* con los datos disponibles. El ensamblaje molecular del complejo NDH-1 quinona oxidorreductasa, se realizó en base a las estructuras propuestas por el motor de búsqueda de homologías. Por medio de la predicción de acoplamientos entre las subunidades (docking) mediante interacción proteína-proteína por el servidor ClusPro se formaron a las regiones citosólica catalítica y transmembranal del modelo *in silico* de NDH-1 quinona oxidorreductasa para *M. oleifera* (figura 3 y 4). Es interesante mencionar que las subunidades que forman la porción citosólica presentan elementos de estructura secundaria muy diversos desde

motivos tipo barril de hoja beta (subunidad S) hasta grandes secciones de loop (subunidad I) (Figura 3).

Las subunidades que forman la porción membranal presentaron una gran cantidad de alfa-hélices donde las subunidades B, D y F presentan la mayor cantidad de pases transmembranales y una parte de la subunidad F interactúa con las subunidades B, D y E. Sin embargo, la estructura de la subunidad C fue menos definida y se acopla más fácilmente con las subunidades A y G (Figura 4).

La integración completa del complejo fue realizada bajo el conocimiento de la función individual de cada una de las subunidades tabla 2 y 3, generándose una propuesta de complejo anclado a la membrana tilacoidal con la región catalítica ubicada hacia el estroma Figura 5. Es importante destacar que este modelo correlaciona bien con aquellos estudios reportados previamente en la literatura (Laughlin, TG y cols., 2020; Zhang, C y cols., 2020) y aunque en plantas se considera que el complejo NDH-1 quinona oxidorreductasa es importante en el reciclamiento de electrones no se puede descartar que este complejo realice más funciones dentro del fotosistema como ocurre en las cianobacterias.

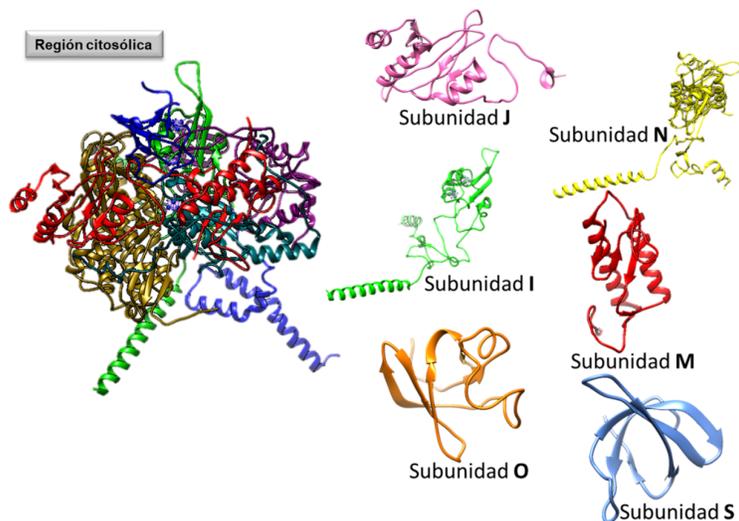


Figura 3. Construcción de la región catalítica del complejo que se encuentra en la región citosólica a partir de la estructura tridimensional de los templates de las diferentes subunidades (I, J, O, N, M, S) provenientes de Phyre².

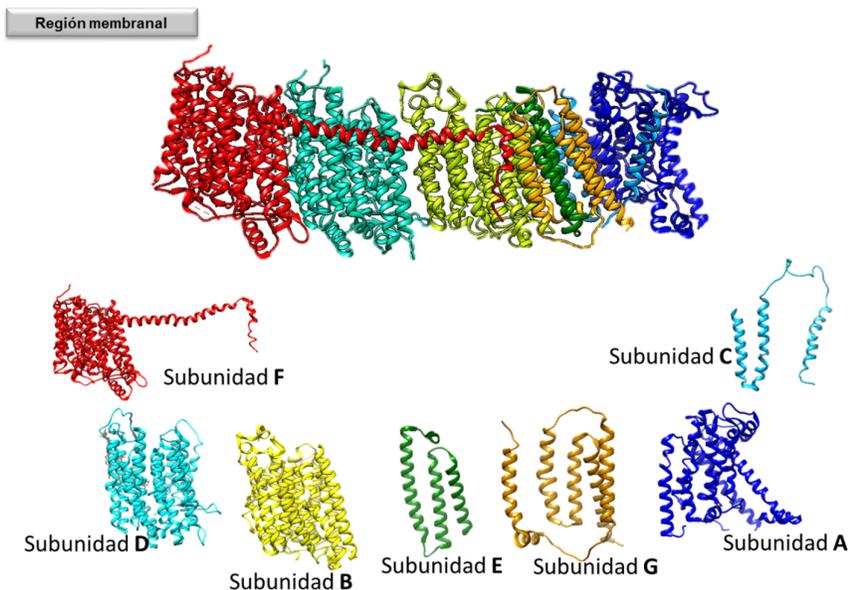


Figura 4. Construcción de la región transmembranal del complejo a partir de la estructura tridimensional de los templates provenientes de Phyre².

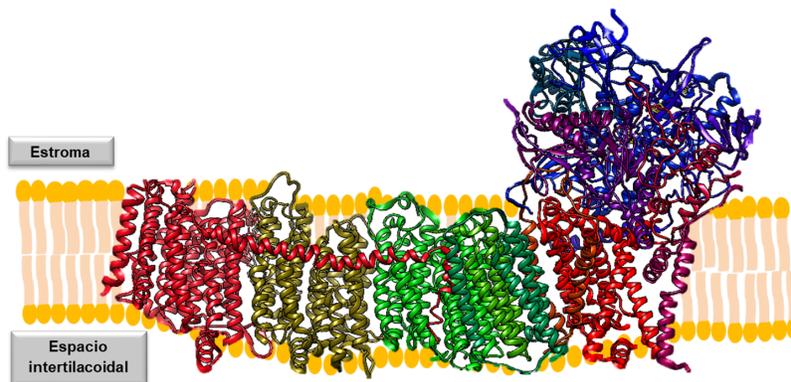


Figura 5. Integración del complejo NDH-1 quinona oxidoreductasa cloroplástico en la membrana del tilacoide con el uso de los programas ClusPro2.0 y HDock server.

CONCLUSIÓN

A través del uso de herramientas bioinformáticas de acceso libre (Phyre², ClusPro2.0 y HDock server) fue posible conocer los genes y las posibles estructuras de cada subunidades que forman parte del complejo NDH-1 quinona oxidorreductasa de *Moringa oleifera* para desarrollar un modelo estructural tridimensional muy parecido a aquel reportado para la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus*. Por tanto, esta información servirá de base para conocer la relevancia de este complejo en la capacidad adaptativa de *M. oleifera*.

REFERENCIAS

- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc. 2015 Jun;10(6):845-58. doi: 10.1038/nprot.2015.053. Epub 2015 May 7. PMID: 25950237; PMCID: PMC5298202.
- Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. The ClusPro web server for protein-protein docking. Nat Protoc. 2017 Feb;12(2):255-278. doi: 10.1038/nprot.2016.169. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28079879; PMCID: PMC5540229.
- Laughlin, T. G., Savage, D. F., & Davies, K. M. (2020). Recent advances on the structure and function of NDH-1: The complex I of oxygenic photosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1861(11), 148254.
- Laughlin, T. G., Bayne, A. N., Trempe, J. F., Savage, D. F., & Davies, K. M. (2019). Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis. Nature, 566(7744), 411-414.
- Lin, W., Dai, S., Chen, Y., Zhou, Y., & Liu, X. (2019). The complete chloroplast genome sequence of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). Mitochondrial DNA Part B, 4(2), 4094-4095.
- Nikkanen, L., Toivola, J., Trotta, A., Diaz, M. G., Tikkanen, M., Aro, E. M., & Rintamäki, E. (2018). Regulation of cyclic electron flow by chloroplast NADPH-dependent thioredoxin system. Plant Direct, 2(11), e00093.
- Ojeda-López, J., Marczuk-Rojas, J.P., Polushkina, O.A. et al. Evolutionary analysis of the *Moringa oleifera* genome reveals a recent burst of plastid to nucleus gene duplications. Sci Rep 10, 17646 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73937-w>
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. DNA research, 6(5), 283-290.
- Shikanai, T. (2016). Chloroplast NDH: a different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1857(7), 1015-1022.
- Tian Y, Zeng Y, Zhang J, Yang C, Yan L, Wang X, Shi C, Xie J, Dai T, Peng L, Zeng Huan Y, Xu A, Huang Y, Zhang J, Ma X, Dong Y, Hao S, Sheng J. High quality reference genome of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.), a potential perennial crop. Sci China Life Sci. 2015 Jul;58(7):627-38. doi: 10.1007/s11427-015-4872-x. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26032590.
- Zhang, C., Shuai, J., Ran, Z. et al. Structural insights into NDH-1 mediated cyclic electron transfer. Nat Commun 11, 888 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14732-z>

Cuerpo académico UJE-CA-103 Ciencia y Tecnología de Alimentos

LGAC: Desarrollo e innovación de Alimentos

Nombre proyecto	Investigador responsable	
<p>Potencial nutracéutico de maíz pigmentado cultivado en la comarca lagunera.</p>	<p>Miguel Aguilera Ortíz</p> 	
<p>Caracterización y purificación de la enzima coagulante de la leche presente en la <i>Moringa oleifera</i> y su uso potencial en la elaboración del queso de soya.</p>	<p>Erick Sierra Campos</p> 	
<p>Purificación y caracterización bioquímica de las proteasas de la semilla de <i>Moringa oleifera</i> Lam. Y su uso potencial en la producción de péptidos bioactivos por la hidrólisis de la K-caseína y β-conglucina</p>		
<p>Los polifenoles del extracto de <i>Moringa oleifera</i> evitan la disfunción mitocondrial y estimular el estado redox celular en ratas con diabetes tipo II.</p>		
<p>Proteómica y genómica de especies bacterianas y virales aisladas de especies animales</p>		
<p>El extracto de las hojas de <i>Moringa oleifera</i> protege contra la dislipidemia metabólica en ratas diabéticas al regular la paraoxonasa-1 y la oxidonitrosintasa</p>		
<p>Compuestos activos con capacidad hipoglucemiante en <i>Cnidioscolus chayamansa</i> (chaya), <i>Euphorbia prostrata</i> (Hierba de la golondrina), y <i>Jathropha dioica</i> (Sangre de drago).</p>	<p>Juan Ramón Esparza Rivera</p> 	
<p>Producción de hortalizas de alta rentabilidad con sustratos y soluciones nutritivas orgánicas bajo invernadero.</p>		
<p>Diseño y uso de cubiertas comestibles a base de polisacáridos para aumentar la vida de anaquel de frutas y hortalizas</p>	<p>Jorge Armando Meza Velázquez</p> 	
<p>Aplicación de tecnologías emergentes para la conservación de alimentos</p>		

Cuerpo Académico UJE-CA-131 Ciencias Farmacoquímicas de Productos Naturales

LGAC: Farmacoquímica de los Productos Naturales

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Resistencia bacteriana a los antibióticos y búsqueda de serotipos bacterianos de interés clínico	Concepción García Luján	
Productos naturales con propiedades bioactivas en plantas del semidesierto y en productos de la colmena		
Desarrollo de diversos productos a base de cera de candelilla (<i>Euphorbia Antisiphylitica</i>)	Miguel Téllez López	
Aislamiento e identificación de alcaloides presentes en las hojas de <i>Coffea arabica</i>		
Evaluación hipoglucemiante de diversas especies vegetales		
Actividad biológica, farmacológica e inhibición enzimática de los géneros <i>Cirsium Silybum</i>	Ruth Alanís Bañuelos	
Relevancia de polimorfismos genéticos para las reacciones adversas y la respuesta clínica a fármacos		
Biofortificación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. con selenio		
Evaluación fitoquímica, toxicológica e identificación molecular de <i>Ibervillea sonorae</i> Greene	Ángeles Sáenz Esqueda	
Evaluación del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de mezclas del gel de aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i> Miller) y pasta prensada de uva (<i>Vitis vinifera</i>) obtenidas mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia		

QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA

(Biotecnología, Toxicología, Farmacéutica, Clínica)



"Nunca dejes de sonreír, ni siquiera cuando estes triste, porque nunca sabes quien se puede enamorar de tu sonrisa"

Gabriel Gracia Márquez (1927-2014); escritor colombiano, premio Nobel de literatura.

El uso de la ϵ -poli-L-lisina como posible antifúngico para el tratamiento de *Candida albicans*

¹Ríos-Cifuentes Laura, ¹Sánchez Norma Silvia, ¹Padilla-Garfias Francisco, ¹Calahorra Martha, y ¹Peña Antonio

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*Email de correspondencia: apd@ifc.unam.mx

RESUMEN

Las candidiasis son infecciones causadas principalmente por *Candida albicans*, una levadura patógena oportunista que aprovecha la predisposición del huésped y sus factores de virulencia para desarrollarse. Durante los últimos años, el aumento en la resistencia de los tratamientos disponibles ha llevado a los investigadores a la búsqueda de alternativas terapéuticas. La ϵ -poli-L-lisina (EPL) es un homopolímero que presenta actividad antimicrobiana; sin embargo, los estudios disponibles en levaduras son escasos, por lo cual su mecanismo de acción no se ha esclarecido. En esta revisión se reúne información sobre *C. albicans* y lo reportado, hasta ahora, sobre el efecto antimicrobiano de la EPL, con el propósito de tener una base para futuras investigaciones sobre el mecanismo de acción de esta polication, para que pueda ser utilizado como alternativa antifúngica contra este patógeno de importancia médica.

Palabras clave: *Candida albicans*, candidiasis, antimicrobianos, policationes, ϵ -poli-L-lisina.

ABSTRACT

Candidiasis are fungal infections caused by opportunistic pathogenic yeast called *Candida albicans*. *Candida* takes advantage of the host predisposition and its virulence factors to induce disease. During the last years, the increasing resistance to the available treatments has urged the scientists to search for alternative therapeutics. ϵ -poly-L-lysine (EPL) is a homopolymer that has antimicrobial activity; however, there is a shortage of research on its applications in yeast, and besides, its mechanism of action has not been determined. This review gathers information about *C. albicans* and what has been reported about the EPL antimicrobial effect in order to have enough information for future investigations to elucidate the action mechanism of the polycation and its use as an antifungal alternative against the medical importance pathogen.

Key words: *Candida albicans*, candidiasis, antimicrobials, polycations, ϵ -poly-L-lysine.

INTRODUCCIÓN

Candida albicans es una levadura patógena oportunista que representa un importante problema de salud, por ser resistente a varios fármacos y por su capacidad de presentar múltiples factores de virulencia (da Silva Dantas *et al.*, 2016).

La ϵ -poli-L-lisina (EPL) es un homopolímero del aminoácido L-lisina caracterizado por su atípico enlace peptídico entre los α -carboxilos y los ϵ -aminos del aminoácido L-lisina. Este homopolímero presenta actividad antimicrobiana y en algunos países se utiliza como aditivo y conservador alimenticio; además, cuenta con un certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*). El mecanismo de acción de la EPL no se ha elucidado completamente, pero se ha propuesto que la adsorción a la superficie celular juega un papel importante. Se ha sugerido que el polipéptido catiónico interactúa con la superficie celular cargada negativamente por adsorción iónica y posteriormente interactúa con las membranas celulares produciendo su permeabilización (Hyldgaard *et al.*, 2014).

Candidiasis

Las candidiasis son micosis causada por diversas especies del género *Candida*; las cuatro más frecuentes son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; sin embargo, *C. albicans* es la responsable del 40-80% de ésta. Los pacientes pueden presentar cuadros clínicos que afectan principalmente mucosas (boca, vagina), piel, uñas y, de manera excepcional, órganos como los pulmones e intestino. *C. albicans* es un hongo asexual y pleomórfico, es decir, puede crecer como levadura mediante gemación o desarrollar pseudohifas por alargamiento y unión de levaduras o como hifas verdaderas (Bonifaz, 2016).

C. albicans está presente en la mayoría de las personas como un hongo comensal, ya que forma parte de la microbiota normal de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario; pero puede comportarse como oportunista en personas inmunocomprometidas. El comensalismo de *C. albicans* está relacionado con factores intrínsecos (regulación de genes, morfología celular, adaptación y carga fúngica) y extrínsecos (microbiota competitiva, dieta y estado inmunológico del paciente). Los cambios en el equilibrio patógeno-huésped llevan a la disbiosis, lo cual provoca

que se comporte como un oportunista (Bonifaz, 2016).

Las condiciones para que *C. albicans* se comporte como oportunista son que soporte 37°C y se adapte a diferentes condiciones del huésped como la disponibilidad de nutrientes, pH, hipoxia y niveles de CO₂, entre otros, de manera que puede colonizar diferentes nichos; cabe resaltar que la presencia de factores de virulencia le permite evadir eficientemente el sistema inmunitario (da Silva Dantas *et al.*, 2016). Las condiciones de predisposición del huésped también contribuyen a que se presente como un patógeno oportunista; entre ellas se encuentran la presencia de enfermedades como el cáncer, diabetes mellitus, enfermedades hematológicas, enfermedad vascular periférica y pancreatitis, procesos debilitantes como trasplantes de órganos sólidos o de células madre, cirugías, obstrucción urinaria, trauma o diálisis, inmunodeficiencias como infección por VIH, o estar bajo tratamiento con antibióticos, corticoterapia o quimioterapia (Bonifaz, 2016).

Factores de virulencia de *C. albicans*

Los factores de virulencia de *C. albicans* le permiten evadir el sistema inmunológico y desarrollar con éxito la enfermedad, como se describe a continuación:

La flexibilidad metabólica le permite adaptarse a diversas condiciones que enfrenta, tal es el caso del uso eficiente de fuentes alternativas de carbono, resistencia al estrés y cambios en la superficie celular (da Silva Dantas *et al.*, 2016).

Las enzimas hidrolíticas extracelulares de *C. albicans* le permiten digerir las moléculas proteicas para obtener nutrientes, evadir el sistema inmunitario e incluso degradar el tejido conectivo para facilitar la adhesión y la invasión a los tejidos. Entre las principales enzimas se encuentran las proteasas, fosfolipasas y lipasas (da Silva Dantas *et al.*, 2016).

Las proteasas, en especial las aspartil proteinasas secretadas (Saps), le proporcionan un sistema proteolítico eficiente y flexible que desempeña un papel importante en las infecciones de las mucosas, ya que degradan las superficies celulares del huésped, como la queratina, colágeno, mucina y laminina, o hidrolizan las proteínas de defensa como la lactoferrina salival, las enzimas del estallido respiratorio de los macrófagos e inmunoglobulinas (Rivera *et al.*, 2005).

Las fosfolipasas, en especial la fosfolipasa B (PLB) presenta actividad de hidrolasa y fosfolipasa-transacilasa, es secretada en la punta de las hifas durante la invasión de los tejidos (Rivera *et al.*, 2005).

Las lipasas están asociadas con la adhesión a la célula del hospedero, al daño tisular y a la inducción de respuestas inflamatorias del huésped. La expresión de los genes (*LIP1-LIP10*) que codifican para ciertas lipasas dependen del estado de la infección (Castillo *et al.*, 2019).

La candidalísina es una toxina peptídica citolítica secretada por la forma invasiva (hifa) de *C. albicans*, es fundamental para desarrollar las infecciones en mucosas y las infecciones sistémicas, ya que daña las células epiteliales y activa las células para el reclutamiento de neutrófilos y los linfocitos Th17 (Naglik *et al.*, 2019).

El cambio fenotípico de *C. albicans*, también conocido como transición blanco-opaco, es una variación no sexual que genera diferencias en la morfología macroscópica y microscópica, así como su vulnerabilidad hacia las células inmunes y su virulencia; las células blanco presentan morfología pequeña y redonda y están presentes en la colonización de tejidos e infecciones sistémicas, además liberan quimioatrayentes reconocidos por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en comparación con las células opaco que tienen una morfología más alargada, no atraen PMN, evaden la respuesta inmune innata e inician la expresión de los factores de adherencia (Geiger *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2002; Staniszevska *et al.*, 2013).

C. albicans tiene la capacidad de adherirse a las células del huésped, lo cual la hace más patógena. Las adhesinas son biomoléculas que promueven su adhesión a las

células del huésped o a sus ligandos específicos, como son ciertas proteínas de la matriz extracelular de las células del huésped, como laminina, fibrinógeno, fibropectina y colágeno (de Groot *et al.*, 2013).

Existen diversas adhesinas que expresa *C. albicans*; por ejemplo, las codificadas por el grupo de genes *ALS* (Als 1-7 y 9), *HWP* (Hwp2, Ywp1, Eap1) e *IFF/HYR* (Hyr1, Hyr3, Iff1-11) que contribuyen a la formación de la biopelícula y son necesarias para la virulencia de *C. albicans*; la biopelícula le proporciona mayor resistencia al ataque de los antifúngicos, le permite evadir el sistema inmunitario y moléculas inductoras o *quorum sensing* (de Groot *et al.*, 2013; Satyanarayana & Kunze, 2017).

El dimorfismo fúngico o morfogénesis es el fenómeno que presentan algunos hongos patógenos en el cual se observa una morfología en su vida libre y otra diferente al parasitar. La morfogénesis en *C. albicans* se expresa en la transición de su forma levaduriforme a la filamentosa (pseudohifas o hifas verdaderas) en respuesta a la temperatura, suero, pH, CO₂, deficiencia de nutrientes, entre otros (Figura 1). El crecimiento de la forma filamentosa tiene ventajas sobre la levaduriforme en la penetración de la célula o tejido, debido a que en la punta de la hifa se secretan enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, lo que facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos (Rivera *et al.*, 2005).

En general, la forma de levadura predomina durante la colonización de la mucosa en el huésped sano, pero la hifa aparece cuando las defensas de éste se debilitan; en este sentido, ambas formas de crecimiento desempeñan

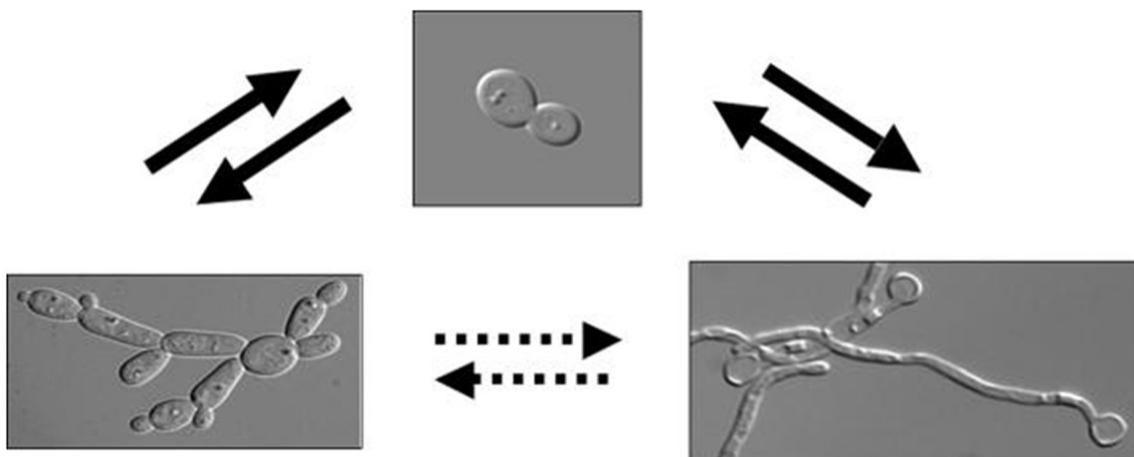


Figura 1. Transición en la morfología de *C. albicans*. Las células en levadura (centro superior), pseudohifas (abajo a la izquierda) e hifas verdaderas (abajo a la derecha) (tomada de Berman, 2006).

un papel importante en la patogénesis y colonización de diversos nichos en el huésped (Rivera *et al.*, 2005).

C. albicans tiene la capacidad de contrarrestar la inmunidad nutricional y puede asimilar nutrientes para su crecimiento dentro del huésped, aspecto que lo hace un patógeno eficiente. Sin embargo, algunos micronutrientes, como el hierro y el zinc, se retienen activamente en los patógenos invasores en un proceso llamado inmunidad nutricional; ya que el patógeno expresa transportadores que le permiten la captación de micronutrientes, como es el caso en que las hifas de *C. albicans* que tienen la capacidad de unirse a los eritrocitos y lisarlos para obtener hierro a partir del grupo hemo. Se conoce que la proteína de superficie Rbt5 es la que actúa como receptor de la hemoglobina (Crawford & Wilson, 2015).

C. albicans es capaz de evadir la fagocitosis, ya que es posible que aumente su alcalinidad neutralizando el pH del interior del fagolisosoma o que genere antioxidantes y así supere el estrés oxidante. De esta manera, *C. albicans* puede salir del interior del fagocito sin ser degradada, ya sea por vomocitosis, es decir, por exocitosis (una expulsión sin provocar la lisis del macrófago) o por la lisis del macrófago como consecuencia de la extensión de la hifa o por la piroptosis del macrófago que implica la activación de la caspasa-1 y caspasa-11 así como la secreción de IL-1 β (da Silva Dantas *et al.*, 2016; Wellington *et al.*, 2013).

Otra estrategia de esta levadura oportunista es su capacidad para cambiar la arquitectura y composición de su pared celular, afectando la inmunogenicidad y alterando la expresión y presentación de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) para evitar la unión con los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). La pared celular de *C. albicans* está formada principalmente por tres polisacáridos; la quitina, los glucanos y los mananos (de tipo O- y N-), los cuales se encuentran organizados en dos capas: la capa externa, rica en mananos unidos a proteínas y la capa interna, que contiene quitina y β -glucano (Alburquenque & Tapia, 2013).

Antifúngicos contra la Candidiasis

Actualmente existen cuatro tratamientos para las candidiasis: azoles, polienos, equinocandinas y análogos de pirimidina, pero es baja la probabilidad de un tratamiento exitoso y aumentan las posibilidades

de un desenlace fatal si el patógeno es resistente a uno o varios fármacos (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

Los azoles son compuestos heterocíclicos aromáticos de cinco miembros que contienen al menos un átomo de nitrógeno en su anillo, entre los más usados están los triazoles. Estos fármacos actúan dirigiéndose a la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa del citocromo P450, que convierte al lanosterol en ergosterol; esta enzima está codificada por el gen *ERG11*. El ergosterol es el principal esteroide de la membrana celular, importante para el control de su fluidez. Como consecuencia de la acción de los azoles, la membrana celular de *Candida* spp. se vuelve deficiente de ergosterol y acumula otros esteroides tóxicos 14 α -metilados, lo que provoca la disminución de la fluidez de la membrana y, en la mayoría de los casos, la inhibición del crecimiento celular. El fluconazol es el fármaco azólico más utilizado para el tratamiento de las candidiasis; sin embargo, se considera que su uso extendido ha provocado la aparición de cepas resistentes (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

Se ha encontrado que los imidazoles; ketoconazol y miconazol entran a las células por difusión simple y, además de inhibir la síntesis de ergosterol, producen un eflujo de K⁺, alterando su homeostasis. Tienen un efecto fungistático, no provocan la lisis celular pero sí la salida de aniones como fosfato inorgánico y nucleótidos, así como la entrada de H⁺ (Calahorra *et al.*, 2011).

Los polienos son compuestos orgánicos poliinsaturados que contienen al menos tres enlaces carbono-carbono dobles y simples alternos. Su acción antifúngica está mediada por la unión con el ergosterol que forma canales en la membrana celular que tienen como resultado la pérdida de la permeabilidad de la membrana, pérdida de iones y moléculas; también se une con esteroides intracelulares causando daños celulares principalmente en las vías de la respiración celular, activa mecanismos oxidantes y tiene efectos inmunomoduladores, asimismo puede activar algunas funciones de los linfocitos. El más utilizado es la anfotericina B desoxicolato, que fue el primer fármaco antifúngico exitoso aprobado. En la actualidad, la anfotericina B se usa ampliamente a pesar de su alta toxicidad provocada por la unión con el colesterol (componente de las membranas celulares humanas), lo cual genera efectos tóxicos a nivel renal. Otro problema se encuentra en que sólo a altas concentraciones tiene efecto fungicida, pues a bajas concentraciones sólo tiene efecto fungistático (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018; Ruiz-Camps &

Las equinocandinas son lipopéptidos anfifílicos, entre los que se encuentran la caspofungina, micafungina y anidulafungina, que inhiben la biosíntesis de 1,3- β -glucano, al actuar sobre la 1,3- β -glucano sintasa, enzima necesaria para la formación del polímero de la pared celular, codificada por los genes *FKS1* y *FKS2*. Como resultado de su acción, causan la inestabilidad osmótica en la célula y su lisis (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

El uso del análogo de pirimidina, flucitosina (5-fluorocitosina), es limitado debido a que se han encontrado cepas de *Candida* spp. resistentes a este fármaco si es utilizado en monoterapia. Tiene un efecto fungistático. Es transportado por la citosina permeasa al interior de la célula fúngica donde es desaminada a 5-fluorouracilo por la citosina desaminasa y, posteriormente, se convierte en 5-fluorouridina, generando ARN aberrante o en 5-fluorodesoxiuridina que interfiere con la síntesis de ADN (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

Los principales mecanismos asociados con la resistencia a los azoles para *Candida albicans* son la mutación del gen *ERG11*, dando como resultado una sobreexpresión de la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa o una alteración en la enzima que disminuye o acaba con su afinidad al fármaco impidiendo su efecto. También las mutaciones en los genes de resistencia a fármacos de *Candida* (*CDR1* y *CDR2*) y en los genes de resistencia a múltiples fármacos (*MDR1*) ayudan a disminuir la acumulación de fármaco intracelular (Paul *et al.*, 2019).

A pesar de que no es frecuente la resistencia de *Candida* spp. a los antifúngicos polienos, en específico la anfotericina B, cuando ocurre se le relaciona con una disminución de los niveles de ergosterol en la membrana celular a causa de mutaciones en los genes *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* y *ERG11* que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de ergosterol, observándose una disminución de las mismas; sin embargo, esta resistencia no se ha caracterizado muy bien (Bhattacharya *et al.*, 2020; Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

Las mutaciones puntuales en los *hotspots* de los genes *FKS1* y *FKS2* causan la resistencia a las equinocandinas, lo cual resulta en una disminución de la afinidad del fármaco con su blanco la 1,3- β -glucano sintasa

La disminución de la susceptibilidad a la flucitosina se ha asociado con mutaciones puntuales en *FCY1*, *FCY2* y *FUR1*. Los cambios en *FCY2* interfieren con la absorción del fármaco (inactivación de la citosina permeasa), y las alteraciones en *FCY1* y *FUR1* inactivan las enzimas implicadas en la vía de la pirimidina, la citosina desaminasa y uracilfosforribosiltransferasa, respectivamente (Hope *et al.*, 2004; Ksiezopolska & Gabaldón, 2018).

Durante los últimos años el aumento en la resistencia de los tratamientos disponibles ha llevado a los investigadores a la búsqueda de alternativas terapéuticas.

La ϵ -poli-L-lisina y su propiedad antimicrobiana

Desde el descubrimiento de la ϵ -poli-L-lisina (EPL) por Shima y Sakai en 1984, muchos investigadores han prestado atención a la actividad antimicrobiana que tiene este homopolímero (Yoshida & Nagasawa, 2003).

A finales de 1980, se aprobó dicho homopolímero como conservador de alimentos en Japón, posteriormente se utilizó en países como Estados Unidos y Corea del Sur debido a su seguridad, estabilidad al calor, biodegradabilidad y su amplio espectro antimicrobiano (Tabla 1). Actualmente cuenta con un código GRAS por la FDA (GRAS No 000135) que lo reconoce como seguro para ser utilizado como aditivo alimentario (Hyldgaard *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016).

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de EPL para diferentes microorganismos.

Grupo	Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Hongos filamentosos	<i>Aspergillus niger</i> IFO 4416	250
	<i>Trycophyton mentagrophytes</i> IFO7522	60
	<i>Rhodotorula lactase</i> IFO1423	25
Levaduras	<i>Pichia anomala</i> IFO0146	150
	<i>Candida acutus</i> IFO1912	6
	<i>Bacillus subtilis</i> IAM1069	3
Bacterias Gram positivas	<i>Micrococcus luteus</i> IFO12708	16
	<i>Staphylococcus aureus</i> IFO13276	12
	<i>Escherichia coli</i> IFO13500	50
Bacterias Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3923	3
	<i>Salmonella typhimurium</i>	16

Tomado de Yoshida & Nagasawa, 2003

La ϵ -poli-L-lisina (EPL) es un homopoliaminoácido lineal compuesto por 25 a 35 residuos de L-lisina, caracterizado por su enlace peptídico entre los grupos α -carboxilo y ϵ -amino de la L-lisina, producida como un

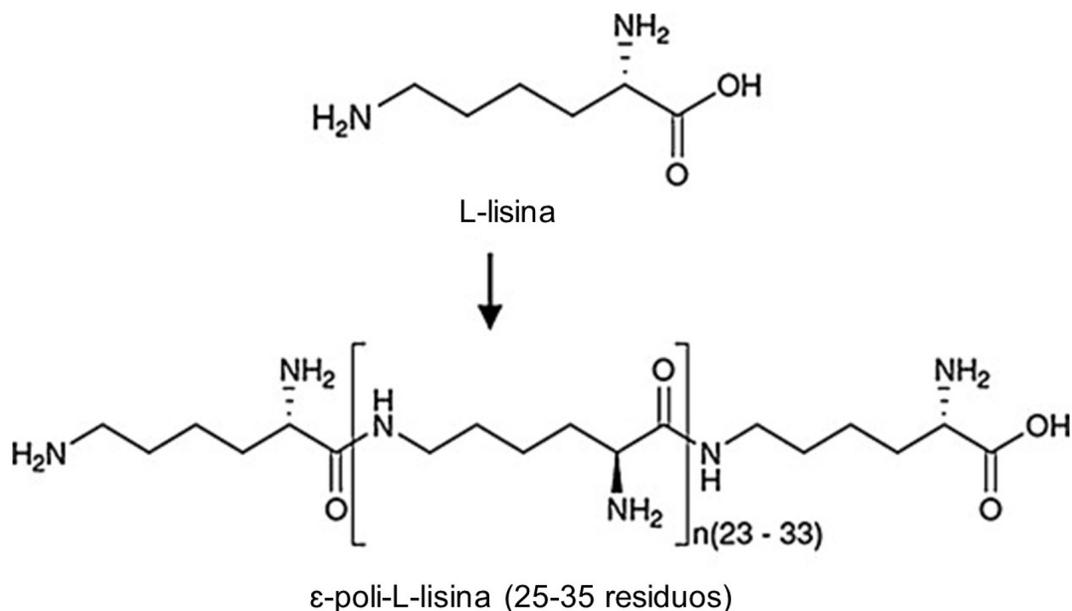


Figura 2. Estructura de la EPL (Pandey & Kumar, 2014)

metabolito secundario por *Streptomyces albulus*, (Figura 2) (Pandey & Kumar, 2014; Rodrigues *et al.*, 2020; Yoshida & Nagasawa, 2003) por la ϵ -poli-L-lisina sintetasa (Pls), una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) anclada a la membrana plasmática; esta proteína de membrana ejerce una actividad catalítica de tipo ligasa de aminoácidos para la formación de enlaces peptídicos y está compuesta por un dominio de adenilación (A), un dominio de tiolación (T), seis dominios transmembrana (TM) rodeados de tres dominios solubles en tándem (C1, C2 y C3) en el carboxilo terminal como se observa en la Figura 3 (Xu *et al.*, 2016).

Por otro lado, se han identificado dos enzimas de degradación de la ϵ -poli-L-lisina: Pld y PldII que son aminopeptidasas que contiene Zn^{2+} , estas enzimas son importantes en la autoprotección de *S. albulus* y otros microorganismos productores de la EPL; ya que en grandes cantidades podría ser tóxica para ellos mismos; se ha reportado que PldII es la más importante en la degradación de la EPL. A pH 7.0 estas enzimas presentan su mayor actividad y a pHs ácidos su actividad disminuye considerablemente; asimismo se ha documentado que se requiere un medio ácido durante la fermentación de la EPL para la acumulación de ATP intracelular (Yamanaka *et al.*, 2010).

La EPL tiene un amplio espectro antimicrobiano, es soluble en agua, biodegradable, con un punto isoeléctrico de 9.0; su efecto antimicrobiano es muy amplio a diferentes pHs, tanto en condiciones ácidas

como alcalinas, así como a diferentes temperaturas; soporta incluso la esterilización en autoclave sin sufrir degradación (lo que la hace muy estable), no es tóxica para el humano, es selectiva y no causa daño a las células mamíferas ni al medio ambiente (Yoshida & Nagasawa, 2003).

En el cuerpo humano, la EPL puede ser degradada en lisina y ser absorbida como un aminoácido esencial por el cuerpo sin ningún efecto secundario ni tóxico. Se ha reportado que la EPL altera transitoriamente la microbiota intestinal en ratones; sin embargo ésta se restablece posteriormente. Del mismo modo, se tienen reportes de que la EPL es segura; fue prácticamente no tóxica en un estudio de citotoxicidad oral aguda en ratas con una administración de hasta 5 g/kg y no hubo efectos adversos en un estudio de alimentación crónica en ratas, también se ha demostrado que no afecta los fibroblastos dérmicos primarios de humanos ni interviene en el proceso de cicatrización en córneas de conejos lesionados (Hiraki *et al.*, 2003; You *et al.*, 2017; Venkatesh *et al.*, 2017).

El mecanismo de inhibición propuesto en bacterias es la adsorción electrostática de la EPL sobre la superficie celular de los microorganismos, con base en su propiedad catiónica, seguido del despojo de la membrana externa, lo cual provoca una distribución anormal del citoplasma y produce daño fisiológico a las células (Shima *et al.*, 1984).

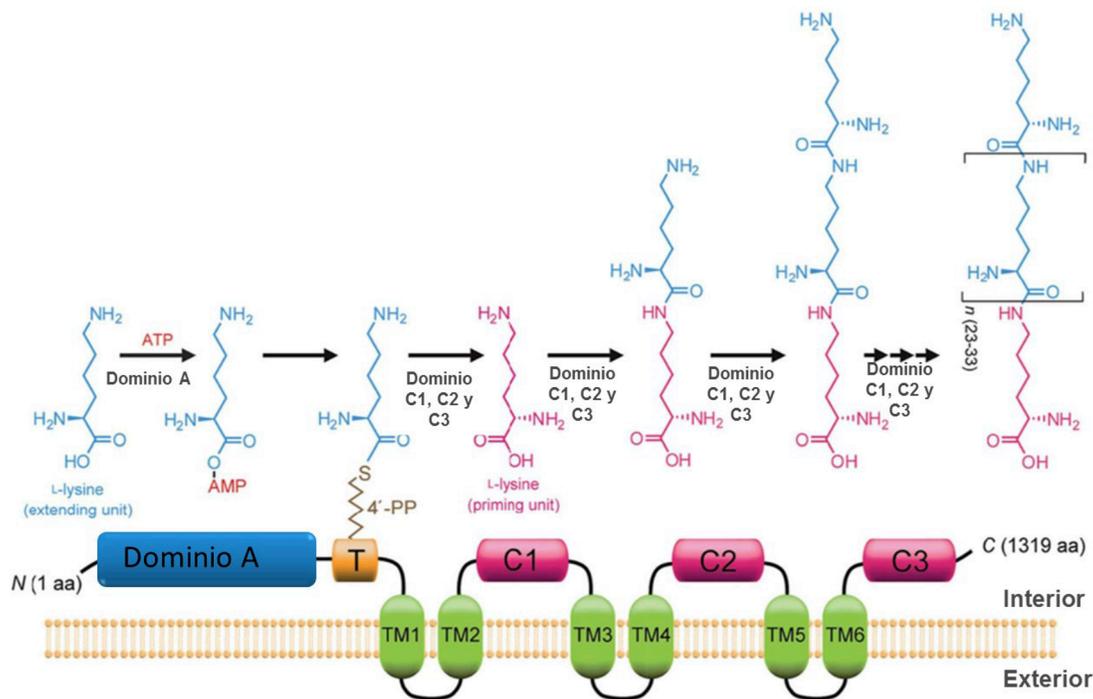


Figura 3. Estructura de la ϵ -poli- L -lisina sintetasa (Pls) de *S. albulus* y biosíntesis del homopolipéptido (Xu *et al.*, 20196).

Hyldgaard *et al.*, (2014) han propuesto que la EPL, al ser de naturaleza catiónica, interactúa con la superficie celular cargada negativamente por adsorción iónica y que posteriormente interfiere con las membranas celulares, provocando daño fisiológico que conduce a la permeabilización de la membrana externa de los microorganismos.

Chang *et al.* (2010) evaluaron la eficacia antimicrobiana de la EPL contra *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Reportaron que la EPL altera la bicapa de la membrana plasmática, conduce a la formación de micelas y a su desintegración generando daños en el citoplasma.

Recientemente Jiao *et al.* (2020) observaron que la EPL inhibió el crecimiento de colonias de *Botrytis cinerea*, así como la gemación de esporas y el alargamiento del tubo germinativo; del mismo modo, fue capaz de inducir la ruptura de la membrana celular y provocando la salida de proteínas, lo que la condujo a su muerte. También observaron que la EPL produce la peroxidación de los lípidos de la membrana.

La EPL también ha mostrado un efecto antimicrobiano debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares que pueden causar

daño oxidativo a las mitocondrias, y la supresión del crecimiento y patogenicidad de hongos que genera daño a la integridad de la membrana celular y a la pared celular de las células fúngicas, ocasionando la salida de moléculas pequeñas, carbohidratos solubles y ácidos nucleicos por lo que se sugiere que provoca la fragmentación del ADN (Li *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2018).

Bo *et al.* (2016) reportó que la EPL provocó cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana en *Saccharomyces cerevisiae*, bajo un microscopio electrónico de transmisión observaron un ligero aumento en la fluidez de la membrana celular y plasmólisis de las células, así como algunos cambios de curvatura de la membrana. También, la EPL indujo estrés osmótico al romper el equilibrio iónico entre el interior y el exterior de la membrana.

Como antecedentes de nuestro laboratorio; se está investigando el impacto que este homopolímero tiene sobre la fisiología de *C. albicans*. Se ha observado que altera la integridad de la membrana, ya que al interactuar de una manera electrostática, se reacomodan sus componentes y generan la formación de poros por donde se liberan las moléculas pequeñas, provocando la salida de K^+ , material que absorbe a 260 y 280 nm, así como fosfato inorgánico; a altas

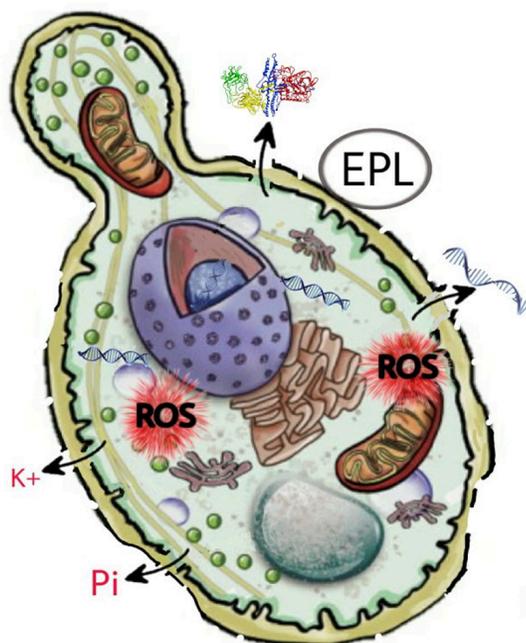


Figura 4. Propuesta sobre el efecto de la EPL en *C. albicans*. La EPL se une de manera electrostática a la levadura generando daños a la membrana y pared celulares, que conllevan a la salida de material citoplasmático, se elimina el potencial de membrana y se acumulan ROS que ocasionan estrés oxidante, comprometiendo la viabilidad de este microorganismo.

concentraciones de EPL se ha visto la inhibición de los procesos metabólicos más importantes: la respiración celular y la fermentación, razón por la cual inhibe el crecimiento de la levadura (Padilla F. J., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, el efecto antimicrobiano que tiene la EPL frente a diferentes microorganismos como bacterias y hongos no se ha esclarecido del todo; sin embargo, podría considerarse que el mecanismo de acción es en realidad la acumulación de los daños a la membrana y pared celulares que la EPL causa al microorganismo generando la alteración morfológica, salida de material citoplasmático, acumulación de ROS y daños en el ADN como se muestra en la Figura 4.

La EPL ha mostrado un efecto antimicrobiano comprobado en diversas investigaciones y ha tenido diferentes aplicaciones, pero se tiene evidencia escasa sobre su mecanismo de acción, en específico para ser utilizado como antifúngico. En un futuro próximo, se podría sugerir para ser utilizada en el tratamiento de algunas candidiasis.

CONCLUSIONES

Esta investigación recopiló la información necesaria sobre *C. albicans* y sus factores de virulencia, así como los mecanismos de acción de los antifúngicos actuales y el efecto antimicrobiano de la EPL; con lo anterior, podemos sugerir que el efecto de la EPL es el conjunto de daños a la membrana y pared celulares, lo que genera alteración morfológica, salida de material citoplasmático, estrés osmótico y acumulación de ROS, causando a su vez peroxidación de lípidos y alteración de los procesos metabólicos, además de daños en el ADN, lo cual lleva a la inhibición del crecimiento del microorganismo. Claramente, falta realizar procedimientos experimentales para corroborar varios de los mecanismos propuestos en esta revisión bibliográfica.

REFERENCIAS

- Alburquenque, C., & Tapia, C. (2013). Interacción *Candida albicans*-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Boletín Micológico*, 28(2), 37–47. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2013.28.2.875>
- Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.007>
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
- Bo, T., Han, P. P., Su, Q. Z., Fu, P., Guo, F. Z., Zheng, Z. X., Tan, Z. L., Zhong, C., & Jia, S. R. (2016). Antimicrobial ϵ -poly-L-lysine induced changes in cell membrane compositions and properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Control*, 61, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.018>
- Bonifaz, A. (2016). *Micología Médica básica*, (5ta.Ed.). McGraw-Hill Educación.
- Calahorra, M., Lozano, C., Sánchez, N. S., & Peña, A. (2011). Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(1), 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.025>
- Castillo, G. D. V., Azcurra, A. I., & Sotomayor, C. E. (2019). Lipasas de especies *Candida*: una revisión sobre aspectos bioquímicos, moleculares y patogénicos. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 76(2), 107. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v76.n2.23822>
- Chang, S. Sen, Lu, W. Y. W., Park, S. H., & Kang, D. H. (2010). Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ϵ -polylysine. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.021>
- Crawford, A., & Wilson, D. (2015). Essential metals at the host-pathogen interface: Nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Research*, 15(7), 71. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov071>
- da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>
- de Groot, P. W. J., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryotic Cell*, 12(4), 470–48. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>
- Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S. R., & Soll, D. R. (2004). Release of a Potent Polymorphonuclear Leukocyte Chemoattractant Is Regulated by White-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 72(2), 667–677. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.667-677.2004>
- Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S. I., Seki, H., Uohama, K., Seki, H., Kimura, S., Yanagimoto, Y., & Barnett, J. W. (2003). Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328–340. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(03)00029-1)
- Hope, W. W., Taberner, L., Denning, D. W., & Anderson, M. J. (2004). Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4377–4386. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4377-4386.2004>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Vad, B. S., Stenvang, M., Otzen, D. E., & Meyer, R. L. (2014). The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7758–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>
- Jiao, W., Liu, X., Chen, Q., Du, Y., Li, Y., Yue, F., Dong, X., & Fu, M. (2020). Epsilon-poly-L-lysine (ϵ -PL) exhibits antifungal activity in vivo and in vitro against *Botrytis cinerea* and mechanism involved. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111270>
- Ksiezopolska, E., & Gabaldón, T. (2018). Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens. *Genes*, 9(9), 461. <https://doi.org/10.3390/genes9090461>

- Lan, C.-Y., Newport, G., Murillo, L. A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R. W., & Agabian, N. (2002). Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14907–14912. <https://doi.org/10.1073/pnas.232566499>
- Li, H., He, C., Li, G., Zhang, Z., Li, B., & Tian, S. (2019). The modes of action of epsilon-polylysine (ϵ -PL) against *Botrytis cinerea* in jujube fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 147, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.009>
- Naglik, J. R., Gaffen, S. L., & Hube, B. (2019). Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.002>
- Padilla, F. J. (2019). Efectos de la ϵ -poli-l-lisina sobre la fisiología de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/marzo/0787278/Index.html>
- Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, 49(3), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.009>
- Paul, S., Kannan, I., & Mohanram, K. (2019). Extensive ERG11 mutations associated with fluconazole-resistant *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients. *Current Medical Mycology*, 5(3), 1–6. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.3.1739>
- Perlin, D. S. (2015). Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases*, 61(Suppl 6), S612–S617. <https://doi.org/10.1093/cid/civ791>
- Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., & Desgarenes, C. P. (2005). Factores de virulencia en *Candida sp*. *Dermatología Revista Mexicana*, 49(1), 12–27.
- Rodrigues, B., Morais, T. P., Zaini, P. A., Campos, C. S., Almeida-Souza, H. O., Dandekar, A. M., Nascimento, R., & Goulart, L. R. (2020). Antimicrobial activity of Epsilon-Poly-L-lysine against phytopathogenic bacteria. *Scientific Reports*, 10(1), 11324. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68262-1>
- Ruiz-Camps, I., & Cuenca-Estrella, M. (2009). Antifúngicos para uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.04.001>
- Satyanarayana, T., & Kunze, G. (2017). Yeast Diversity in Human Welfare. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8>
- Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T., & Sakai, H. (1984). Antimicrobial action of E-poly-L-lysine. *Journal of Antibiotics*, 37(11), 1449–1455. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1449>
- Staniszevska, M., Bondaryk, M., Swoboda-Kopec, E., Siennicka, K., Sygitowicz, G., & Kurzatkowski, W. (2013). *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 813–821. ISSN 1678-4405
- Tan, Z., Bo, T., Guo, F., Cui, J., & Jia, S. (2018). Effects of ϵ -Poly-L-lysine on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its involved antimicrobial mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 2230–2236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.094>
- Venkatesh, M., Barathi, V. A., Goh, E. T. L., Anggara, R., Fazil, M. H. U. T., Ng, A. J. Y., Harini, S., Aung, T. T., Fox, S. J., Liu, S., Yang, L., Barkham, T. M. S., Loh, X. J., Verma, N. K., Beuerman, R. & Lakshminarayanan, R. (2017). Antimicrobial activity and cell selectivity of synthetic and biosynthetic cationic polymers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00469-17>
- Wellington, M., Koselny, K., & Krysan, D. J. (2013). *Candida albicans* morphogenesis is not required for macrophage interleukin 1 β production. *MBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00433-12>
- Xu, Z., Xu, Z., Feng, X., Xu, D., & Liang, J. (2016). Recent advances in the biotechnological production of microbial poly (ϵ - L -lysine) and understanding of its biosynthetic mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6619–6630. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7677-3>
- Yamanaka, K., Kito, N., Imokawa, Y., Maruyama, C., Utagawa, T., & Hamano, Y. (2010). Mechanism of ϵ -poly-L-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5669–5675. <https://doi.org/10.1128/AEM.00853-10>

- Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2003). ϵ -poly-L-lysine: Microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 21-26. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1312-9>
- You, X., Einson, J. E., Lopez-Pena, C. L., Song, M., Xiao, H., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2017). Food-grade cationic antimicrobial ϵ -polylysine transiently alters the gut microbial community and predicted metagenome function in CD-1 mice. *Npj Science of Food*, 1(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0006-0>

Evaluación de la enzima nitrato reductasa en células mononucleares en cabras expuestas a la vacuna BCG

(Evaluate of the enzyme nitrate reductase in goat mononuclear cells exposed to the BCG vaccine)

¹*Martínez- Romero Aurora, ²Ortega-Sánchez José Luis, ¹López-Sánchez Cesar Abel, ³Urtiz-Estrada Norma, ³Cervantes-Flores Maribel, ¹Alba-Romero José de Jesús.

¹Facultad de Ciencias Químicas Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED)

²Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Km. 40, Carretera Gómez Palacio-Chihuahua. Bermejillo, Durango

³Facultad de Ciencias Químicas Unidad Durango, UJED, Durango, México.

*Email correspondencia: auroramtzr@gmail.com

RESUMEN

La tuberculosis (TB) se considera una enfermedad reemergente y los métodos para su diagnóstico tienen baja sensibilidad, debido a que es una bacteria de crecimiento lento. Es causada por especies del género *Mycobacterium* y es un problema muy importante de salud pública. El objetivo fue evaluar la actividad de la enzima nitrato reductasa en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares en cabras expuestas a la administración de la vacuna BCG de *M. bovis*. Exposición de cabras a la vacuna BCG. Método de Ficoll-Hypaque. Prueba de exclusión del colorante azul de tripano. Detección y cuantificación de NO₂⁻ por el método ELISA. En el primer tratamiento (control) la concentración de NO₂⁻ fluctuó entre 7.86 y 19.82 µM/l, en el segundo tratamiento (vacuna BCG de *M. bovis*) fueron entre 13.76 y 84.81 µM/l, observándose mayor respuesta a los tres días de iniciar el tratamiento. En el grupo al cual se le aplicó la vacuna BCG produjo una elevada producción de NO por los macrófagos activados, ya que tienen mecanismo antimicrobiano potente. Por lo que es factible evaluar la actividad de la enzima nitrato reductasa, para determinar de la infección de la tuberculosis latente.

Palabras clave: Tuberculosis | Nitrato reductasa | Vacuna BCG | *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is considered a reemerging disease and the methods for its diagnosis have low sensitivity because it is a slow growing bacterium. It is caused by species of the genus *Mycobacterium* and is a very important problem of public health. The objective was to evaluate the activity of the enzyme nitrate reductase in culture supernatants of goat mononuclear cells exposed to the administration of the *M. bovis* BCG vaccine. Exposure of goats to BCG vaccine. Ficoll-Hypaque method. Proof of exclusion of trypan blue dye. Detection and quantification of NO₂⁻ by the ELISA method. In the first treatment (control) the concentration of NO₂⁻ fluctuated between 7.86 and 19.82 µM/l, in the second treatment (BCG vaccine of *M. bovis*) were between 13.76 and 84.81 µM/l, being observed a greater response to the three days of starting treatment. In the group to which the BCG vaccine was administered, it produced a high NO production by activated macrophages, since they have a potent antimicrobial mechanism. Therefore, it is feasible to evaluate the activity of the enzyme nitrate reductase, to determine latent tuberculosis infection.

Key words: Tuberculosis | Nitrate reductase | BCG Vaccine | *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmisible que se conoce desde la antigüedad, además ha sido considerada la causa más frecuente de decesos (Jurado *et al.*, 2015), es considerada como un problema de salud, económico y social de gran magnitud a nivel mundial (Campanico *et al* 2018). La TB es una enfermedad infecciosa que se encuentra entre las 10 principales causas de muerte en todo el mundo, y la principal causa bacteriana de muerte (Simoes *et al* 2020). En 2019, se estima que 10 millones de personas desarrollaron TB y 1,5 millones de personas murieron como resultado de la enfermedad (Appetecchia *et al* 2020; World Health Organization 2020). El 24 de marzo de 1882 el médico alemán Robert Koch descubrió el agente causal de esta entidad *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), es una enfermedad de las más estudiadas y temidas en la historia de la humanidad, de origen infeccioso, curable, prevenible y en la actualidad una enfermedad reemergente. Según la OMS, estima que un tercio de la población mundial tiene la infección de la TB latente (LTBI), de los cuales el 10% llegara a tener la enfermedad de la TB teniendo la capacidad de infectar de 10 a 15 personas en un año (OMS, 2017). Según las estadísticas a nivel mundial se han reportado 10 millones 400 mil casos nuevos de TB en personas adultas, de los cuales 2 millones 700 mil murieron; sin embargo, existió 1 millón de casos nuevos en niños de los cuales murieron 170 mil (OMS, 2017). La SSA en 2016 reportó en México 64,096 casos nuevos de TB a nivel nacional, de los cuales Durango tiene 841 y Coahuila 1,774 casos (SSA, 2016). La única vacuna contra la TB con licencia, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), es una cepa de *M. bovis* atenuada desarrollada a través de una técnica simple sometiendo a una cepa virulenta de *M. bovis* a un cultivo seriado *in vitro* durante 13 años, que se utiliza desde 1921 como medida preventiva (Dietrich, Mollenkopf *et al.* 2002; Aguilo, Alvarez-Arguedas *et al.* 2015 y Gu, Chen *et al.* 2016). Uno de los indicadores inmunológicos que se están utilizando para realizar el diagnóstico de la LTBI es la producción de óxido nítrico (NO), interferón- γ (IFN- γ) e interleucinas (IL) (Waters, Palmer *et al.* 2002), en esta etapa la enfermedad permanece inactiva. Al respecto, se ha observado que el nivel de NO exhalado aumenta en los pacientes con TB (Liu, Wang *et al.* 2010). Sin embargo, se ha detectado inmuno histoquímicamente un nivel de expresión elevado de NOS2 en macrófagos obtenidos por lavado pulmonar alveolar de individuos con TB

pulmonar (TBP) activa (Harjani, Yap *et al.* 2016). De hecho, la vía inhalatoria de administración del fármaco sirve como la opción principal para los inhaladores de polvo o aerosoles, ya que proporcionan una preferencia acumulación de drogas en el sitio de destino además de ser no invasivo y que supera la degradación de los fármacos gastrointestinales. Por lo tanto, también pueden restringir la exposición al fármaco a las células sanas (Nabi *et al* 2020). El problema con la TB es que cuando la bacteria se activa, se propaga de manera rápida por medio de la saliva, es decir, una persona que está enferma con *M. tuberculosis*, al hablar o toser, despiden aerosoles (gotitas de saliva) con los cuales puede diseminar la enfermedad a otras personas que se encuentran cerca de ella. La elevada producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos activados es un mecanismo antimicrobiano potente. Experimentalmente, los intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI) juegan un papel protector en la infección tuberculosa aguda y crónica persistente. Debido a la facultad que tiene *Mycobacterium* de reducir los nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-) por la acción de la enzima nitrato reductasa, nitrato reductasa, hecho que conlleva a la posibilidad de evaluar la actividad de nitrato reductasa mediante la determinación de NO_2^- a través de sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de cabras posterior a la administración de la vacuna BCG de *M. bovis*. En la práctica clínica la prueba de la nitrato reductasa es útil en la detección temprana de la resistencia del *M. tuberculosis* para el manejo del paciente y el control de la infección, por lo que. el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad de la enzima nitrato reductasa en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en cabras expuestas a la administración de la vacuna BCG de *M. bovis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 12 animales de ganado caprino razas *Sannen*, con edad aproximada de 24 meses, libres de TB, brucelosis y clínicamente sanos (Figura 1). Los animales empleados en el estudio se mantuvieron en corrales aislados del resto del ganado. Se realizó el marcaje y se procedió a pesar cada animal. De los 12 animales asignados para el estudio, 6 cabras fueron control y 6 animales para aplicar la vacuna BCG de *M. bovis*. La toma de muestra se realizó por venopunción en la yugular utilizando tubos Vacutainer® con EDTA de 4 ml. Seis cabras (control) fueron inoculadas con 0.1

ml de solución salina (Pasteur Merieux, Lyon France). Otras seis cabras fueron inmunizadas con la vacuna BCG de *M. bovis* utilizada por la Secretaría de Salud. Se aplicó 0.1 ml de solución, con una jeringa para insulina vía intradérmica. Se tomaron muestras en el momento previo a la inoculación (cero días), y posteriormente a los 3, 7, 14, 21 y 27 días después de inocular a los animales, y se evaluaron los RNI (NO_2^-) en las PBMC en $\mu\text{moles/l}$ (Feng, Bean *et al.* 1999).



Figura 1. Ganado caprino raza Sannen.

Obtención de las células mononucleares a partir de sangre total por el método de Ficoll-Hypaque

La sangre periférica fue colectada en tubos Vacutainer® con EDTA y procesada en un lapso no mayor de cuatro horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la sangre total se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min, se recolectó el plasma y se colocó en un tubo cónico de 15 ml, la capa de células mononucleares o suspensión celular (SC) presente entre el plasma y el paquete globular, posteriormente la SC se resuspendió en RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 27 mM de bicarbonato de sodio llevándolo a 6 ml, después se pasó a otro tubo cónico con 3 ml de

Ficoll-Hypaque de una manera lenta por las paredes del tubo, se volvió a centrifugar a 1,500 rpm durante 15 min (eliminar freno de la centrifuga), se obtuvieron 4 capas, Ficoll, mononucleares, Ficoll, y polimorfonucleares con eritrocitos, respectivamente (Figura 2). Posteriormente, se recuperó el anillo rico en células mononucleares mediante aspiración con una pipeta y se lavó dos veces PBS estéril llevándolo hasta 10 ml para lavar del Ficoll que haya quedado, manteniendo en hielo y centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.

Determinación de la viabilidad de las células utilizando la prueba de exclusión del colorante azul de tripano

Las suspensiones celulares se resuspendieron en RPMI completo con SFB. La viabilidad de las células se determinó utilizando la prueba de exclusión del colorante azul de tripano (Huttunen, Pelkonen *et al.* 2004). Se realizó una dilución con 100 μl de SC: en un tubo eppendorf de adicionaron 90 μl de PBS más 10 μl de SC (1:10), de esta suspensión se tomaron 10 μl y se pasaron a otro tubo eppendorf con 80 μl de PBS más 10 μl de azul de tripano (1:100) e inmediatamente después se mezcló y se tomaron 10 μl para adicionarlos a un hematocitómetro como se muestra en la Figura 3, para contar las células mononucleares en un microscopio con el objetivo seco débil (10X) (Gallily, Aalseth *et al.* 1970). Se leyeron los linfocitos de cuatro cuadrantes (1, 3, 7, 9) y se ajustaron las células a 1.32×10^6 . Las células no viables se tiñen de color azul oscuro, las células viables excluyen el colorante, permaneciendo sin teñir (Berger y Edelson 1976).

Detección y cuantificación de nitritos (NO_2^-) por el método ELISA

La prueba de Griess es una prueba química que detecta la presencia de nitritos orgánicos. La reacción

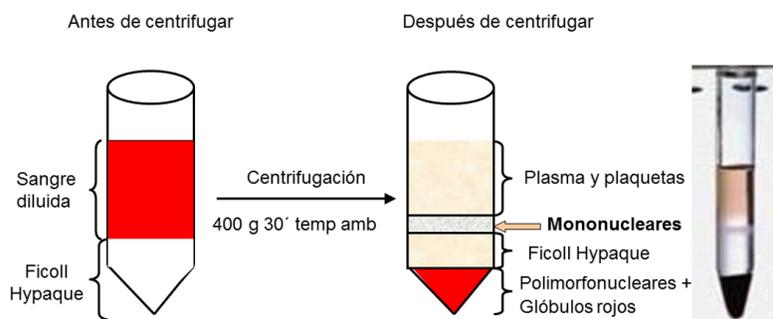


Figura 2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Hypaque.

de diazotación de Griess, en la que se fundamenta el reactivo de Griess, fue descrita por primera vez en 1858 por Peter Griess. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo rosado al tratamiento de una muestra conteniendo NO_2^- con el reactivo de Griess.

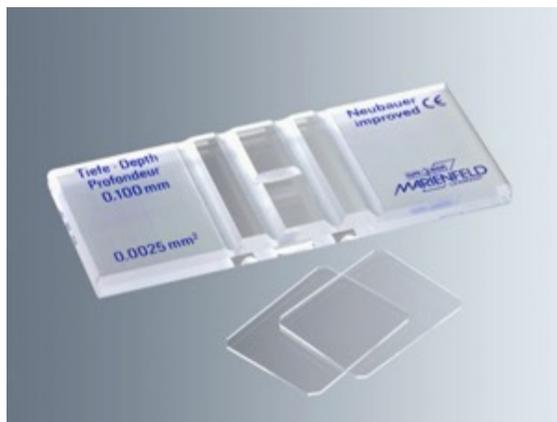


Figura 3. Cámara de Neubauer (Brand) o Hematocitómetro.

Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio. Cuando se agrega la α -naftilamina, se desarrolla un color rosado. El reactivo de Griess comercial típico contiene 0,2% de diclorhidrato de naftiléndiamina, y 2% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%.

Las soluciones stock de nitrito de sodio (NaNO_2^-) (SIGMA®) en 100 mM de agua fueron almacenados a 4°C, la solución de NO_3^- reductasa (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 2.5 U/ml y una mezcla de NADPH (SIGMA®) a 1.67 mg/ml más flavin adenin dinucleótido (FAD) (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 0.05 mg/ml en agua fueron almacenados a -20°C.

El ensayo fue realizado en microplacas de fondo plano de 96 pozos. 100 μl de cultivo de células mononucleares se transfirieron a placas de 96 pozos, adicionando 50 μl a cada una, uno para la medición de NO_2^- . Agua (20 μl por pozo) fue adicionado a la microplaca del NO_2^- y la mezcla enzimática (20 μl por pozo). Todas las microplacas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. El reactivo de Griess (100 μl por pozo) fue adicionado y después de 5 minutos a temperatura ambiente se realizó en todas las microplacas la lectura de las densidades ópticas (OD) a 620 nm (referencia) (Jeevan, McFarland *et al.* 2006), se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Organon Tecknika®, Microwell system) (Figura 4).



Figura 4. Lector de ELISA (Organon Tecknika®, Microwell system)

Las concentraciones de NO_2^- fueron calculadas directamente de la curva patrón del nitrito de sodio (Rhoades y Orme 1997) en solución PBS en un rango de concentraciones de 0 a 100 μM . Los ensayos se realizaron por duplicado obteniéndose la media de éstos.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los valores de concentración obtenidos del control y tratamiento con la vacuna BCG para determinación de NO_2^- de las muestras se les realizó un tratamiento estadístico para variables cuantitativas, se utilizó la prueba T de Student como prueba paramétrica para valorar si hay diferencia significativa a una $p < 0.05$ entre dos grupos de datos, el análisis se realizó con el programa de EXCEL 2010.

RESULTADOS

Se incluyeron 12 animales de ganado caprino, raza sannen, con un promedio en peso de 53.85 kg (Tabla 1), con edad aproximada de 24 meses, libres de TB, brucelosis y clínicamente sanos.

La viabilidad de las células fluctuó entre los rangos de 80 y 85%, en algunos casos se logró obtener una viabilidad hasta de 95%, lo cual nos indicó que el trabajo que se estaba realizando fue de muy buena calidad.

Tabla 1. Promedio en peso de cabras.

No. Animal	Peso (kg)
8	47.62
5	58.96
13	56.69
14	52.16
2	54.43
26	49.89
39	61.23
36	52.16
21	56.69
34	49.89
20	58.96
3	47.62
total	646.3
promedio	53.8583333

Niveles de nitritos (NO₂⁻)

Se obtuvo la densidad óptica de los cultivos de células mononucleares, se preparó una curva patrón de NaNO₂- (Tabla 2) para calcular las concentraciones existentes en cada muestra de NO₂⁻. Para la solución patrón se pesó 0.5 g de NaNO₂ puro, disolver en un litro de agua, libre de nitritos. Diluir 10 ml de esta solución a un litro con agua destilada (1 ml = 0.005 mg de NaNO₂).

Tabla 2. Curva patrón de nitrito de sodio

Solución de nitrito de sodio de 100 µmol/mL	0	0.1	0.2	0.5	1
Agua destilada (libre de nitritos) - destilada	3	2.9	2.9	2.5	2
Prueba de Griess	2	2	2	2	2
µmol nitrito/mL	0	10	20	50	100
DO	0.059	0.117	0.162	0.333	0.576

Mezclar perfectamente y después de 20 min leer en el espectrofotómetro UV visible a λ= 520 nm. Ajustar el cero con el blanco. Trazar una curva graficando

concentración (mg de NaNO₂) contra absorbancia.

100 µmol - 1 mL

x µmol - 0.1 mL x= 10 µmol nitrito/mL

10 µmol - 0.117

x µmol - 0.162 x= 13.8461538 µmol/mL (Control, primer muestreo. Día cero)

El comportamiento de los diferentes tratamientos durante el período de los muestreos, aunque fue variable, se observó un incremento de NO₂⁻ (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de NO₂⁻

Tratamiento	Concentración máxima	Concentración mínima
Solución salina (Control)	7.86324786 µmol/mL	19.8290598 µmol/mL
Vacuna BCG de <i>M. bovis</i> .	12.6495726 µmol/mL	94.5299145 µmol/mL

Con un nivel de significancia del 0,05 (p < 0,05) se obtuvo una diferencia significativa del efecto de variación de las densidades ópticas, así como, de la concentración en µmoles/l de NO₂⁻ durante los periodos de muestreo de los 27 días.

Por resultar significativa la interacción tipo de tratamiento a cabras en los periodos de muestreo, la presentación de resultados solo se sujetará a este factor de variación, debido a que describe de manera más completa el comportamiento biológico del estudio. Con un nivel de significancia de 0,05 (p < 0,05) se obtuvo una diferencia significativa del efecto de variación de DO, así como, de la concentración en µmoles/l de NO₂⁻ durante los periodos de muestreo de los 27 días.

DISCUSIÓN

La capacidad de *M. tuberculosis* de sobrevivir y reproducirse dentro de los macrófagos, incluso en presencia de factores adversos como el NO, esencial para el desarrollo de la infección. La identificación de los mecanismos utilizados por micobacterias para evadir el daño nitrosante es un objetivo importante ya que podría ayudar a desarrollar estrategias para prevenir la TB (Espinoso-Cueto *et al.*, 2015). En una investigación previa, se observaron los rangos de las concentraciones de NO₂⁻ y NO₃⁻ en muestras de plasma en individuos sanos y fueron de 1.3-13 µM/l (media de 4.2 µM/l) y 4.0-45.3 µM/l (media de 19.7 µM/l), respectivamente

(Moshage, Kok *et al.* 1995) y a pesar de que el presente experimento fue realizado en caprinos, como un comparativo manifestamos el valor promedio de niveles de NO₂- de animales control durante el muestreo de 27 días fue 7.86324786 y 19.8290598 μM/l (media 14.54629628 μM/l), en el segundo tratamiento (vacuna BCG de *M. bovis*) entre 12.6495726 y 94.5299145 μM/l (media de 33.09164306 μM/l). Este valor coincide con el rango promedio reportado por otros investigadores en la determinación de RNI que fue 25.1 ± 3.59 μM de NO₂-/NO₃- en cultivos realizados durante 1, 3 y 7 días de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica en pacientes con lepra (Khare, Bhutani *et al.* 1997). Este hecho es evidencia que la inducción del sistema inmune a través de las PBMC se logra con la estimulación de algún microorganismo vivo, muerto o atenuado. Waters, Palmer *et al.* (2003) publicaron que los NO₂- son un producto de oxidación del NO, y la cantidad de NO₂- producido por las células en el cultivo es indicativo de la cantidad de NO producido. Resultados similares fueron obtenidos de un estudio realizado para determinar la acumulación de NO₂- después de cuatro o más días de infección (Rhoades y Orme 1997). En estudios previos realizados se reportó una disminución de los niveles de NO₂-/NO₃- con el tratamiento, la cual estuvo correlacionada con la reducción de la carga bacilar (Rada, Ulrich *et al.* 1997).

Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio al observar que en los animales control también se observó producción de NO₂-/NO₃- durante el tiempo que duró el estudio. Adicionalmente, a esta aseveración existen reportes sobre investigaciones realizadas en cultivos de macrófagos en pacientes con la enfermedad de Hansen demostraron que los macrófagos de pacientes con lepra y TB fueron capaces de producir NO en ausencia de estimulación, los primeros produjeron elevados niveles de NO después de 24 horas de cultivo y posteriormente se observó una disminución gradual al aumentar el tiempo de cultivo, en los control se observaron niveles muy bajos en la liberación de NO₂- (Khare, Bhutani *et al.* 1997).

En otra investigación realizada al respecto, se deduce que el NO inhibe el desarrollo de muchas bacterias y parásitos *in vitro*, debido a la producción de RNI formados por la oxidación del NO (Burgner, Rockett *et al.* 1999). Estudios previos, reportaron elevados niveles de NO₂-/NO₃- 1020 +/- 471 μM (n=22) en muestras de orina de pacientes etíopes sanos y en pacientes con lepra

se observaron las concentraciones de 1079 +/- 446 μM, (n=12) respectivamente, y éstos presentaron reacciones de reversión tipo I (Schon, Gebre *et al.* 1999).

Waters y Palmer (2003) encontraron que la cantidad de NO₂- en los sobrenadantes de cultivo es indicativo de la cantidad de NO producido por las células en el cultivo. Aún no se conoce el blanco de los RNI en las enfermedades por micobacterias y es esencial conocer su función en la destrucción micobacterial (Rhee, Erdjument-Bromage *et al.* 2005).

Con estos estudios, se deduce que la producción de NO está asociada a la naturaleza bioquímica del antígeno, por lo que se plantea realizar este mismo ensayo utilizando ciertos componentes micobacterianos como el glicolípidio fenólico. Sería interesante, en otro trabajo incrementar el número de muestra, con estudios más específicos de expresión y actividad de la enzima iNOS, que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS en combinación con IFN-γ, ya que la enzima iNOS cataliza la conversión de arginina a citrulina liberando NO.

CONCLUSIÓN

La elevada producción de NO por los macrófagos activados es un mecanismo antimicrobiano potente basado en radicales libres. Los RNI juegan un papel protector en la infección aguda y crónica latente de TB. La presente investigación permitió la evaluación de la actividad de la enzima nitrato reductasa determinando NO₂- en sobrenadantes de cultivo de PBMC de cabras expuestas a vacuna BCG de *M. bovis*, midiendo la actividad de los NO₂-, lo cual permite realizar una evaluación precisa del estado de latencia de *Mycobacterium* como elemento primordial de salud pública para controlar la TB. Ante la primoinfección se da lugar a una elevada producción de NO por los macrófagos activados, incluso en los pacientes con TB activa se observa que el nivel de NO exhalado aumenta, así como también la expresión de la enzima nitrato reductasa en macrófagos obtenidos por lavado pulmonar alveolar.

REFERENCIAS

- Aguilo N, Alvarez-Arguedas S, Uranga S, Marinova D, Monzón M, Badiola J, Martin C. 2015. Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism. *J Infect Dis.* 213(5): 831-839. DOI: 10.1093/infdis/jiv503
- Appetecchia F, Consalvi S, Scarpecci C, Biava M, Poce G. 2020. SAR Analysis of Small Molecules Interfering with Energy-Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmaceuticals*, 13(227);1-33. DOI:10.3390/ph13090227
- Berger CL, Edelson RL. 1979. Comparison of Lymphocyte Function after Isolation by Ficoll-Hypaque Flotation or Elutriation. *J Invest Dermatol.* 73: 231-235. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12514286>
- Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D. 1999. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child.* 81(2): 185-8. DOI: 10.1136/ad.81.2.185
- Campaniço A, Moreira R, Lopes F. 2018. Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 525-545. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.020
- Dietrich G, Mollenkopf H-J, Weber H, Knapp B, Diehl K-D, Hess J, Blackkolb F, Bröker M, Kaufmann SHE, Hundt E. 2010. Cultivation of *Mycobacterium bovis* BCG in bioreactors. *J Biotechnol.* 96(3): 259-70. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00046-9.
- Espinoza-Cueto P, Escalera-Zamudio M, Magallanes-Puebla A, López-Marín LM, Segura-Salinas E, Mancilla R. 2015. Mycobacterial glycolipids di-O-acylated trehalose and tri-O-acylated trehalose downregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in macrophages. *BMC Immunol.* 16(38): 1-6. DOI: 10.1186/s12865-015-0102-3
- Feng CG, Demangel C, Kamath AT, Macdonald M, Britton WJ. 1999. Dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin activate CD8 (+) T cells with specificity for a novel mycobacterial epitope. *Int Immunol.* 13(4): 451-8. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.4.451>
- Gallily R, Aalseth B, Garvey J. 1970. A method for increasing the number of pleural macrophages in mice. *Isr J Med Sci.* 6(1): 166-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5472890>
- Gu D, Chen W, Mi Y, Gong X, Luo T, Bao L. 2016. The *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv0577 DNA boost vaccination induces a durable Th1 immune response in mice. *Acta Biochim Biophys Sin.* 48(4): 385-90. DOI: 10.1093/abbs/gmw010
- Harjani JR, Yap BK, Leung EWW, Lucke A, Nicholson SE, Scanlon MJ, Chalmers DK, Thompson PE, Norton RS, Baell JB. 2016. Design, Synthesis, and Characterization of Cyclic Peptidomimetics of the Inducible Nitric Oxide Synthase Binding Epitope That Disrupt the Protein-Protein Interaction Involving SPRY Domain-Containing Suppressor of Cytokine Signaling Box Protein (SPSB) 2 and Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem.* 59(12): 5799-809. DOI: 10.1021/jm500596j
- Huttunen K, Pelkonen J, Nielsen KF, Nuutinen U, Jussila J, Hirvonen MR. 2004. Synergistic interaction in simultaneous exposure to *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum*. *Environ Health Perspect.* 112(6): 659-65. DOI: 10.1289/ehp.6701
- Jeevan A, McFarland CT, Yoshimura T, Skwor T, Cho H, Lasco T, McMurray DN. 2006. Production and characterization of guinea pig recombinant gamma interferon and its effect on macrophage activation. *Infect Immun.* 74(1): 213-24. DOI: 10.1128/IAI.74.1.213-224.2006.
- Jurado LF, Murcia MI, Hidalgo P, Leguizamón JE, González LR. 2015. Diagnóstico genotípico y fenotípico de tuberculosis ósea y miliar en un paciente positivo para HIV en Bogotá, Colombia. *Biomédica.* 35(1): 8-15. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2275>
- Khare S, Bhutani LK, Rao DN. 1997. Release of reactive nitrogen intermediates from the peripheral blood-derived monocytes/macrophages of leprosy patients stimulated in vitro by tuftsin. *Lepr Rev.* 68(1): 16-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121327>

- Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, Wu YC, Chu Y, Chung FT, Kuo CH, Lee KY, Lin SM, Lin HC, Wang CH, Yu CT, Kuo HP. 2010. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136(1): 35-45. DOI: 10.1007/s00432-009-0634-0
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. 1995. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem.* 41(6 Pt 1): 892-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768008>
- Nabi B, Rehman S, Aggarwal S, Baboota S, Ali J. 2020. Nano-based anti-tubercular drug delivery: an emerging paradigm for improved therapeutic intervention. *Drug Deliv and Transl Res*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00786-5>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2017. Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Rada E, Ulrich M, Aranzazu N, Rodriguez V, Centeno M, Gonzalez I, Santaella C, Rodriguez M, Convit J. 1997. A follow-up study of multibacillary Hansen's disease patients treated with multidrug therapy (MDT) or MDT + immunotherapy (IMT). *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 65(3): 320-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9401484>
- Rhee KY, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan CF. 2005. S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(2): 467-72. DOI: 10.1073/pnas.0406133102
- Rhoades ER, Orme IM. 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 65(4): 1189-95. DOI:10.1128/IAI.65.4.1189-1195.1997
- Schon T, Gebre N, Sundqvist T, Habetmariam HS, Engeda T, Britton S. 1999. Increased levels of nitric oxide metabolites in urine from leprosy patients in reversal reaction. *Lepr Rev.* 70(1): 52-5. DOI: 10.5935/0305-7518.19990011
- Simões M.F., Ottoni C.A., Antunes A. 2020. Mycogenic Metal Nanoparticles for the Treatment of Mycobacterioses. *Antibiotics*, 9(569):1-21. DOI:10.3390/antibiotics9090569
- SSA (Secretaria de Salud). 2016. Notificación Semanal Casos Nuevos de Enfermedades. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/181565/12_Reporte_Diciembre_de_2016
- Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Carlson MP, Nonnecke BJ. 2003. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(5): 960-6. DOI: 10.1128/cdli.10.5.960-966.2003
- Waters WR, Palmer MV, Sacco RE, Whipple DL. 2002. Nitric oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis.* 38(2): 338-43. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.2.338>
- World Health Organization (2020). Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>



Facultad de Ciencias Químicas

Gómez Palacio

REGLAMENTO

Artículo 5. El usuario tiene las siguientes obligaciones:

1. Trabajar en las áreas de los laboratorios bajo la supervisión de un catedrático o instructor.
2. Permanecer en las áreas de Laboratorios con bata blanca, limpia, abotonada, de manga larga y **de largo tres cuartos**.
3. Guardar la disciplina correspondiente dentro de las áreas de los laboratorios (No correr, jugar y/o gritar dentro de las áreas o pasillos). **De igual manera no colocar mochilas ni objetos personales en las mesas de trabajo, por el contrario deberán hacer uso de los estantes destinados para ello.**
4. No introducir ni consumir alimentos dentro de las áreas.
5. No masticar chicle, escupir, fumar, evitar el uso del celular dentro del laboratorio
6. No aplicarse cosméticos en el laboratorio, **ni peinarse**.
7. No entrar con cachucha, pantalones cortos, uñas largas y lo respectivo contemplado en el Reglamento Interno de la Facultad, **No debe ingresarse con sandalias ni calzado descubierto.**
8. Traer el pelo recogido para evitar accidentes.
9. Uso de gafas de seguridad para maestros y alumnos
10. Asegurarse de solicitar acertada y detalladamente el material y reactivos requeridos para la práctica. **Dicho material debe revisarse al ser recibido por el alumno y de igual manera entregarlo en las condiciones que se recibe.**

ADMINISTRACIÓN 2018-2024



Facultad de Ciencias Químicas

Gómez Palacio

MISIÓN

Formar personas competentes en el área de Ciencias Químicas, con sentido humano, científico y social que propicien el bienestar regional, estatal y nacional.

VISIÓN

Ser una Facultad adaptable a las circunstancias nacionales y globales ofreciendo programas educativos de calidad, con personal docente y administrativo competente a través de la actualización dinámica en un ambiente armónico.

VALORES

Compromiso

Democracia

Justicia

Dignidad

Libertad

Prudencia

Gratitud

Respeto

Servicio

Honestidad

Sensibilidad

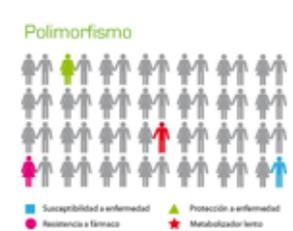
Humildad

Igualdad

Tolerancia



Cuerpo académico UJE-CA-108 Fisiopatología en Salud Ambiental
LGAC: Bases Moleculares y Bioquímicas de la Salud Ambiental

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Nitrosaminas y óxido nítrico como derivados del metabolismo de los nitratos, su papel en la respuesta a la hipoxia mediada por HIF y su implicación en la carcinogenesis.	<p align="center">Polimorfismo</p>  	
Variabilidad genética y caracterización bioquímica de las metaloproteinasas y la toxina		
Citotoxicidad del nitrato y nitrito en distintas líneas celulares y su posible mecanismo de acción		
<p>Alteración en la síntesis de hormonas tiroideas mediada por los factores de transcripción FOXE1 y PAX8 durante la intoxicación crónica por nitratos</p> <p>Estudios de biomarcadores obesogénicos y angiogénicos (leptina, IGF-1 y VEGF) y su relación con la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de mama.</p>		
Biomarcador de insuficiencia renal		
Anemia asociada a factores ambientales en el estudiante Universitario	<p align="center">Esperanza Yasmín Calleros Rincón</p>	
Alteraciones de la glándula tiroideas y determinación de oncogenes por consumo de agua contaminada por nitratos		
Interacciones medicamentosas más comunes en diferentes áreas de un hospital de alta especialidad en la Ciudad de México		
Evaluación del daño oxidativo al ADN en niños con exposición prenatal al arsénico, flúor y compuestos organoclorados	<p align="center">Edgar Héctor Olivas Calderón</p> 	
Evaluación de la función renal e hipertensión arterial en población expuesta a cadmio		
Detección de anticuerpos IgG e IgM contra Toxoplasma gondii en primigestantes y sus neonatos en el Hospital General de Gómez Palacio, Dgo.		

CIENCIAS BIOMÉDICAS

(Salud, Epidemiología, Nutrición)



*“Estudia el pasado si quieres pronosticar el futuro”
Confucio (551-479 a. C.); filósofo chino.*

Masa muscular y masa grasa en deportistas con dieta hipocalórica e hiperproteica de un gimnasio de la comarca lagunera.

¹García-Muñiz Juan José, ¹Hernández-Salinas Ileana Patricia, ¹Martínez-Sandoval Alondra, ¹Soraya-Amali Zavaleta Muñiz.

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio Durango. CP. 35050.

*Email correspondencia: zams2109@yahoo.com.mx

RESUMEN.

Introducción: Una distribución de hasta el 35% de requerimiento calórico total proveniente de las proteínas ayuda a preservar la masa libre de grasa. Sujetos con sobrepeso que buscan reducir su peso usualmente recurren a las dietas de reducción y a la actividad física. Las dietas hiperproteicas han demostrado tener beneficios en atletas jóvenes para mantener la masa muscular y las hipocalóricas son ampliamente utilizadas para disminuir la masa grasa. **Objetivo:** Evaluar la masa muscular y la masa grasa en sujetos universitarios con una dieta hipocalórica e hiperproteica que acuden a un gimnasio. **Material y métodos:** Se incluyeron a todos los sujetos que acudían al gimnasio, que se encontraran en control nutricional y llevaran una dieta hipocalórica e hiperproteica y una rutina de actividad física aeróbica y de resistencia. Se consideraron 2 evaluaciones de 6 semanas de diferencia entre ellas. Se midió peso, índice de masa corporal, porcentaje y kilogramos de grasa y masa muscular por medio de 3 métodos: Bioimpedancia, cinta métrica y plicometría. Se evaluó el cambio en los parámetros. **Resultados:** El peso de los sujetos disminuyó en promedio 2.7 kg, el porcentaje y kilogramos de masa grasa disminuyeron mientras que los de masa muscular aumentaron con diferencias estadísticamente significativas entre las dos evaluaciones. **Conclusiones:** Los sujetos mostraron un aumento significativo de la masa muscular y pérdida de la masa grasa. Se necesitan estudios longitudinales para establecer el impacto de este tipo de dieta en los parámetros de masa grasa y muscular.

Palabras clave: Hipocalórica, hiperproteica, masa grasa, masa muscular, deportistas.

ABSTRACT

Introduction: a distribution of up to 35% of the total caloric requirement from proteins helps to preserve the fat-free mass. Overweight subjects seeking to reduce their weight usually resort to reduction diets and physical activity. High protein diets have been shown to have benefits in young people to maintain muscle mass and low-calorie diets are widely used to reduce fat mass. **Objective:** to evaluate muscle mass and fat mass in university subjects with a hypocaloric and hyperproteic diet who attend a gym. **Material and methods:** All subjects who attended the gymnasium, which were in nutritional control and had a hypocaloric and hyperproteic diet and a routine of aerobic and resistance physical activity were included. Two evaluations 6 weeks apart were considered. Weight, body mass index, percentage and kilograms of fat and muscle mass were measured by means of 3 methods: Bioimpedance, tape measure and plicometry. The change in parameters was evaluated. **Results:** the weight of the students decreased on average 2.7 kg, the percentage and kilograms of fat mass decreased while those of muscle mass increased with statistically significant differences between the two evaluations. **Conclusions:** The subjects showed a significant increase in muscle mass and loss of fat mass. Longitudinal studies are needed to establish the impact of this type of diet on fat and muscle mass parameters.

Key words: Hypocaloric, hyperproteic, fat mass, muscle mass and athletes.

INTRODUCCIÓN.

El consumo de una dieta adecuada en proteínas es determinante para el mantenimiento de un estado óptimo de salud, crecimiento, desarrollo y funcionamiento a lo largo de la vida (Jäger *et al.*, 2017). La Organización Mundial de la Salud recomienda un consumo diario de proteínas similar a las recomendaciones internacionales (0.83 g/kg/d) (WHO, 2007). Una ingesta de una dieta alta en proteínas contribuye al aumento de la fuerza y masa muscular cuando se combina con ejercicios de resistencia (Stokes, Hector, Morton, McGlory, & Phillips, 2018).

Las recomendaciones generales de proteína en la distribución de macronutrientes están entre 10-15% del requerimiento calórico total (RCT). Se ha encontrado que una distribución de hasta el 35% de RCT proveniente de las proteínas ayuda a preservar la masa libre de grasa (MLG) (Carbajal, 2013; Mettler, Mitchell, & Tipton, 2010).

Con la actividad física aumentan los requerimientos de proteínas para mantener la masa muscular esquelética por lo que, actualmente se recomienda para las personas físicamente activas consumir proteínas de 1.2 a 1.7 gramos por kg de peso por día (Rodríguez, Nancy & Dimarco, Nancy & Langley, 2009). De acuerdo a lo publicado por Tarnopolsky y colaboradores, los atletas de resistencia de intensidad moderada requieren aumentos pequeños de alrededor de 1.1 gramos de proteínas por kilogramo de peso por día, que equivale al 25% de aumento del recomendado para la población general y el requerimiento máximo no debe exceder de 1.6 g/kg/d. Para el desarrollo y mantenimiento de la masa muscular a través de un balance proteico positivo, una ingesta total diaria de 1.4 – 2 g de proteína por kilogramos de peso, es suficiente para los individuos que realizan actividad física (Tarnopolsky, 2004). Valores que se encuentran dentro del rango de distribución aceptable de macronutrientes, publicado por el Instituto de Medicina de Estados Unidos. Es posible que se necesiten ingestas más altas de proteínas (2.3- 3.1 g/Kg día) para maximizar la retención de masa corporal magra en sujetos entrenados en resistencia durante períodos hipocalóricos. Existe evidencia novedosa que sugiere que una ingesta de proteínas más alta (> 3.0 g/kg día) puede tener efectos positivos en la composición corporal en individuos entrenados en resistencia (es decir, promover la pérdida de masa grasa). Las recomendaciones generales son 0,25 g de una proteína

de alta calidad por kg de peso corporal o una dosis absoluta de 20-40 g (Jäger *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Calbet y colaboradores reportan que una dieta alta en proteínas puede ayudar a preservar la MLG, así como a mejorar la oxidación de grasa. Durante un déficit calórico el ejercicio de resistencia con un volumen e intensidad adecuados, puede ayudar a evitar perder masa muscular y mejorar la oxidación de las grasas. Incluso poco tiempo de actividad física al día como una caminata, por ejemplo, puede atenuar la pérdida de músculo alrededor del 30%. Sesiones más largas de entrenamiento podrían mejorar el mantenimiento de la MLG y esto a su vez estaría restringido directamente a los músculos ejercitados (Calbet *et al.*, 2017).

Las personas con un sobrepeso mayor tienden a reducir de manera más significativa su peso que una persona con un menor sobrepeso o que esté en normo peso, esto debido a que, mientras más cerca esté del peso ideal, el gasto energético en reposo disminuye. Mientras se pierde peso se busca el preservar la mayor cantidad de MLG posible para no afectar el rendimiento del sujeto e incluso esta mejore. Una dieta baja en carbohidratos en combinación con ejercicio de resistencia ayuda a reducir más rápido el peso corporal total y la masa grasa comparado con una dieta normal en personas obesas, además de mantener la MLG (Jabekk, Moe, Tomten, & Høstmark, 2010).

Una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos combinados con ejercicio mejoran la composición corporal y ayudaría a aumentar el metabolismo de las grasas en comparación con una dieta normoproteica o baja en proteínas (Layman *et al.*, 2005; Volek *et al.*, 2009).

Los suplementos son una herramienta muy útil para aumentar la ingesta total de proteínas y ayudar al mantenimiento de la MLG e incluso aumentarla mientras se reduce la grasa corporal. La ingesta de suplementación de proteínas mientras se realiza ejercicio ayuda a preservar la masa libre de grasa en personas sanas sin necesidad de ser atletas o una persona con actividad física regular (Volek *et al.*, 2013).

Rahbek estudio jóvenes físicamente activos con suplementación de proteínas (hidrolizado de proteína de suero) y carbohidratos demostrando que independientemente de la actividad, se produjo un incremento significativo mayor de hipertrofia, señal

anabólica y síntesis de proteína muscular. Snijders demostró un aumento de fuerza y masa muscular en deportistas de resistencia al incluir un suplemento de proteínas ingerido antes de dormir, sin diferencias estadísticamente significativas al comparar con un grupo control. Wardenaar demostró que los atletas de fuerza eran aquellos atletas bien entrenados que consumían mayor cantidad de proteínas (Rahbek *et al.*, 2014; Snijders *et al.*, 2015; Wardenaar, 2017)

Hay evidencias que muestran que el consumo de proteína (20-25gr) después de realizar actividad de resistencia estimula en mayor medida la síntesis de proteínas evitando la degradación de éstas y aumentando la retención de proteínas en el músculo promoviendo una mejora en las adaptaciones musculares inducidas por el ejercicio (Phillips & van Loon, 2011).

Hay una controversia acerca del momento más óptimo para la ingestión de proteínas para aumentar la síntesis de proteínas y de esta manera mantener o aumentar la musculatura general. Se ha encontrado que el consumo de proteína inmediatamente después de entrenar mejora la síntesis de proteínas aumentando la hipertrofia muscular en comparación con consumirla dos horas después de la actividad física (Esmarck *et al.*, 2001).

No obstante, existen evidencias que sugieren lo contrario, Tipton y colaboradores determinaron que la ingestión de proteína previa al ejercicio, mejora el balance de proteínas en el músculo más que cuando se consume luego del ejercicio (Tipton *et al.*, 2007).

En México se carece de información respecto a los cambios en los parámetros de composición corporal como la masa muscular, y grasa corporal en sujetos deportistas con prescripción profesional de una dieta hipocalórica e hiperproteica.

Objetivo

Evaluar la masa grasa y la masa muscular en sujetos universitarios con una dieta hipocalórica e hiperproteica adscritos al gimnasio de una Universidad privada de la comarca Lagunera.

Material y métodos

Se desarrolló un estudio transversal analítico en sujetos que acudían al gimnasio y se encontraban en control en el área de nutrición de una Universidad privada del

municipio de Gómez Palacio, Durango.

Los deportistas fueron elegidos por muestreo no probabilístico a conveniencia, con los siguientes criterios de inclusión: hombres o mujeres con edades entre 18 y 30 años, con antecedente de realizar ejercicio físico de resistencia por lo menos 3 días por semana, por al menos un mes de antigüedad, con un índice de masa corporal que no superara los 29.9 puntos, que tuvieran apoyo nutricional de un experto, con prescripción de una dieta hipocalórica hiperproteica, en estado aparentemente saludable y que aceptaran participar en el estudio. Se excluyeron aquellos que tuvieran alguna patología (asma, diabetes tipo 1 o 2, hipertensión arterial sistémica, cáncer, VIH/SIDA, hipertiroidismo, hipotiroidismo, etc.), que fueran de reciente ingreso en el gimnasio (menor a 3 meses) y que no tuvieran apoyo nutricional con la prescripción de la dieta indicada. Se eliminaron del análisis a todos los sujetos que no contaban con las mediciones requeridas para el objetivo de este estudio.

Se revisaron los expedientes de nutrición y los datos de la rutina de ejercicio físico de todos los sujetos que se incluyeron en el estudio.

Del expediente clínico de nutrición se tomaron en cuenta dos mediciones, la inicial y una subsecuente con espacio de 6 semanas entre ellas.

Los datos obtenidos fueron: variables generales de identificación (edad, sexo), variables antropométricas (peso total, índice de masa corporal -IMC-, peso y porcentaje de masa muscular libre de grasa, peso y porcentaje de grasa corporal) mediadas a través de 3 métodos de evaluación: bioimpedancia eléctrica con una báscula marca OMRON de 7 indicadores, modelo HBF-514C, por cinta métrica marca Lupkin y por plicometría (con 8 parámetros principales -pliegue tricipital, bicipital, subescapular, suprailíaco, pectoral, abdominal, muslo y pantorrilla, se determinó el peso óseo por método de Rocha) y variables de la rutina de ejercicio (tipo, duración).

El IMC fue calculado empleando la fórmula de Quetelet: $IMC (kg/m^2) = \text{Peso en kg} / \text{Talla}^2 \text{ en metros}$.

Los porcentajes de grasa se clasificaron de acuerdo McCarthy y col., en International Journal of Obesity, (2006) y Gallagher y col., American Journal of Nutrition (2000) y la clasificación de 4 niveles de Omron Healthcare

(Gallagher *et al.*, 2000; McCarthy *et al.*, 2006). Donde en mujeres de 18 a 39 años de edad el porcentaje de grasa <21% es bajo (-), 21 a 32.9% es normal (0), 33 a 38.9% es alto (+) y $\geq 39\%$ muy alto (++) . En hombres de la misma edad el porcentaje de grasa <8% es bajo (-), 8 a 19.9% es normal (0), 20 a 24.9% es alto (+) y $\geq 25\%$ muy alto (++) .

La rutina de ejercicio utilizada en los sujetos estaba dividida en dos fases, una cardiovascular y la otra de entrenamiento de musculatura, cada una de ellas realizada 3 veces por semana de manera alternada, completando 6 días de entrenamiento y 1 de descanso. La fase cardiovascular tenía una duración de 40 minutos con ejercicio continuo en una máquina elíptica, cuidando mantener una frecuencia cardíaca entre 60 y 70% de la frecuencia cardíaca máxima para cada individuo.

La fase de entrenamiento de musculatura consistió en 3 bloques: cinco a siete ejercicios diferentes por bloque y de 3 a 5 series de cada uno. El primer bloque dedicado a espalda y bíceps, el segundo a pectorales, hombros y tríceps, el tercero a pierna.

Las repeticiones (REPS) disminuyeron conforme el peso fue subiendo. Es decir, a los individuos se les indicó realizar diez repeticiones con una carga (peso) que les implicara un esfuerzo tan considerable que quedaran a dos repeticiones del fallo muscular, posteriormente un descanso de dos a tres minutos, y subir 5% del peso; en la siguiente serie realizaban ocho repeticiones con la misma metodología, posteriormente seis repeticiones con un 5% más de peso y luego regresar: la cuarta serie disminuir el peso un 5% y hacer 8 REPS y la quinta y última serie (última) realizar 10 REPS nuevamente con el peso inicial.

Se midió el cambio en los parámetros de masa grasa y masa muscular medidos por los 3 métodos entre la evaluación inicial y la final.

Consideraciones éticas: a todos los sujetos se les informó acerca de los objetivos y procedimientos del estudio, se les explicó que los datos serían manejados de manera grupal y solo con fines de estadística e investigación.

Análisis estadístico: Se realizó un análisis descriptivo de los datos generales de los sujetos utilizando medidas de tendencia central y dispersión en el caso de variables cuantitativas y frecuencias y porcentajes para las cualitativas. Para el análisis de asociación de variables se utilizó la prueba de t de Student, tomando

como significancia estadística una $p \leq 0.05$. Se utilizó el programa SPSS versión 22.

RESULTADOS.

De un total de 32 sujetos entre hombres y mujeres que asistían al gimnasio, solo 25 cumplieron los criterios de inclusión. La edad promedio era de 22.6 ± 2.12 años y el 68% eran del sexo masculino.

Todos los sujetos incluidos practicaban ejercicio de tipo anaeróbico ajustado de acuerdo a las necesidades de cada individuo por un tiempo de 45 minutos y ejercicio de tipo cardiovascular de 15 a 30 minutos diarios durante al menos las 6 semanas anteriores al inicio del estudio.

Se obtuvieron los datos de la primera visita al departamento de nutrición del gimnasio de la universidad, los datos de la evaluación final se recolectaron después de que los sujetos cumplieron con las recomendaciones dietéticas (dieta hipocalórica hiperproteica) y con la rutina de ejercicio físico durante 6 semanas, posteriormente fueron analizados y comparados para valorar el cambio en los parámetros con la dieta y el ejercicio. La diferencia de los datos obtenidos entre las dos evaluaciones se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación del peso y el índice de masa corporal de los sujetos.

Característica	Evaluación inicial	Evaluación final	Diferencia entre evaluaciones	p
Peso, media \pm DE	78.86 \pm 10.40	76.11 \pm 9.90	2.75 \pm 1.76	≤ 0.001
IMC, media \pm DE	26.72 \pm 2.01	25.79 \pm 1.83	0.93 \pm 0.56	≤ 0.001
Sobrepeso, n (%)	20 (80)	18 (72)	2 (8)	≤ 0.001
Normal, n (%)	5 (20)	7 (28)		

DE: desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal

En la primera evaluación se encontró que las mujeres tenían de acuerdo al porcentaje de grasa, un estado normal o saludable al medirlas con los 3 métodos (26.94%, 29.24% y 31.02% por bioimpedancia, cinta métrica y plicometría respectivamente), comparado con los hombres quienes presentaron un porcentaje muy elevado por bioimpedancia y elevado por cinta métrica y plicometría (28.26%, 29.24% y 26.94 por bioimpedancia, cinta métrica y plicometría respectivamente).

En la segunda evaluación se observó una disminución en los porcentajes de grasa, las mujeres permanecieron en estado saludable y los hombres con porcentajes clasificados como elevados por los 3 métodos.

Tabla 2. Comparación de los parámetros de la composición corporal por sexo en las dos evaluaciones nutricionales.

Característica	Evaluación inicial			Evaluación final		
	Femenino	Masculino	p	Femenino	Masculino	p
	n=8	n=17		n=8	n=17	
Peso	70.48 ± 9.98	82.81 ± 8.19	0.003	67.61 ± 9.17	80.11 ± 7.55	0.001
IMC	25.86 ± 2.81	27.13 ± 1.42	0.260	24.79 ± 2.24	26.26 ± 1.45	0.060
Bioimpedancia						
% de grasa	31.02 ± 8.94	26.41 ± 4.62	0.088	28.26 ± 7.55	23.99 ± 4.10	0.078
Kg de grasa	22.11 ± 8.03	21.91 ± 4.77	0.939	19.08 ± 5.95	19.22 ± 3.81	0.945
% de músculo	31.09 ± 7.92	34.07 ± 5.04	0.263	31.56 ± 7.34	35.32 ± 4.96	0.143
Kg de músculo	21.63 ± 5.65	28.42 ± 5.51	0.009	21.20 ± 5.49	28.50 ± 5.27	0.004
Cinta métrica						
% de grasa	29.24 ± 8.58	24.59 ± 5.32	0.108	26.12 ± 7.09	22.36 ± 5.04	0.141
Kg de grasa	20.90 ± 8.14	20.38 ± 5.05	0.847	17.75 ± 5.97	17.93 ± 4.46	0.935
% de músculo	34.80 ± 8.89	38.64 ± 5.76	0.206	37.33 ± 7.67	40.77 ± 6.16	0.241
Kg de músculo	24.30 ± 6.82	32.26 ± 6.68	0.011	25.17 ± 6.18	32.89 ± 6.54	0.010
Plicometría						
% de grasa	26.94 ± 7.62	23.78 ± 4.19	0.191	24.80 ± 7.00	21.87 ± 3.65	0.180
Kg de grasa	19.17 ± 7.13	19.74 ± 4.28	0.807	16.84 ± 5.84	17.55 ± 3.55	0.708
% de músculo	35.42 ± 8.89	39.36 ± 6.34	0.216	37.77 ± 7.43	41.19 ± 6.70	0.262
Kg de músculo	24.70 ± 6.64	32.85 ± 7.14	0.012	25.41 ± 5.80	33.22 ± 6.98	0.012

%; porcentaje; Kg: kilogramo. Se utilizó prueba t de Student para la comparación.

Tabla 3. Comparación y diferencia de los parámetros antropométricos entre la medición inicial y a las 6 semanas por 3 técnicas diferentes.

Característica	Evaluación	Evaluación	Diferencia	p
	inicial	final		
	Media ± DE	Media ± DE		
Bioimpedancia				
% de grasa	27.94 ± 6.54	25.36 ± 5.65	2.58 ± 1.58	≤0.001
Kg de grasa	21.97 ± 5.83	19.17 ± 4.47	2.8 ± 1.82	≤0.001
% de músculo	33.12 ± 6.10	34.12 ± 5.94	-1.00 ± 1.20	≤0.001
Kg de músculo	26.25 ± 6.32	26.17 ± 6.28	0.08 ± 1.82	0.605
Cinta métrica				
% de grasa	26.08 ± 6.73	23.56 ± 5.09	2.51 ± 1.96	≤0.001
Kg de grasa	20.55 ± 6.03	17.87 ± 4.86	2.67 ± 2.00	≤0.001
% de músculo	37.41 ± 6.97	39.67 ± 6.72	-2.25 ± 1.84	≤0.001
Kg de músculo	29.72 ± 7.59	30.42 ± 7.29	-0.70 ± 1.11	0.004
Plicometría				
% de grasa	24.79 ± 5.56	22.81 ± 5.01	1.98 ± 1.10	≤0.001
Kg de grasa	19.56 ± 5.21	17.32 ± 4.29	2.23 ± 1.26	≤0.001
% de músculo	38.10 ± 7.31	40.10 ± 6.98	-2.00 ± 1.30	≤0.001
Kg de músculo	30.24 ± 7.87	30.72 ± 7.49	-0.47 ± 0.89	0.013

DE: desviación estándar, %: porcentaje; Kg: kilogramo. Se utilizó la prueba t de Student para la comparación.

Tabla 4. Fiabilidad entre las técnicas utilizadas bioimpedancia, cinta métrica y plicometría.

	ICC _C	ICC _A	p	ICC _C	ICC _A	p
	Bioimpedancia vs Cinta métrica			Bioimpedancia vs plicometría		
% Grasa	0.965	0.932	≤0.001	0.952	0.908	≤0.001
Kg de grasa	0.973	0.947	≤0.001	0.934	0.876	≤0.001
% Músculo	0.954	0.911	≤0.001	0.953	0.910	≤0.001
Kg de músculo	0.968	0.938	≤0.001	0.933	0.875	≤0.001
	Cinta métrica vs Plicometría			Tres métodos		
% Grasa	0.909	0.833	≤0.001	0.958	0.938	≤0.001
Kg de grasa	0.925	0.861	≤0.001	0.967	0.953	≤0.001
% Músculo	0.949	0.903	≤0.001	0.963	0.913	≤0.001
Kg de músculo	0.969	0.940	≤0.001	0.975	0.947	≤0.001

Se utilizó el Coeficiente de Correlación Intraclase para el análisis de la consistencia (ICC_C) y el acuerdo absoluto (ICC_A).

Al comparar los porcentajes y kilogramos de masa grasa y masa muscular entre hombres y mujeres solo se encontraron diferencias estadísticas en los kilogramos de músculo ($p=0.009$ vs 0.004 , 0.011 vs 0.010 y 0.012 vs 0.012 , en la evaluación inicial vs la evaluación final por bioimpedancia, cinta métrica y plicometría respectivamente) siendo mayor en los hombres al medirlos por los 3 métodos y en las dos evaluaciones. Ver tabla 2.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la comparación con los diferentes métodos antropométricos. Se pueden observar diferencias significativas entre la evaluación inicial y la final. El peso total, el porcentaje y los kilogramos de grasa disminuyeron, mientras que el porcentaje muscular y los kilogramos de músculo aumentaron con diferencia estadísticamente significativa al ser medidos por los 3 métodos, sin embargo, los kilogramos de músculo no mostraron diferencias cuando se midieron por bioimpedancia.

Posteriormente se realizó un análisis de comparación por sexo con los datos de la evaluación inicial encontrando diferencias significativas en los kilogramos de músculo medidos con cinta métrica y plicometría ($p=0.011$ y 0.012 respectivamente), siendo mayor en hombres que en mujeres. En la comparación de los parámetros obtenidos en la segunda evaluación se encontró diferencia en los kilogramos de músculo medidos por bioimpedancia, cinta métrica y plicometría ($p=0.004$, 0.010 y 0.012 respectivamente) siendo los valores más elevados también en el grupo de hombres. Cuando

se realizó la comparación entre la evaluación inicial y la evaluación subsecuente de acuerdo al sexo no se encontraron diferencias significativas.

El cambio en los parámetros medidos de la dieta y la actividad física de resistencia fue positivo para todos los sujetos medidos independientemente del sexo y del método de evaluación utilizado. El porcentaje de masa muscular mostró un aumento significativo y el porcentaje y los kilogramos de grasa una disminución en la segunda evaluación.

Cuando se observó que existían diferencias entre los datos antropométricos obtenidos por los 3 diferentes métodos se decidió calcular la fiabilidad o concordancia entre los métodos mediante el índice de correlación intraclase (ICC) y se encontró que los 3 tienen un "Muy Buen índice de concordancia", de acuerdo a las categorías propuestas por Fleiss (1986) y un "grado de acuerdo Casi Perfecto" de acuerdo a la clasificación de Landis y Koch, (Fleiss, 2011; Landis & Koch, 1977) con alfa de Cronbach mayor de 0.95 en la mayor parte de los casos (ver tabla 4).

DISCUSIÓN.

El 80% de los participantes tenían sobrepeso, 27.94% de grasa y 37.41% de músculo al iniciar el estudio, comparado con el 72% de sobrepeso, 25.36% de grasa y 39.67% de músculo en la evaluación final.

Martínez Roldan y cols., realizaron un estudio en jóvenes de la Universidad Alfonso X El Sabio de Madrid

(España), donde demuestran un 28,5% de sobrepeso en hombres y 14,2% en mujeres. El porcentaje de grasa fue de 16.4% en hombres y 27.1% en mujeres. Comparado con los datos obtenidos en nuestro estudio comprobamos que nuestra población de sujetos tenía porcentajes de sobrepeso mayores (62.5% en mujeres y 88.2% en hombres) y mayores niveles de grasa (31.2% para las mujeres y 26.4% para hombres) (Martínez Roldán C, Veiga Herreros P, López de Andrés A, Cobo Sanz JM, 2005).

De acuerdo al nivel de grasa corporal en ambos estudios se observa que las mujeres poseen un estado normal o saludable, sin embargo, los hombres españoles muestran un nivel saludable o normal de grasa, mientras que los hombres mexicanos se encuentran en un nivel muy elevado de grasa respecto a la evaluación inicial. Durante la segunda evaluación nuestros sujetos demostraron una reducción en el porcentaje de grasa hasta un 23.9%, modificando el estado de muy elevado a elevado.

En otro estudio realizado por Cardozo en Colombia el IMC medio en hombres fue de 22.7 vs. 23,1 de mujeres, el porcentaje de grasa corporal medio fue en hombres 16,4% vs. mujeres 25,0%, encontrándose cifras mayores en las mujeres en ambos parámetros con diferencias significativas. Resultados que concuerdan con nuestros hallazgos, sin embargo, los valores de IMC y grasa corporal siguen siendo más elevados en nuestros sujetos (Alberto Cardozo *et al.*, 2017).

Otros investigadores han estudiado la composición corporal en jóvenes atletas y no atletas, reportan un porcentaje de grasa promedio de $17.3 \pm 6.5\%$ en todos los sujetos. Luego de realizar una clasificación por sexo y deporte, en hombres no atletas y atletas, reportaron un 15.7% vs 13.7% y en mujeres 27.0 % y 21.1% respectivamente (Sagayama *et al.*, 2020). Podemos observar que a comparación de nuestros resultados con los porcentajes de grasa en los jóvenes atletas de ese estudio las cifras del porcentaje de masa grasa siguen siendo mayores en nuestra población (16.4% en hombres y 27.1% en mujeres).

En Madrid se realizó un estudio con 84 sujetos sanos (36 hombres y 48 mujeres), con índice de masa corporal entre 25-29,9 kg/m², edad entre 18-50 años, no fumadores y sedentarios fueron divididos aleatoriamente en grupos de fuerza, resistencia, combinados de fuerza más resistencia o con recomendaciones de actividad física.

Todos los individuos siguieron una dieta hipocalórica durante 22 semanas. Las mediciones de grasa corporal se realizaron con el método absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), bioimpedancia y pliegues cutáneos. Encontraron diferencias entre los valores de DEXA y los métodos bioimpedancia y pliegues cutáneos, pero las diferencias en el cambio del porcentaje de grasa fueron comparables (Benito, Gómez-Candela, Cabañas, Szendrei, & Castro, 2019).

La dieta hiperproteica e hipocalórica se ha estudiado en pacientes con obesidad previo a cirugía bariátrica, donde se ha demostrado que no tiene ningún efecto en cuanto al porcentaje de grasa y porcentaje muscular (Pardo-Pacheco, Pérez-Cruz, Nieto-Velázquez, Asbun-Bojalil, & Moreno-Eutimio, 2018).

Abreu de Almeida y colaboradores describen en sus resultados que las deportistas de voleibol presentan una media de $64,35 \pm 6,12$ Kg. de masa corporal; $1,74 \pm 0,06$ m. de estatura y $20,51 \pm 2,43\%$ de grasa corporal. Valores de grasa corporal similares a los de nuestro estudio. Estos investigadores también realizaron un análisis dietético que demostró un alto consumo de dietas hipercalóricas, hiperprotéicas e hipoglicídicas, con un consumo inadecuado de calcio y vitamina E en este tipo de jóvenes deportistas (Abreu, Almeida, & Abreu, 2003).

Nosotros revisamos únicamente a los sujetos en control por el departamento de nutrición del gimnasio que llevaban una dieta hipocalórica para reducción del peso corporal e hiperproteica con el fin de preservar o aumentar la masa muscular, y observamos que hubo una reducción significativa en los porcentajes y kilogramos de grasa corporal y un aumento en la masa muscular, por lo que podríamos sugerir que este tipo de dieta aunada a la actividad física individualizada, adecuada y estructurada mejoran el peso corporal, disminuye el porcentaje de grasa y aumenta la masa muscular.

Los lineamientos actuales sugieren que en la valoración nutricional de la composición corporal el IMC tiene poca sensibilidad y especificidad para identificar y diferenciar entre la grasa corporal y la masa libre de grasa en el organismo, por lo que su utilización queda a consideración de cada profesional o investigador (Costa, Alonso, Patrocinio, Candia, & Paz, 2015). Se sabe que el método DEXA es el estándar de oro para medir la composición corporal, sin embargo, en un gimnasio es difícil contar con estas herramientas, por lo que en

nuestro estudio se consideraron las mediciones con los instrumentos disponibles.

Benito y colaboradores concluyen en su estudio que el método de los pliegues cutáneos parece subestimar los cambios en los parámetros medidos para composición corporal, por lo que sugieren que los métodos DEXA y bioimpedancia son mejores herramientas y más efectivas para medir el peso y la grasa durante un régimen para la pérdida de peso en sujetos con sobrepeso (Benito et al., 2019).

Un estudio realizado en estudiantes de ciencias de la actividad física y el deporte de Barcelona (España) compararon la estimación de la masa grasa entre diferentes métodos: bioimpedancia y antropometría. Se midieron 55 personas utilizando la antropometría y diferentes aparatos de bioimpedancia: Biospace Inbody 720, Tanita TBF-521, Tanita BC400 y Omron BF-300. Los resultados mostraron una mayor concordancia entre la masa grasa del grupo femenino mientras que el masculino la concordancia entre ambos métodos era media baja y el aparato con mayor concordancia fue la Tanita BC400 (CCI =0,65), (Portao, Bescós, Irurtia, Cacciatori, & Vallejo, 2009).

Otro estudio realizado en 20 hombres adultos comparando la antropometría y 3 sistemas bioimpedancia (Tanita TBF-521, Omron BF-300 y Promis) indicaron la existencia de diferencias destacables entre los aparatos que fueron evaluados y el método de antropometría. El sistema que mayor concordancia presentó con la antropometría fue el Tanita TBF- 521 en formato "atleta", con ICC considerado como moderado (ICC=0,65), (Jordi Porta, Raúl Bescós, 2009).

Debido a lo anterior nosotros decidimos realizar la prueba de fiabilidad de los métodos utilizados, demostrando con la comparación entre los 3 métodos un "Muy Buen índice de concordancia" (ICC= 0.909- 0.973) y un "grado de acuerdo Casi Perfecto" (ICC = 0.833- 0.947). Esto es importante ya que aseguran una buena medición de los parámetros de grasa y músculo para la población de nuestro estudio. Los métodos utilizados en esta investigación son herramientas útiles para el nutriólogo sobre todo en lugares donde la DEXA no está disponible. Solo un bajo porcentaje de sujetos que acuden a los gimnasios optan por un control nutricional. Los resultados de este estudio demuestran el beneficio del ejercicio físico con el apoyo nutricional que pueden ser observados a partir de la sexta semana de control.

Nuestro estudio es el primero en México en reportar que una dieta hipocalórica e hiperproteica contribuye a la pérdida de peso y grasa corporal y al aumento del porcentaje de masa muscular en hombres y mujeres deportistas que acuden a los gimnasios y llevan un control nutricional. Esto es relevante debido a que la mayor parte de la población se ejercita o adopta regímenes dietéticos sin el apoyo y seguimiento de expertos en actividad física y nutrición. Estos resultados pueden extrapolarse únicamente a población en las mismas condiciones que los sujetos estudiados. Por lo que se necesita mayor investigación al respecto.

Existen algunas limitaciones inherentes al diseño transversal de nuestro estudio y otras como el pequeño tamaño de la muestra, que, a pesar de que encontramos diferencias entre dos evaluaciones en tiempos diferentes se necesitan estudios que confirmen estos resultados con una mayor cantidad de sujetos. Además, no contamos con un grupo control para realizar una relación causal entre este tipo de dieta y rutina de actividad física con el cambio en los parámetros de la composición corporal. Es necesario realizar estudios longitudinales relacionados con el control nutricional y el acompañamiento de la actividad física para valorar los beneficios en la salud de los sujetos, sobre todo en población mexicana donde las tasas de sobrepeso y obesidad se encuentran muy elevadas comparadas con otros países.

REFERENCIAS

- Abreu, T., Almeida, D., & Abreu, E. (2003). Perfil dietético e antropométrico de atletas adolescentes de voleibol. *Rev Bras Med Esporte*, 9(4), 191-197.
- Alberto Cardozo, L., Alberto, L., Guzman, C., Andrés, Y., Torres, M., & Alejandro, J. (2017). Artículo Original Porcentaje de grasa corporal y prevalencia de sobrepeso-obesidad en estudiantes universitarios de rendimiento deportivo de Bogotá, Colombia Body fat percentage and prevalence of overweight-obesity in college students of sports performanc, 36(3), 68-75. <https://doi.org/10.12873/363cardozo>
- Benito, P. J., Gómez-Candela, C., Cabañas, M. D., Szendrei, B., & Castro, E. A. (2019). Comparison between different methods for measuring body fat after a weight loss program. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 25(6), 474-479. <https://doi.org/10.1590/1517-869220192506149743>

- Calbet, J. A. L., Ponce-González, J. G., de La Calle-Herrero, J., Perez-Suarez, I., Martin-Rincon, M., Santana, A., ... Holmberg, H. C. (2017). Exercise preserves lean mass and performance during severe energy deficit: The role of exercise volume and dietary protein content. *Frontiers in Physiology*, 8(JUL), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00483>
- Carbajal. (2013). *Manual de Nutrición y Dietética*. Recuperado de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-4-energia.pdf>
- Costa, O., Alonso, D., Patrocinio, C., Candia, R., & Paz, J. (2015). Métodos de evaluación de la composición corporal: una revisión actualizada de descripción, aplicación, ventajas y desventajas. *Arch Med Deporte*, 32(6), 387–394. Recuperado de http://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulos/upload/rev1_costa_moreira.pdf
- Esmarck, B., Andersen, J. L., Olsen, S., Richter, E. A., Mizuno, M., & Kjær, M. (2001). Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *Journal of Physiology*, 535(1), 301–311. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00301.x>
- Fleiss, J. L. (2011). Reliability of Measurement. *The Design and Analysis of Clinical Experiments*, 1–32. <https://doi.org/10.1002/9781118032923.ch1>
- Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., & Sakamoto, Y. (2000). Healthy percentage body fat ranges: An approach for developing guidelines based on body mass index. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), 694–701. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.694>
- Jabekk, P. T., Moe, I. A., Tomten, S. E., & Høstmark, A. T. (2010). Resistance training in overweight women on a ketogenic diet conserved lean body mass while reducing body fat. *Nutrition and Metabolism*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-17>
- Jäger, R., Kerksick, C. M., Campbell, B. I., Cribb, P. J., Wells, S. D., Skwiat, T. M., ... Antonio, J. (2017). International Society of Sports Nutrition Position Stand: Protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0177-8>
- Jordi Porta, Raúl Bescós, L. V. (2009). El método antropométrico versus diferentes sistemas bio para la estimación de la grasa corporal en deportistas. *Archivos de Medicina del Deporte*, 26(131), 187–193.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). Landis and Koch 1977 agreement of categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174.
- Layman, D. K., Evans, E., Baum, J. I., Seyler, J., Erickson, D. J., & Boileau, R. A. (2005). Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during weight loss in adult women. *Journal of Nutrition*, 135(8), 1903–1910. <https://doi.org/10.1093/jn/135.8.1903>
- Martínez Roldán C, Veiga Herreros P, López de Andrés A, Cobo Sanz JM, C. A. A. (2005). Nutritional status assessment in a group of university students by means of dietary parameters and body composition. *Nutricion Hospitalaria*, 20(3), 197–203.
- McCarthy, S. N., Robson, P. J., Livingstone, M. B. E., Kiely, M., Flynn, A., Cran, G. W., & Gibney, M. J. (2006). Associations between daily food intake and excess adiposity in Irish adults: Towards the development of food-based dietary guidelines for reducing the prevalence of overweight and obesity. *International Journal of Obesity*, 30(6), 993–1002. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803235>
- Mettler, S., Mitchell, N., & Tipton, K. D. (2010). Increased protein intake reduces lean body mass loss during weight loss in athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(2), 326–337. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181b2ef8e>
- Pardo-Pacheco, B. R., Pérez-Cruz, E., Nieto-Velázquez, N. G., Asbun-Bojalil, J., & Moreno-Eutimio, M. A. (2018). High-protein diet in morbidity obesity patient before bariatric surgery. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 86(6), 508–514. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000299>
- Phillips, S. M., & van Loon, L. J. C. (2011). Dietary protein for athletes: From requirements to optimum adaptation. *Journal of Sports Sciences*, 29(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.619204>
- Portao, J., Bescós, R., Irurtia, A., Cacciatori, E., & Vallejo, L. (2009). Valoración de la grasa corporal en jóvenes físicamente activos: Antropometría vs bioimpedancia. *Nutricion Hospitalaria*, 24(5), 529–534. <https://doi.org/10.3305/nh.2009.24.5.4463>

- Rahbek, S. K., Farup, J., Møller, A. B., Vendelbo, M. H., Holm, L., Jessen, N., & Vissing, K. (2014). Effects of divergent resistance exercise contraction mode and dietary supplementation type on anabolic signalling, muscle protein synthesis and muscle hypertrophy. *Amino Acids*, 46(10), 2377–2392. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1792-1>
- Rodriguez, Nancy & Dimarco, Nancy & Langley, S. A. C. of S. M. position stand. (2009). Nutrition and Athletic Performance : Position Statement. *Medicine & Science in Sports & Exercise, Special Co*, 709–731. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318190eb86>
- Sagayama, H., Yamada, Y., Ichikawa, M., Kondo, E., Yasukata, J., Tanabe, Y., ... Takahashi, H. (2020). Evaluation of fat-free mass hydration in athletes and non-athletes. *European Journal of Applied Physiology*, 120(5), 1179–1188. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04356-y>
- Snijders, T., Res, P. T., Smeets, J. S., Van Vliet, S., Van Kranenburg, J., Maase, K., ... Van Loon, L. J. (2015). The Journal of Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions Protein Ingestion before Sleep Increases Muscle Mass and Strength Gains during Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Healthy Young Men 1-3, (C), 1-7. <https://doi.org/10.3945/jn.114.208371.1>
- Stokes, T., Hector, A. J., Morton, R. W., McGlory, C., & Phillips, S. M. (2018). Recent perspectives regarding the role of dietary protein for the promotion of muscle hypertrophy with resistance exercise training. *Nutrients*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/nu10020180>
- Tarnopolsky, M. (2004). Protein requirements for endurance athletes. *European Journal of Sport Science*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/17461390400074102>
- Tipton, K. D., Elliott, T. A., Cree, M. G., Aarsland, A. A., Sanford, A. P., & Wolfe, R. R. (2007). Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(1), 71–76. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00166.2006>
- Volek, J. S., Phinney, S. D., Forsythe, C. E., Quann, E. E., Wood, R. J., Puglisi, M. J., ... Feinman, R. D. (2009). Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids*, 44(4), 297–309. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3274-2>
- Volek, J. S., Volk, B. M., Gómez, A. L., Kunces, L. J., Kupchak, B. R., Freidenreich, D. J., ... Kraemer, W. J. (2013). Whey Protein Supplementation During Resistance Training Augments Lean Body Mass. *Journal of the American College of Nutrition*, 32(2), 122–135. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.793580>
- Wardenaar, F. C. (2017). *Evaluation of dietary intake and nutritional supplement use of elite and sub-elite Dutch athletes*.

Análisis de la coinfección por microorganismos formadores de biopelícula en pacientes hospitalizados con COVID-19

^{1,2*}Alba-Romero José de Jesús, ¹Martínez-Romero Aurora, ⁴Castro-Escarpuli Graciela, ¹Calleros-Rincón Esperanza Yasmín, ³Ruiz-Flores Pablo, ¹Hernández-González Sandra Isabel, ²Alba-Romero Damari Lizeth, ¹Pérez-Morales Rebeca.

¹División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED).

²Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango SA DE CV.

³Centro de investigación Biomédica UA de C Torreón Coah.

⁴Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

*Email de correspondencia: jalbar@hotmail.com

RESUMEN

El brote de la enfermedad llamada COVID-19 producida por SARS-CoV-2 causante del síndrome respiratorio agudo severo tipo-2. Los pacientes con este padecimiento son tratados con corticosteroides a fin de atenuar los síntomas en la etapa de la tormenta de citocinas, Esta terapia farmacológica ha propiciado mayor vulnerabilidad a las infecciones por bacterias y hongos. El objetivo principal fue analizar cuáles microorganismos están involucrados en la coinfección con pacientes con COVID-19 en la unidad de cuidados intensivos del Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango. Utilizamos para el aislamiento de microorganismos formadores de biopelícula, medios de cultivo específicos, posteriormente fueron identificados por un sistema automático Vitek-2 de biomérieux. Encontrando los principales microorganismos causantes de IAAS a nivel mundial, los principales microorganismos fueron *Stenotrophomonas cepacea*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniaea*, *Candida albicans* y *Candida haemulonii*. *Candida auris* es una cepa que el sistema de identificación la confunde con *C. haemulonii*, esta cepa de gran importancia epidemiológica a nivel mundial por su alto nivel de resistencia a los antifúngicos. Concluyendo que los pacientes con COVID-19 en unidad de cuidados intensivos deben ser manejados con procedimientos altamente evaluados y por personal profesional consciente de riesgo de general IAAS que pone en riesgo elevado de adquirir una coinfección por bacterias o levaduras y contribuir a la mortalidad de este tipo de pacientes.

ABSTRACT

The outbreak of the disease called COVID-19 produced by SARS-CoV-2 that causes severe acute respiratory syndrome type-2. Patients with this condition are treated with corticosteroids in order to attenuate symptoms in the cytokine storm stage. This drug therapy has led to greater vulnerability to bacterial and fungal infections. The main objective was to analyze which microorganisms are involved in co-infection with patients with COVID-19 in the intensive care unit of the San José de Gómez Palacio Durango Sanatorium. For the isolation of biofilm-forming microorganisms, we used specific culture media, which were subsequently identified by an automatic biomérieux Vitek-2 system. Finding the main microorganisms causing IAAS worldwide, the main microorganisms were *Stenotrophomonas cepacea*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniaea*, *Candida albicans* and *Candida haemulonii*. *Candida auris* is a strain that the identification system confuses with *C. haemulonii*, this strain of great epidemiological importance worldwide due to its high level of resistance to antifungals. Concluding that patients with COVID-19 in the intensive care unit should be managed with highly evaluated procedures and by professional personnel aware of the risk of general IAAS that puts at high risk of acquiring a co-infection by bacteria or yeast and contribute to the mortality of this type of patients.

INTRODUCCIÓN

El brote de la enfermedad COVID-19 por el virus SARS-CoV-2, causante del síndrome respiratorio agudo severo tipo-2, fue declarado como una pandemia en marzo de 2020 (Qu J., *et al* 2021). Se ubica taxonómicamente en la familia *Coronaviridae*. Esta familia se subdivide en cuatro géneros: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus (Gorbalenya AE., *et al* 2020) (Pal M., *et al* 2020). La infección por SARS-CoV y MERS-CoV demostró una alta transmisión nosocomial y al personal de salud, por lo que se considera un grupo de riesgo (Aragón-Nogales R., *et al* 2019). La evidencia inicial ha mostrado que las infecciones bacterianas secundarias, son un factor de riesgo importante para los resultados adversos de la COVID-19. Un estudio retrospectivo de China, encontró que el 96% de los pacientes con infecciones bacterianas secundarias murieron. Varios estudios han encontrado que un número significativo de pacientes hospitalizados con la COVID-19, desarrollan coinfecciones bacterianas secundarias peligrosas, como neumonías y otras sepsis (Aguilera Calzadilla Y., *et al* 2020). Las pruebas de diagnóstico microbiológico, identifican la presencia de infecciones bacterianas y/o fúngicas, además la resistencia a los medicamentos, lo cual desempeña un papel fundamental en la respuesta de salud pública a la COVID-19 (Monté Cerero L., *et al* 2015). Las coinfecciones bacterianas en las neumonías, representan una seria amenaza para los pacientes con la COVID-19 de alto riesgo. Muchos factores se unen para crear complicaciones graves, potencialmente mortales, las cuales la comunidad de atención médica no puede ignorar. Los investigadores han aseverado, que corren mayor riesgo los adultos mayores y aquellos con afecciones preexistentes ((Aguilera Calzadilla Y., *et al* 2020). Los microorganismos que con mayor frecuencia causan infecciones en el medio hospitalario, sobre todo en área de cuidados intensivos son: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, los bacilos no fermentadores y las enterobacterias. Estos patógenos son altamente eficientes en la regulación ascendente o en la adquisición de mecanismos de resistencia a los antibióticos, especialmente los formadores de biopelícula, además en presencia de selección de antibióticos, presión que agrava más la necesidad de medidas de control de infecciones, no solo para la prevención de coinfecciones bacterianas y el virus SARS-CoV-2, sino también bacterias resistentes a múltiples fármacos (Díaz Medina LM., *et al* 2017). En la actualidad se necesitan nuevas

dianas terapéuticas y nuevos quimiotipos para proteger y tratar las heridas contra las infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos, al igual que se necesitan nuevas dianas y quimiotipos para los antibióticos sistémicos. Un elemento clave para resolver este problema será la revitalización del manguante desarrollo de antibióticos (Vandecandelaere L., *et al* 2015). En los pacientes críticamente enfermos, la respiración se ve afectada y es necesaria la ventilación mecánica mediante un tubo endotraqueal (TE) conectado a un ventilador. Aunque la ventilación mecánica es un procedimiento que salva vidas, no está exento de riesgos. Debido a varias razones, a menudo se forma una biopelícula en el extremo distal del TE y esta biopelícula (excreción de un exopolisacárido bacteriano o matriz extracelular adhesiva protectora) es una fuente persistente de bacterias que pueden infectar los pulmones y causar neumonía asociada al ventilador (NAV) (Starr GC., *et al* 2020). El diagnóstico de las coinfecciones bacterianas y por levaduras se basa en la existencia de clínica compatible, junto con presencia de ocupación del espacio alveolar en la radiografía de tórax. El hallazgo de un infiltrado en la radiografía es el patrón oro para establecer el diagnóstico. Para el diagnóstico etiológico es necesaria la realización de hemocultivos, tinción de Gram y cultivo de esputo determinación de antígeno en orina de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*. La serología está indicada para el diagnóstico de neumonía por *M. pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae* (título elevado de anticuerpos IgM en el suero de la fase aguda y/o seroconversión del título de IgG en el suero de la fase de seroconversión) (Asensio Martín M.J., *et al* 2018). El sistema nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales llamadas así anteriormente hoy infecciones asociadas a la atención en la salud (IAAS), ha definido las IAAS como una afección localizada o sistémica que resulta de una reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o sus toxinas que no estaban presentes o en incubación en el momento de la admisión al hospital. Las IAAS importantes en la UCI basadas en la frecuencia y la gravedad potencial incluyen infección del tracto urinario (ITU), neumonía, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones de la piel y tejidos blandos, gastroenteritis, hepatitis y meningitis (Choudhuri AH., *et al* 2017). Distintos autores han alertado del aumento de las resistencias a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario debido a la pandemia de la COVID-19 (Díaz-Castrillón FJ., *et al* 2020). El uso generalizado de antimicrobianos de forma empírica al ingreso y, en particular, en las unidades de cuidados intensivos ha

sido señalado como uno de los factores más relevante responsables de este hecho (Cantón R., *et al* 2021). Esta situación ha evidenciado aún más la necesidad de una mejor política de prevención de las infecciones respiratorias y la utilización de antimicrobianos en la que se ha de evaluar los aspectos relacionados con los propios pacientes y sus factores de riesgo, los antimicrobianos disponibles y los relacionados con los patógenos que producen estas infecciones (Cantón R., *et al* 2021). En los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha discutido si el uso de corticosteroides inhalados podría reducir la severidad de la infección por SARS-CoV-2. Los resultados no son concluyentes debido a numerosos factores de confusión en el análisis de las series (Higham A., *et al* 2020). No obstante, se ha evidenciado que los pacientes con COVID-19 y EPOC tienen mayor probabilidad de presentar una coinfección bacteriana o fúngica que los pacientes sin EPOC y en los que es necesaria una adecuación del tratamiento antimicrobiano (Wu F., *et al* 2020). Los pacientes ingresados por COVID-19 presentan varios factores, no excluyentes entre sí, que predisponen a la infección bacteriana y fúngica (Casas-Rojo JM., *et al* 2020). Primero, debido a la acción del virus SARS-CoV-2 destrucción tisular, infección de los enterocitos y alteración la hemostasia intestinal (Zhou F., *et al* 2020). Segundo, por la elevada liberación de citocinas y desregulación del sistema inmune (Docherty AB., *et al* 2020). Tercero, por las características del paciente y sus comorbilidades (EPOC, diabetes, insuficiencia renal crónica [IRC], inmunosupresión), dispositivos médicos invasivos, estancias prolongadas,

etc (Nebreda-Mayoral T., *et al* 2020). En pacientes con graves neumonía viral, como influenza y COVID-19, síndrome respiratorio agudo son una complicación común que requiere ingreso en unidad de cuidados intensivos (UCI) y ventilación mecánica (VM), uso de corticosteroides y antagonistas de la interleucina, por ejemplo, tocilizumab para contrarrestar la constricción inflamatoria masiva de las vías respiratorias y posterior tormenta de citosinas (Ahmadikay, K., *et al* 2021).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 88 cultivos de muestras clínicas (Expectoración, hemocultivos, y puntas de catéter) de pacientes hospitalizados en área de pacientes con COVID y cuidados intensivos del Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango (Se solicitó a los familiares su consentimiento por escrito para disponer de los resultados de las muestras de sus pacientes, a los cual accedieron firmando de aprobación. Este estudio es parte de un proyecto que abarca el análisis de microorganismos ESKAPE y sus factores de virulencia el cual obtuvo la aprobación del mite de bioética de La Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango). Se sembraron en medio medios de cultivo como agar Casman con sangre, agar Mac Conkey, agar Biggy; se incubaron a 37°C de 18 a 24 h, el trabajo de sembrar las muestras clínicas se realizó en cabina de bioseguridad tipo IIA ya que las muestras provienen de pacientes áreas COVID con diagnóstico confirmado. Posteriormente se procedió a inocular las tarjetas de identificación para

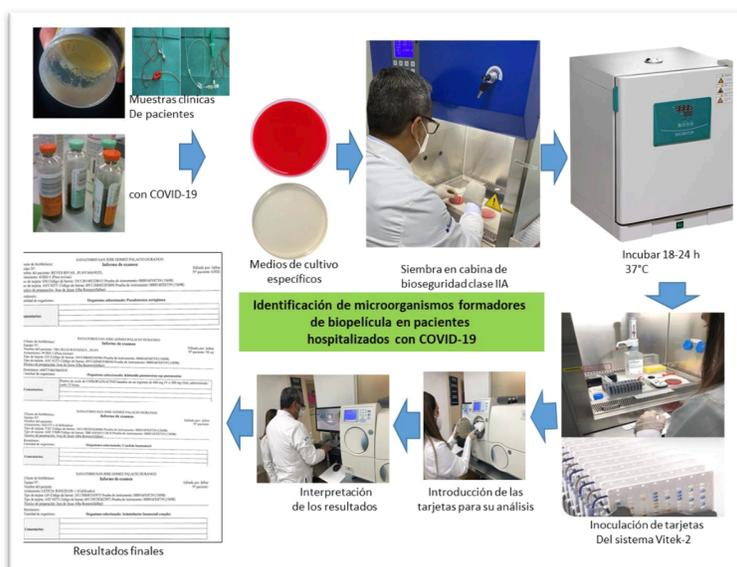


Figura 1. Protocolo de aislamiento e identificación de microorganismos formadores de biopelícula en muestras clínicas de pacientes con COVID-19.

bacterias, levaduras y de sensibilidad a los antibióticos por el método automatizado de Vitek-2 de bioMérieux. Transcurridos de 18 a 24 h que requiere el equipo de microbiología automatizado obtuvieron los resultados de identificación y sensibilidad a los antibióticos para cada bacteria por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) Figura 1. Las herramientas estadísticas utilizadas fueron medidas de tendencia central.

RESULTADOS

En las diferentes muestras clínicas en que se aislaron 5 géneros bacterianos, 3 correspondientes a bacilos Gram negativos no fermentadores, 1 bacilos fermentador (*K. pneumoniae*), 1 cocos Gram positivos (*S. aureus*), 2 Levaduras (*C. albicans*, *C. haemulonii*). Todos los microorganismos aislados son formadores de biopelícula. Se aislaron de muestras de hemocultivos, secreciones bronquiales y diversas puntas de catéter tal como se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales microorganismos aislados y muestras clínicas de las que se aislaron.

MICROORGANISMOS	HEMOCULTIVO	SECRECIÓN BRONQUIAL	PUNTA DE CATETER
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X	X	X
<i>Klebsiella pneumophila</i>	X		
<i>Stenotrophonas maltophilia</i>	X		
<i>Acinetobacter Baumanii</i>	X	X	X
<i>Staphylococcus aureus</i>		X	X
<i>Candida albicans</i>	X	X	X
<i>Candida haemulonii</i>		X	

La identificación de los microorganismos fue por medio del sistema Vitek-2 compact bioMérieux, describiendo los principales géneros y especies, además el número de aislados de cada microorganismo según se muestra en la Figura 2.

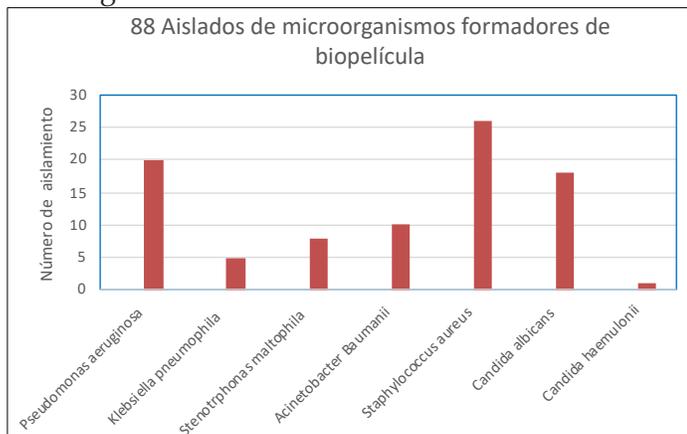


Figura 2. Proporción de microorganismos aislados en muestras clínicas.

Se obtuvo la frecuencia de aislamiento por género

y especie, así como, el número de aislados que corresponde al universo de estudio como se muestra en la Figura 2. Además, se pudo describir, el número de aislados, el porcentaje correspondiente y los aislados por muestra analizada y la coinfección bacteriana donde se pudo aislar hasta 3 y 2 microorganismos por muestra analizada, como se demuestra en la Tabla 2. Para este estudio solo se utilizó, medidas de

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos, porcentajes, y coinfección de los diferentes géneros y especies de 88 cultivos.

No.	Aislados de microorganismos formadores de biopelícula			
	Aislamientos	88 Pacientes con COVID-19		Co-infección
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	28.40%	1, 5 y 6
2	<i>Klebsiella pneumophila</i>	5	5%	2 y 6
3	<i>Stenotrophonas maltophilia</i>	8	9.00%	3 y 5
4	<i>Acinetobacter Baumanii</i>	10	11.50%	4 y 6
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	29.50%	5 y 2
6	<i>Candida albicans</i>	18	20.50%	6, 1 y 3
7	<i>Candida haemulonii</i>	1	1.10%	7 y 1

DISCUSIÓN

En este estudio pudo caracterizar los principales microorganismos causantes de biopelícula y asociados a IAAS, aspecto que ya es conocido, tal como lo declaró la OMS en el año 2019 (Berenguer J., et al 2020). Sin embargo, en la actualidad los géneros de microorganismos como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* y *Candida* han exacerbado los la sintomatología de los pacientes con COVID-19, coincidiendo con los hallazgos de Mayoral en el año 2020, sin embargo, hace más énfasis en el género *Pseudomonas*. Las características genéticas de producir biopelícula, les permite ser por naturaleza resistente a los antibióticos. La regulación de los genes que controlan la expresión de estos factores de virulencia se llama Cuorum Sensing o sensor de población, fenómeno que les permite actuar cuando encuentra las condiciones específicas como la carga bacteriana suficiente, aspecto que se da solamente si el sistema inmune lo permite. En los pacientes con COVID-19 un factor que favorece la colonización y posteriormente la coinfección, es el uso de corticosteroides así de atenuar el efecto de la tormenta de citocinas, este hecho fue descrito por Cantón en el año 2020. La comunicación extracelular que utilizan algunos microorganismos es un mecanismo de defensa del medio ambiente y para la sobrevivencia, sin embargo, en paciente con COVID-19 en unidad de cuidado intensivos se convierte un alto riesgo de morbilidad, así lo ha declarado Qu J. en el

año 2021, haciendo énfasis el género *Pseudomonas*. Las levaduras han retomado importancia en la actualidad a raíz de los brotes de *Candida auris* como causante de fungemias en IAAS por su alta resistencia a los antifúngicos. En nuestro estudio encontramos una cepa de *Candida haemulonii*, especie que es confundida por el sistema Vitek-2 biomérie, pero que en realidad puede ser *Candida auris*, así lo declara la CDC en el año 2021. Los pacientes con COVID-19 en unidad de cuidados intensivos deben ser manejados por el personal de salud con procedimientos altamente evaluados y por personal profesional consciente de riesgo de general IAAS que pone en riesgo elevado de adquirir una coinfección por bacterias o levaduras y contribuir a la mortalidad de este tipo de paciente.

CONCLUSIÓN

Se procesaron 88 cultivos y se pudo identificar el género y la especie, así como la frecuencia de los microorganismos aislados de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en estado crítico infectados con COVID-19. Los cuales desarrollaron bacteriemias y fungemias. Los microorganismos aislados frecuentemente generan las Infecciones asociadas a la atención en la salud (IAAS). La infección por coronavirus SARS-CoV-2 que produce la COVID-19 en el humano, un síndrome respiratorio agudo y el tratamiento con corticosteroides son inmunosupresores como la dexametazona y los múltiples antibióticos a fin de prevenir la coinfecciones con bacterias y hongos lo cual, propició una mayor reproducción de ellos, tal como lo vemos en los resultados obtenidos, y no solamente la coinfección de 2 o 3 microorganismos por muestra clínica, sino el hecho de ser microorganismos formadores e biopelícula, aspecto que merece atención ya que tiene impacto en la aparición de cepas resistentes, multirresistentes y PAM resistentes.

Agradecimientos

Agradecemos al Sanatorio San José de Gómez palacio, Durango SA de CV por su apoyo a este proyecto y declaramos que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aguilera Calzadilla, Y., Díaz Morales, Y., Ortiz Díaz, L., González Martínez, O., Lovelle Enríquez, O., & Sánchez Álvarez, M. (2020). Infecciones bacterianas asociadas a la COVID-19 en pacientes de una unidad de cuidados intensivos. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 49(3), e0200793. Recuperado de <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/793/539>.
- Ahmadikia, K., Hashemi, SJ, Khodavaisy, S., Getso, MI, Alijani, N., Badali, H., Mirhendi, H., Salehi, M., Tabari, A., Mohammadi Ardehali, M., Kord , M., Roilides, E. y Rezaie, S. (2021). La espada de doble filo de la terapia sistémica con corticosteroides en la neumonía viral: reporte de un caso y revisión comparativa de mucormicosis asociada a influenza versus mucormicosis asociada a COVID-19. *Micosis* , 10.1111 / myc.13256. Publicación anticipada en línea. <https://doi.org/10.1111/myc.13256>.
- Aragón-Nogales R, Vargas-Almanza I, Miranda-Novales MG. (2019). COVID-19 por SARS-CoV-2: La nueva emergencia de salud. *Rev Mex Pediatr*; 86(6):213-218. doi: 10.35366/91871.
- Asensio Martín, M. J., Hernández Bernal, M., Yus Teruel, S., & Minvielle, A. (2018). Infecciones en el paciente crítico [Infections in critically ill patients]. *Medicine*, 12(52), 3085-3096. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.03.014>.
- Berenguer J, Ryan P, Rodríguez-Bano J, Jarrín I, Carratalà J, Pachón J, et al. (2020). Characteristics and predictors of death among 4035 consecutively hospitalized patients with COVID-19 in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.07.024>.
- Casas-Rojo JM, Antón-Santos JM, Millán-Núñez-Cortés J, Lumbreras-Bermejo C, Ramos-Rincón JM, Roy-Vallejo E, et al. (2020). Clinical characteristics of patients hospitalized with COVID-19 in Spain: results from the SEMI-COVID-19 Registry. *Rev Clin Esp*;220:480-94, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2020.07.003>.

- Cantón R. (2021). Aspectos microbiológicos actuales de la infección respiratoria comunitaria más allá de la COVID-19 [Current microbiological aspects of community respiratory infection beyond COVID-19]. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 34(2), 81-92. <https://doi.org/10.37201/req/049.2021>.
- Choudhuri, AH, Chakravarty, M. y Uppal, R. (2017). Epidemiología y características de las infecciones nosocomiales en pacientes críticamente enfermos en una unidad de cuidados intensivos de atención terciaria del norte de la India. *Revista de anestesia saudita*, 11 (4), 402-407. https://doi.org/10.4103/sja.SJA_230_17.
- Díaz-Castrillón FJ, Toro-Montoya AI. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: The virus, the disease and the pandemic, Artículo de Revisión Volumen 24, Número 3.
- Díaz Medina LM, Medina García M, Duque González AC, Miguélez Nodarse R. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana en muestras clínicas de pacientes con infecciones asociadas a la atención de salud. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. [acceso: 07/05/2020]; 16(3):[aprox. 14 p.].
- Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. (2020). Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*;369:m1985, <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m1985>.
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*; 5:536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Higham A, Mathioudakis A, Vestbo J, Singh D. (2020). COVID-19 and COPD: a narrative review of the basic science and clinical outcomes. *Eur Respir Rev*. 5;29(158):200199. doi:10.1183/16000617.0199.
- Monté Cerero L, Martínez Casanueva R. (2015). Microorganismos aislados en pacientes ingresados. Hospital "Salvador Allende", La Habana. Febrero a junio de 2015. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2017[acceso: 07/05/2020];16(4): [aprox. 11 p.]. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1326>.
- National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases 2021.
- Nebreda-Mayoral, T., Miguel-Gómez, M. A., March-Rosselló, G. A., Puente-Fuertes, L., Cantón-Benito, E., Martínez-García, A. M., Muñoz-Martín, A. B., & Orduña-Domingo, A. (2020). Bacterial/fungal infection in hospitalized patients with COVID-19 in a tertiary hospital in the Community of Castilla y León, Spain. *Infección bacteriana/fúngica en pacientes con COVID-19 ingresados en un hospital de tercer nivel de Castilla y León, España. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, S0213-005X(20)30404-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.11.003>.
- Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kv R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update. *Cureus*; 12:e7423. <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>.
- Qu J, Cai Z, Liu Y, Duan X, Han S, Liu J, Zhu Y, Jiang Z, Zhang Y, Zhuo C, Liu Y, Liu Y, Liu L and Yang L (2021) Persistent Bacterial Coinfection of a COVID-19 Patient Caused by a Genetically Adapted *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Colonizer. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 11:641920. doi: 10.3389/fcimb.2021.641920.
- Starr, CG, Ghimire, J., Guha, S., Hoffmann, JP, Wang, Y., Sun, L., Landreneau, BN, Kolansky, ZD, Kilanowski-Doroh, IM, Sammarco, MC, Morici, LA, Y Wimley, WC (2020). Evolución molecular y sintética de péptidos antimicrobianos compatibles con células hospedadoras eficaces contra bacterias formadoras de biopelículas resistentes a fármacos. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 117 (15), 8437-8448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918427117>.
- Vandecandelaere, I., & Coenye, T. (2015). Microbial composition and antibiotic resistance of biofilms recovered from endotracheal tubes of mechanically ventilated patients. *Advances in experimental medicine and biology*, 830, 137-155. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-7_9.
- Wu F, Zhou Y, Wang Z, Xie M, Shi Z, Tang Z, et al. (2020). Clinical characteristics of COVID-19 infection in chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, retrospective, observational study. *J Thorac Dis*. 12(5):1811-1823. doi:10.21037/jtd-20-1914.

- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.*; 395 (10229):1054-62, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PERFIL DE INGRESO

Conocimientos generales de: Química, Física, Matemáticas y Biología

Ser creativo y observador, tener capacidad de síntesis y análisis crítico

Tener espíritu emprendedor, una actividad proactiva y capacidad para trabajar en equipo.

PERFIL DE EGRESO

- Resolver problemas en las áreas de biotecnología, ciencias de los alimentos, diagnóstico clínico, ambiental y farmacéutico
- Dedicarse a la producción de bienes y servicios en las áreas relacionadas con la salud, química-farmacéutica, legal, patología, forense, diagnóstico clínico, etc.
- Desarrollar con ética y responsabilidad la innovación de productos farmacéuticos con el propósito de mejorar la calidad de vida del paciente.

Cuerpo académico UJED-GD-0030

LGAC: Educación Ambiental y Biotecnología Ambiental

En desarrollo

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Producción de compuestos de valor agregado a partir de residuos agropecuarios	M.C. Aurelio Maldonado Cabrera	
Aislamiento, selección e identificación de agentes microbianos con potencial de aplicación biotecnológico	M.C. Romana Ramírez Flores	
Selección de cepas nativas de hongos, con capacidad de sacarificación del estiércol bovino lechero como sustrato de celulosa	M.C. Saulo Zuñiga Sosa	
Monitoreo de <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> de rastros TIF de la Comarca Lagunera	Dr. Jesús Vásquez Arroyo	
Bioeconomía regional de microalgas para el tratamiento de aguas residuales		
Microbioma: Salud ambiental, animal y humana		

Cuerpo académico UJE- CA- 134 Química y Tecnología de Productos Alimenticios

LGAC: Tecnología de Alimentos y sus biocomponentes

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Contenido de licopeno en tomate orgánico y con fertilización química.	Guadalupe Candelas Cadillo	 <p>Licopeno un antiOX</p>
PROPIEDADES FUNCIONALES Y DE TEXTURA DE SÁBILA (<i>Aloe vera barbadensis</i> Miller) FRESCA Y PROCESADA.		
Extracción de biocomponentes de diferentes matrices alimentarias aplicando ultrasonido de potencia	José Rafael Minjares Fuentes	
Aplicación de ultrasonidos de potencia al gel de Aloe vera		
Efecto de la temperatura y la velocidad de alimentación del secado por aspersion en las propiedades funcionales, la concentración de aloemodina y aloína, la actividad antioxidante y el perfil de carbohidratos del jugo de gel de <i>Aloe barbadensis</i> Miller	Juan José Martínez García	
Construcción de un extractor sólido – líquido didáctico		
Textura, nivel de agrado y vida de anaquel de un mazapán de nuez (<i>Carya illinoensis</i>) adicionado con diferentes concentraciones de inulina y leche en polvo	Juan Pablo Alemán Morán	

MICROBIOLOGÍA

(Clínica, Veterinaria, Vegetal)



*“Si no te equivocas de vez en cuando, significa que no aprovechas todas tus oportunidades”
Woody Allen (1935-); actor y director estadounidense.*

Antagonismo *in vitro* de *Bacillus megaterium* (de Bary) sobre *Rhizoctonia solani* Kühn

In vitro antagonism of *Bacillus megaterium* (de Bary) upon *Rhizoctonia solani* Kühn

¹Tepalcatl-Villarreal Marco Antonio, ¹Ibarra-Rubio Claudio, ²Blanco-Contreras Eduardo, ^{2,3*}Vásquez-Arroyo Jesús.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Regional Laguna. División de Carreras Agronómicas. Departamento de Parasitología. Periférico Raúl López Sánchez Km 2.0 Colonia Valle Verde. CP 27134. Torreón, Coahuila México.

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Regional Laguna. División de Carreras Agronómicas. Departamento de Agroecología. Periférico Raúl López Sánchez Km 2.0 Colonia Valle Verde. CP 27134. Torreón, Coahuila México.

³Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Ciencias Químicas. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Av. Artículo 123 S/N. Fracc. Filadelfia. CP 34010. Gómez Palacio, Durango, México.

*E-mail correspondencia: jesus.vasquez@uaaan.edu.mx; jesus.vazquez@ujed.mx.

RESUMEN

Las bacterias que reducen la incidencia de enfermedades de plantas causadas por fitopatógenos a menudo se denominan antagonistas y son utilizados como agentes de biocontrol en la agricultura. El presente estudio se realizó en Mayo-Agosto del 2018, con el objetivo de determinar el efecto antagónico de *Bacillus megaterium* sobre *Rhizoctonia solani in vitro*. Se utilizó un diseño completamente al azar con dos factores: diluciones bacterianas (10^{-3} - 10^{-5}) y medios de cultivo (agar nutritivo, AN y agar de papa dextrosa, PDA), con seis repeticiones. Los tratamientos fueron cuatro (T1= testigo, sin inocular el antagonista (*B. megaterium*), T2-T4 (10^{-3} - 10^{-5} diluciones del antagonista). La variable respuesta fue la inhibición del crecimiento fúngico a través del tiempo: 216 h en PDA y 168 h para AN. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey con un $\alpha=0.05$. De acuerdo con los resultados encontrados, el ANOVA presentó diferencias altamente significativas para los medios de cultivo ($P<0.000$), donde el análisis de media demuestra que el AN fue mejor que el PDA para el estudios de antagonismo. El mayor efecto antagónico los presentaron el T2 y T3; tanto en PDA como AN, siendo mayor en este último con 59.6 y 60.2 % respectivamente a partir de las 72 h de cultivo. *B. megaterium* puede representar una alternativa como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo.

Palabras claves: Inhibición micelial, agente de biocontrol, fitopatógenos, antagonista

ABSTRACT

Bacteria that reduce the incidence of plant diseases caused by phytopathogens are often called antagonists and are used as biocontrol agents in agriculture. The present study was carried out in May-Aug 2018, with the objective of determining the antagonistic effect of *Bacillus megaterium* upon *Rhizoctonia solani in vitro*. A completely randomized design with two factors was used: bacterial dilutions (10^{-3} - 10^{-5}) and culture media (nutritive agar, AN and potato dextrose agar, PDA), with six replications. The treatments were four (T1 = control, without inoculating the antagonist (*B. megaterium*), T2-T4 (10^{-3} - 10^{-5} , dilutions of the antagonist). The response variable was inhibition of fungal growth over time: 216 h in PDA and 168 h for AN. According to the results found, the ANOVA presented highly significant differences for the culture media ($P < 0.000$), where the mean analysis shows that the AN was better than the PDA for the antagonism studies. The greatest antagonistic effect was presented by T2 and T3; both in PDA and AN, being higher in the latter with 59.6 and 60.2% respectively after 72 h of culture. *B. megaterium* may represent an alternative as a biocontrol agent for phytopathogenic soil fungi.

Key words: Mycelial inhibition, biocontrol agent, plant pathogens, antagonist

INTRODUCCIÓN.

Las bacterias que reducen la incidencia de enfermedades de plantas a menudo se denominan agentes de biocontrol, mientras que aquellas que exhiben actividad adversa o negativas hacia un patógeno se definen como antagonistas (Beattie, 2007). Las interacciones antagónicas pueden evaluarse mediante metodologías tales como: la de agar doble capa y el ensayo de inhibición simultánea. Las bacterias producen sustancias inhibitorias tales como: antibióticos, ácidos orgánicos, sideróforos, antifúngicos y bacteriocinas. Entre los géneros bacterianos más estudiados que las producen incluyen; *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Burkholderia* (Cesa-Luna *et al.*, 2020).

Las bacterias del suelo que tienen actividad antagonista contra los fitopatógenos, tienen una función importante en el crecimiento de las raíces, el crecimiento general de las plantas y también su composición depende de la especie vegetal. El desmedido crecimiento poblacional ha provocado el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, fungicidas y pesticidas, lo que representa un grave riesgo para la productividad de las plantas y la flora del suelo. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, se consideran más seguras que los fertilizantes químicos, ya que, son ecológicos y se mantienen más tiempo después de la colonización en el suelo rizosférico (Chandra *et al.*, 2020).

Las enfermedades fúngicas de las plantas son motivo de gran preocupación para la producción agrícola. Se ha estimado que las pérdidas totales alcanzan el 25% del rendimiento en los países occidentales y casi el 50% en los países en desarrollo. De esto, un tercio se debe a infecciones fúngicas (Bower, 1999). *R. solani* (*R. solani* JG Khun) [Teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] es un patógeno importante del suelo con un estilo de vida necrotrófico (Hussain & Khan, 2020; Mayo *et al.*, 2015). No obstante, estudios filogenéticos con secuencias del ADN ribosomal nuclear (ITS y 28S), confirman que *R. solani* es un complejo (González-Hernández, 2002), con más de 100 especies, que causa daños severos a diversos cultivos agrícolas y hortícolas económicamente importantes, así como frutales en todo el mundo (Abbas, Jiang y Fu, 2017; Druzhinina y Kubicek, 2005; Zheng *et al.*, 2013). Tiene un amplio rango de hospedadores y distribución, causa el tizón en maíz (*Zea mays* L.) e incluye aislados uninucleados y binucleados, siendo

estos últimos más virulentos (Zhou *et al.*, 2016) y en el arroz (*Oryza sativa* L.), principalmente con grandes pérdidas en todo el mundo (Zheng *et al.*, 2013).

El uso de agentes de control biológico surge como una necesidad para reducir el uso de productos químicos dañinos al ambiente, dando paso al uso de microorganismos benéficos, los cuales controlan los fitopatógenos y no dañan el ambiente, entre estos se encuentran los géneros bacterianos: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* y de hongos, destacan los estudios de *Trichoderma* (Ezziyyani *et al.*, 2006). Se tienen registros de literatura de bacterias que son capaces de reprimir el desarrollo de ciertos hongos patógenos (Cordon & Haenseler, 1938). Una cepa (F) sobresaliente de *Bacillus subtilis*, inhibió en un rango de 50-100% los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *F. equiseti* y *Alternaria alternata* (Mendez-Úbeta, Flores Hernández, y Paramo-Aguilera, 2017).

El aumento del uso de productos químicos para el control de fitopatógenos se ha intensificado (Centurion Belotto *et al.*, 2013). La implementación de métodos de control alternativo, como sería el uso de agentes de biocontrol, representan una opción ecológica y económica para el manejo de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos.

Bacillus megaterium, es una bacteria formadora de esporas aeróbica, aunque se considera un organismo del suelo, también se puede encontrar en entornos diversos como arrozales, alimentos secos, agua de mar, sedimentos, peces y flora normal e incluso en miel de abeja (Siura & Hiremath, 2019). Se ha señalado que *B. megaterium* produce ácidos orgánicos los cuales tienen la capacidad para solubilizar fosfatos, actúa contra patógenos como *Sclerotium cepivorum* que causa pudrición blanca de la cebolla (Chen *et al.*, 2006). El presente trabajo busca determinar el efecto antagonista de *B. megaterium* como potencial agente de biocontrol contra el fitopatógeno *R. solani* *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio se realizó durante los meses de Marzo-Julio del 2018 en el Laboratorio de Agroecología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Regional Laguna.

Material biológico.

El antagonista, *B. megaterium* fue gentilmente proporcionado por la M.C. Eduvigis Cisneros Valdez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Unidad Gómez Palacio.

El fitopatógeno (*Rhizoctonia solani*), fue aislado de raíces de plantas de tomate, colectadas de la casa sombra No. 5 de la empresa comercializadora Vigo S.A. de C.V. de Torreón, Coahuila, México. Se utilizó agar de papa dextrosa (PDA) para su aislamiento y purificación bajo campana de flujo laminar IIB (Labconco, USA). La caracterización se realizó de acuerdo con las claves de identificación de "Illustrated genera of imperfect fungi" (Barnett y Hunter, 1972). Un aislado puro se conservó en PDA y se sembró para los estudios posteriores. Una vez terminados los ensayos, se esterilizó el material a 121 °C por 30 minutos y los residuos se desecharon para manejo de residuos biológico infecciosos.

Ensayos duales en placa.

Crecimiento en medios de cultivo

Se realizó una curva de crecimiento de *B. megaterium* mediante cultivo en caldo nutritivo y lectura de densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro ultravioleta visible (Velab, Modelo VE-5600UV) (Acuña, Pucci, y Pucci, 2010). De la misma forma, se realizó una regresión lineal de la D.O, contra la cuenta en placa, determinada en unidades logarítmicas, siendo ésta: $Y = 3.6709X + 5.2058$, con coeficiente de regresión $r = 0.984$. Se utilizó una densidad óptica de 1.3 y realizaron diluciones decimales de 10^{-3} - 10^{-5} equivalentes a 9.6×10^4 a 9.3×10^6 UFC mL⁻¹ respectivamente.

Se prepararon los medios de cultivo agar nutritivo (AN) y PDA (Bioxon, México), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se vaciaron cada uno de ellos en cajas Petri de vidrio esterilizadas previamente y se realizó el crecimiento tanto del hongo como la bacteria en ambos medios. Se dejaron tres cajas Petri sin abrir con finalidad doble: controles de crecimiento y prueba de esterilidad del medio de cultivo y dos cajas abiertas de medio durante el proceso de manipulación de muestras como control de esterilidad del área de trabajo.

Se procedió a la siembra en los medios AN y PDA

con los tratamientos; T1 es el medio sin el cultivo del antagonista (*B. megaterium*), T2-T4, se inocularon con las diluciones 10^{-3} - 10^{-5} del antagonista en ambos medios de cultivo. El fitopatógeno se seleccionó de una caja de PDA con cultivo de tres días y desarrollo micelial completo, con un sacabocado de 5 mm se obtuvieron botones del hongo y se colocaron en las cajas Petri por sextuplicado. Se incubaron a 23 °C por 3-5 días.

Ensayo antagónico.

La capacidad de inhibición del crecimiento fúngico por cepas de *Bacillus* sp. fue determinada de acuerdo con Hung & Hoes, 1976. Brevemente, mediante un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo puro del patógeno, se colocó en el centro de la placa de Petri conteniendo PDA o AN. La bacteria se sembró con las diluciones correspondientes en toda la placa y se incubaron a 26 °C hasta 168 h. Se midió el diámetro del crecimiento del fitopatógeno y se comparó con el control (T1), sin antagonista. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula propuesta por Vincent (1947), Citada por (Chakrapani, Shina, Chanu, Chakma, & Siram, 2020), los datos para su procesamiento, fueron transformados a Arcoseno para el análisis de varianza.

$$\% \text{ de Inhibición} = ((DC-DT) / DC) * 100$$

Donde:

DC=Diámetro promedio del crecimiento micelial del control

DT= Diámetro promedio del crecimiento micelial del tratamiento

Análisis de datos.

Los datos fueron analizados de acuerdo a un modelo de efectos fijos y un diseño experimental completamente al azar con dos factores (factor A= Tratamiento antagónico, T2-T4 y factor B= Medios de cultivo, AN y PDA) con seis repeticiones. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de medias Tukey a un nivel de significancia del 0.05. Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico Minitab 17.

Para el ANOVA de dos vías se consideró el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk};$$

para $i=1, 2, 3, 4$; $j= 1, 2$; $K= 1,2 ..6$.

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado del crecimiento micelilar de la K-ésima repetición con el i-ésimo nivel de dilución y el j-ésimo nivel de medio de cultivo.

m = Efecto de la media general

a_i = Efecto fijo del i-ésimo nivel de dilución

b_j = Efecto fijo del j-ésimo nivel de medio de cultivo

$(ab)_{ij}$ = Efecto fijo del i-ésimo nivel de dilución y el j-ésimo nivel de medio de cultivo

e_{ijk} = Efecto del error aleatorio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Como señala Baker (1987), el control de enfermedades causados por fitopatógenos con la presencia de antagonistas es igualmente eficaz y menos costosa que el uso de productos químicos. Es crítico no pasar por alto que estos últimos se han desarrollado durante los últimos cien años por grandes corporaciones, pero el uso de antagonistas lleva tan solo 25 años y su uso ha sido respaldado por intereses comerciales. Del presente estudio se destacan los siguientes resultados

Inhibición en medio de cultivo PDA.

De acuerdo con la Figura 1, se observa claramente que los tratamientos T2 y T3 fueron más efectivos que T4 respecto a la capacidad antagonista que mostró *B. megaterium* utilizando como medio de cultivo PDA. Sin embargo, sus porcentajes de inhibición alcanzaron un máximo aproximado del 38% a 96 h de cultivo, para posteriormente disminuir su capacidad antagonista. El T4 fue inefectivo, debido a la baja concentración de *B. megaterium* presente en el medio.

De acuerdo con los resultados de ANOVA (Cuadro 1), se encontraron diferencias altamente significativas de las 48-72 h entre los medios de cultivo, lo que indica que el medio PDA, tiene influencia sobre los resultados a pesar de que en estudios previos resultados no reportados, la cinética de crecimiento del antagonista es similar tanto en PDA como en AN. Sólomente se encontró diferencia estadística del crecimiento micelial a 48 h de cultivo. Por lo tanto, usar T2 o T3, tiene significado en términos de carga bacteriana.

El análisis de varianza a través del tiempo (Cuadro 1), muestra que existe un efecto del medio de cultivo durante 48 h y 72 h, sin efecto de los tratamientos, sin embargo, a partir de las 96 h, el efecto de tratamiento es significativo ($P < 0.05$) y altamente significativo de las 144-168 h, representando un efecto de acción antagonista prolongado y efectivo sobre el fitopatógeno *R. solani* e

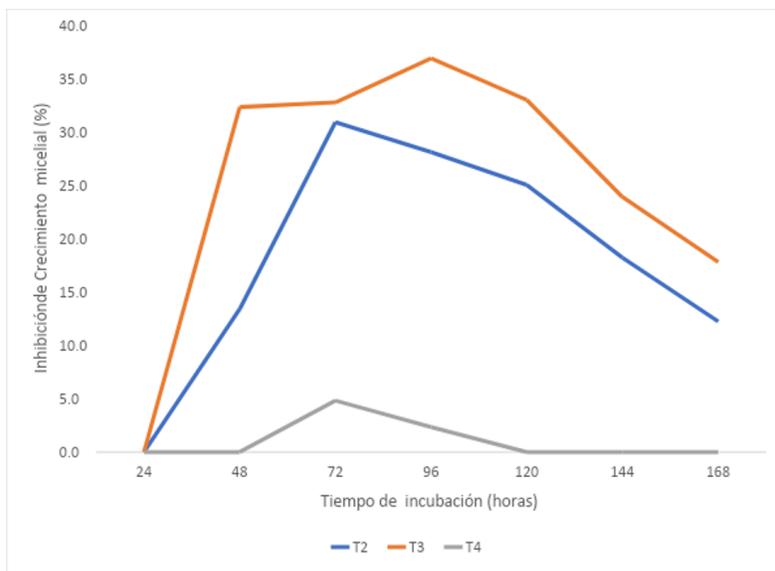


Figura 1. Comportamiento de la acción antagonista de *B. megaterium* en la inhibición del crecimiento microbiano *in vitro* de *R. solani* con los tratamientos (T2-T4), con respecto al testigo (T1), durante 168 h de incubación, utilizando PDA como medio de cultivo.

Cuadro 1. Evolución de la significancia estadística del análisis de varianza para la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* producto del antagonista *B. megaterium* en dos medios de cultivo, con seis repeticiones.

	Tiempo de incubación (horas)					
Fuente	48	72	96	120	144	168
Tratamientos	NS	NS	*	*	**	**
Medios	**	**	NS	**	NS	NS
Repetición	NS	NS	NS	**	**	**

Nivel de significancia probabilístico: * Significativo al 0.05 %; ** altamente Significativo 0.01 %; NS, No Significativo

importante para el desarrollo del cultivo. Por otra parte, en lo que respecta a los medios, donde las repeticiones, pudieran ser un factor que contribuya, para futuros estudios, será pertinente incrementar el número de repeticiones a 10 o de ser posible a 15, a fin de minimizar la variabilidad de datos.

Los análisis de medias, indican diferencia significativas entre los tratamientos, donde a las 72 h de cultivo (Cuadro 2); en PDA, la menor inhibición del hongo fue en T4 con un 4.8% mientras que en T2 y T3, fueron similares con inhibición del 30.9 y 32.7 % respectivamente, destacando que T3 fue diferente después de este tiempo.

Inhibición en medio de cultivo AN.

Como se pueden observar en los resultados de la Figura 2, es evidente que el ensayo *in vitro* empleando este medio de cultivo tuvo un efecto significativo. El T2 tiene un efecto de inhibir el crecimiento micelial del hongo desde las 24 horas, posteriormente lo hacen los tratamientos T3 y T4, evidenciando el efecto de la

concentración microbiana sobre la supresión del micelio. Se puede así mismo observar, que T2 fue eficiente a través del tiempo y se mejora su capacidad de inhibir el crecimiento del micelio. Es por lo tanto importante definir la concentración apropiada del inóculo para el éxito del antagonista.

El ANOVA (Cuadro 1), demuestra la diferencia estadística de los medios de cultivo a partir de las 24-48 h, donde el AN sobresale significativamente ($P < 0.001$), los tratamientos muestran las diferencias a las 96 h ($P < 0.05$), como ya se mencionó resulta de interés por el efecto inhibitorio a través del tiempo.

Como todos sabemos, el AN es un medio general para el crecimiento de bacterias, de igual manera el PDA los es para los hongos en general, lo que pudiera ser una razón de las discrepancias de porqué el hongo creció más en PDA y menos en AN, a pesar de haberse demostrado que *B. megaterium*, crece de manera similar en PDA y AN, asumiendo que, pudiera ser la liberación de sustancias

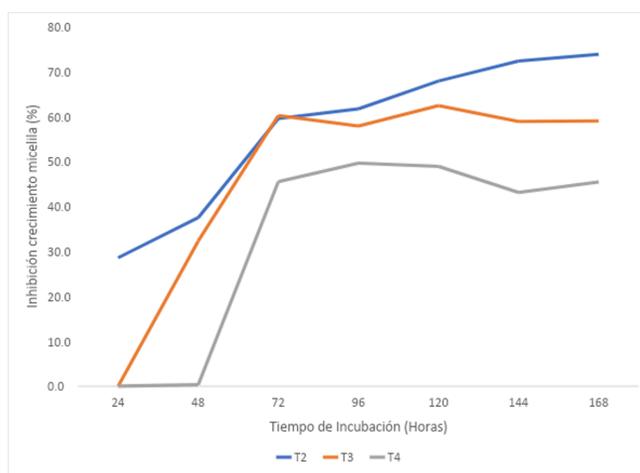


Figura 2. Comportamiento de la acción antagónica de *B. megaterium* en la inhibición del crecimiento microbial *in vitro* de *R. solani* con los tratamientos (T2-T4), con respecto al testigo (T1), durante 168 h de incubación, utilizando AN como medio de cultivo.

in vitro en dos medios de cultivo durante 168 h de cultivo*.

Tiempo (h)							
Tratamientos	24	48	72	96	120	144	168
PDA							
T2	0.0**	13.4 ^b	30.9 ^b	28.1 ^b	25.0 ^b	18.2 ^b	12.2 ^b
T3	0.0	32.3 ^c	32.7 ^b	36.8 ^b	33.0 ^b	23.9 ^b	17.8 ^b
T4	0.0	0.0 ^a	4.8 ^a	2.3 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
AN							
T2	28.6	37.5 ^b	59.6 ^b	61.7 ^b	67.9 ^b	72.4 ^c	73.9 ^c
T3	0.0	32.3 ^b	60.2 ^b	57.9 ^b	62.4 ^b	58.9 ^b	59.0 ^b
T4	0.0	0.3 ^a	45.5 ^a	49.6 ^a	48.9 ^a	43.1 ^a	45.4 ^a

*Columnas que presentan la misma letra no difireren estadísticamente (P=0.05) en el medio de cultivo correspondiente.

por parte del fitopatógeno el que limite el desarrollo del antagonista en el PDA, caso contrario, el AN pudiera tener efecto en el crecimiento, pese a que cuando creció solo el fitopatógeno lo hizo apropiadamente.

Bacillus megaterium, se identificó por primera vez hace más de 100 años y es una curiosidad en el presente, debido a su fisiología y enzimas inusualmente útiles, tiene importancia económica debido a la producción de enzimas comercialmente importantes como la penicilina amidasa, la esteroide deshidrolasa, la amilasa y productos como el ácido hidroxil cítrico (HCA), durante su ciclo de crecimiento (Siura & Hiremath, 2019). Se ha reportado que el metabolito secundario presente en el filtrado de cultivo de la cepa de *B. subtilis* HussainT-AMU, presentó un efecto significativo contra el patógeno *R. solani* y se observó un aumento en el rendimiento de tubérculos de papa y el crecimiento de las plantas. La reducción en la incidencia de la enfermedad fue de hasta el 71% y el 50% en condiciones de maceta y campo, respectivamente (Hussain & Khan, 2020). El presente estudio, alcanzó con *B. megaterium* hasta un 73.9% de inhibición del crecimiento del patógeno bajo condiciones de laboratorio en AN a las 168 h. Por otra parte, Ashwini y Srividya (2014), encontraron que *B. subtilis* suprime el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 en cultivo líquido dual. Así mismo, en un estudio con *Bacillus pumilus* JUBCH08, se encontró un 45% de antagonismo contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Bhattacharya, Das, Samadder, & Rajan, 2016). En nuestro estudio los porcentajes resultaron claramente superiores a

los anteriores, el efecto puede ser probablemente a la acción de la producción de glucanasas, proteasas o quitinasa, así como sideróforos, como se ha demostrado por (Figueroa-López *et al.*, 2016). Dicha actividad ya se ha demostrado que puede causar deformación de e inhibición de las hifas fúngicas (Ashwini and Srividya, 2014). En otro reporte, los resultados concuerdan con los con los nuestros y para *B. megaterium* es factible actua como agente de biocontrol de la pudrición de la corona y raíz de plantas de tomate, ocasionada por *Fusarium oxysporum* (Omar, O`Neill, & Rossall, 2006). En otro estudio en el que se aislaron 42 cepas bacterianas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillum*, las cuales inhibieron el crecimiento de *F. verticillioides* (> 45% de inhibición), destacándose *B. megaterium* (B5), *B. cerus* (B25) y *Bacillus* sp. (B35) con los mejores efectos antagonicos (Figueroa-Lopez *et al.*, 2016).

Es importante el resultado encontrado, dado que el hongo es causante del marchitamiento de la plantulas a nivel de semilleros, por lo tanto, se pudiera utilizar a *B. megaterium* como agente antagonista y reducir las pérdidas económicas en los invernaderos y para diferentes hortalizas. Sin embargo, se requiere de continuar realizando ensayos a nivel de invernadero y demostrar el efecto que se encuentra *in vitro*.

CONCLUSIONES.

La dosis infectiva de *B. megaterium*, utilizada en este trabajo es menor a la aplicada de los estudios de otros modelos, y su concentración fue 9.3×10^6 UFCmL⁻¹, utilizando como inóculo, 100 µL de muestra por placa.

Del presente estudio se destaca que, los tratamientos T2 y T3 fueron superiores en AN, llegando hasta un 73.9 % (T2) con 168 h de incubación, lo que apoyaría a que, *B. megaterium* es un agente de biocontrol potencial contra *R. solani*.

REFERENCIAS.

- Abbas, A., Jiang, D., & Fu, Y. (2017). *Trichoderma* spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 8, 402-411. doi:10.4172/2157-7471.1000402
- Beattie, G. A. (2007). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria* (pp. 1-56). The Netherlands: Springer.
- Berner, H. L. and Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. American Phythopathological Society. St. Paul. USA
- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., & Rajan, S. S. (2016). Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *3 Biotech*, 6(1), 87. doi:10.1007/s13205-016-0406-x
- Bower, P. (1999). Plant disease caused by fungi: phytopathogenicity. In R. P. Oliver & M. Schweizer (Eds.), *Molecular fungi biology* (pp. 294-321). Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Centurion Belotto, S. A., Aquino Jara, A. S., Bozzano Sauier, G. (2013). Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plantulas de tomate. *Investig. Agrar.* 15, 23-29
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernández, V., De La Cruz-Enriquez, J., Castañeda-Antonio, M. D., & Muñoz-Rojas, J. (2020). Importancia de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias benéficas en el biocontrol de fitopatógenos. *Acta Biol. Colomb.*, 25(1), 140-154.
- Chakrapani, K., Shina, B., Chanu, W. T., Chakma, T., & Siram, T. (2020). Assessing in vitro antifungal activity of plant extracts against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice (*Oryza sativa*. L). *J. Pharmacog. Phytochem.*, 9(1), 1497-1501. doi:10.21746/aps.2017.9.2
- Chen, Y. P., Rekhda, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecology*, 34, 33-41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002
- Cordon, T. C., & Haenseler, C. M. (1938). A bacterium antagonistic to *Rhizoctonia solani*. *J. Serie Paper New Jersey Agric. Experim. Station*, 207-2014.
- Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 6B(2), 100-112. doi:10.1631/jzus.2005.B0100
- Ezziyyani, M., Siod Ahmed, A., Pérez Sánchez, C., Requena, M. E., & Candela, M. E. (2006). Control biológico por microorganismos antagonistas. *Revista Horticultura*, 191, 8-15.
- Figueroa-Lopez, A. M., Cordero-Ramirez, J. D., Martinez-Alvarez, J. C., Lopez-Meyer, M., Lizarraga-Sanchez, G. J., Felix-Gastelum, R., . . . Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer plus*, 5, 330. doi:10.1186/s40064-016-1780-x
- Hussain, T., & Khan, A. A. (2020). *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its antifungal activity against potato black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. *Biocatalysis Agricultural Biotechnol.*, 23, 101443. doi:10.1016/j.bcab.2019.101443
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., & Casquero, P. A. (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Front Plant Sci*, 6, 685. doi:10.3389/fpls.2015.00685
- Mendez-Úbeta, J., Flores Hernández, M., & Paramo-Aguilera, L. (2017). Aislamiento e identiifcación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo *in vitro* frente a hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96-100. doi:10.5377/nexo.v30i2.5530
- Omar, I., O'Neill, T. M., & Rossall, S. (2006). Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology*, 55, 92-99. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01315.x

- Siura, N. K., & Hiremath, L. (2019). Isolation of *Bacillus megaterium* and its commercial Importance. *Int. J. Chem Tech Res.*, 12(4), 30-36. doi:10.20902/IJCTR.2019.120405
- Zheng, A., Lin, R., Zhang, D., Qin, P., Xu, L., Ai, P., . . . Li, P. (2013). The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat Commun*, 4, 1424. doi:10.1038/ncomms2427
- Zhou, S., Liu, Y., Zhang, M., Li, B., Chen, X., & Liang, W. (2016). Comparison of the virulence and cognate virulence factors of multinucleate, binucleate and uninucleate *Rhizoctonia* isolates, causing sheath blight on maize plants. *Eur. J. Plant Pathol.*, 145, 501-506. doi:10.1007/s10658-015-0855-9

Actividad proteolítica de *Alternaria* spp. obtenidos en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, México.

(Proteolytic activity of *Alternaria* spp. isolates obtained from the Metropolitan Area of Toluca Valley, México.)

^{1,3}Mejía-Gochéz Amalinalli Guadalupe, ²Moreno Alcántara Jaime, ²Díaz Godoy Raúl Venancio, ^{1*}Castellanos-Moguel Judith.

¹Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Laboratorio de Micología, CDMX, México. Calz. Del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacan, CDMX. C.P. 04960.

²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México Toluca-La Marquesa s/n, Ocoyoacac, Estado de México. C.P. 52750

³Maestría en Ciencias Agropecuarias, Departamento Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacan, CDMX. C.P. 04960.

*E-mail correspondencia: mjmoguel@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Alternaria ha sido reportado como un patógeno oportunista en sujetos inmunodeprimidos, con trasplantes o sanos, así como causante de alergias, enfermedades respiratorias y padecimientos de la piel. Este hongo no presenta dimorfismo, y sus mecanismos de infección mediados por enzimas en mamíferos han sido poco estudiados. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad proteolítica de *Alternaria* en un medio sólido como un indicador de patogenicidad. Se obtuvieron muestras ambientales de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca en la fracción de PM_{2.5}; de las cuales, se aisló y purificó *Alternaria* bajo el método de transferencia repetida; para hacer la evaluación de la actividad proteolítica se utilizó un medio con caseína como inductor, y se calculó el índice Enzimático para establecer una comparación entre aislados. Asimismo, se utilizó el análisis de correlación de Pearson entre la cantidad de propágulos (esporas o fragmentos de hifas que germinaron y produjeron colonias) con parámetros ambientales, identificando el grado de asociación entre ambos. Se obtuvieron diversos géneros cosmopolitas y se purificaron 33 aislados del género *Alternaria*, que mostraron en primavera una correlación positiva con dirección del viento y en verano con humedad relativa. De acuerdo con su capacidad proteolítica, se determinó que los aislados mostraron diferencias significativas; siendo los de mayor actividad los aislados 10, el 13 y el 25. Los resultados obtenidos sugieren que los aislados de *Alternaria* de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, cuentan con proteasas que les permitirían penetrar hospedantes susceptibles.

Palabras Clave: *Alternaria*, PM_{2.5}, bioaerosoles, proteólisis.

ABSTRACT

Alternaria has been reported as an opportunistic pathogen in immunosuppressed, transplanted, or healthy subjects, as well as a cause of allergies, respiratory diseases and skin conditions. This fungus does not present dimorphism, and its mechanisms of infection mediated by enzymes in mammals have been little studied. The objective of the present work was to determine the proteolytic capacity of *Alternaria* in a solid medium as an indicator of pathogenicity. Environmental samples were obtained from the Metropolitan Area of the Valley of Toluca in the fraction of PM_{2.5}; of which, *Alternaria* was isolated and purified under the repeated transfer method in order to evaluate the proteolytic activity, a medium with casein as an inducer was used, and the Enzyme index was calculated to establish a comparison between isolates. Likewise, Pearson's correlation analysis was used between the number of propagules (spores or hyphal fragments that germinated and produced colonies) with environmental parameters, identifying the degree of association between both. Various cosmopolitan genera were obtained and 33 isolates of the genus *Alternaria* were purified, which showed a positive correlation with wind direction in spring and with relative humidity in summer. According to their proteolytic capacity, it was determined that the isolates showed significant differences; the most active ones being isolates 10, 13 and 25. The results obtained suggest that the *Alternaria* isolates from the

Metropolitan Area of the Toluca Valley have proteases that would allow them to penetrate susceptible hosts.

Keywords: *Alternaria*, PM_{2.5}, bioaerosols, proteolysis.

INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es una alteración de la composición física, biológica y química del aire. Entre los constituyentes que se hallan en la misma, se encuentra material particulado PM_{2.5}, que son partículas con diámetro aerodinámico menor o igual a 2.5 µm y PM₁₀, partículas con diámetro aerodinámico menores o iguales a 10 µm y mayores a 2.5 µm, el cual comprende a los Bioaerosoles, partículas de origen biológico, en los que se pueden encontrar bacterias, virus, hongos, polen y en general cualquier resto de microorganismos (Janssen *et al.*, 2021; Caballero-Segura *et al.*, 2005). Las partículas que se encuentran en el tamaño de 2.5 µm tienen la capacidad de causar diversas enfermedades e incluso la muerte (Imran Burhan y Alí, 2021; Andersen *et al.*, 2012).

El tamaño de las partículas es muy importante porque de él depende la facilidad para ingresar al hospedero. Las partículas mayores a 10 µm se depositan en las fosas nasales y la garganta, mientras que a las menores a 10 µm se les conoce como fracción torácica o inhalable y pueden llegar a penetrar hasta el tracto respiratorio; en cuanto a las partículas finas de 2.5 µm, tienen la posibilidad de llegar hasta los bronquiolos y alvéolos, con la posibilidad de incorporarse al torrente sanguíneo y ocasionar daños a la salud (SEDEMA, 2014).

Entre esas partículas que oscilan entre 10 y 2.5 µm se encuentran las esporas de diversas especies de hongos, que están frecuentemente en el ambiente, capaces de afectar vegetales, animales, habitar en el suelo y permanecer por largos periodos en el aire, tal es el caso de *Bipolaris*, *Curvularia*, *Ulocladium*, *Cladosporium* y *Alternaria* (Srinivasan *et al.*, 2020; Silva-Barreto *et al.*, 2011). Estos dos últimos géneros con gran importancia para la salud debido a sus concentraciones en aire y su potencial alérgeno (González-Díaz *et al.*, 2016; Grinn-Gofrón y Rapiejko, 2009). *Alternaria* es un ascomiceto perteneciente a la familia Pleosporaceae y su impacto se debe a sus características como fitopatógeno, que coloniza todos los estadios de las plantas susceptibles; sin embargo, en los últimos años las afecciones en mamíferos causadas por este hongo se han hecho más frecuentes, afectando incluso a humanos, debido a

su capacidad para adaptarse a diversos ambientes y sustratos.

Las primeras menciones de las afectaciones de *Alternaria* en patología humana de acuerdo con la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica datan de 1929 en las que Montpellier *et al.*, lograron aislarlo de un nódulo granulomatoso subcutáneo en el pie de un niño argelino. Henrici *et al.*, (1947) lo recuperaron de una lesión en la piel y sugirieron que podría ser causa de lesiones supurativas benignas en humanos. *Alternaria* ha sido reconocido como agente causal de feohifomicosis (Chhonkar *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2011; Ramos-e-Silva *et al.*, 2010) afectando a sujetos con VIH, inmunodeprimidos, con trasplantes, rinitis y otras enfermedades respiratorias (Percopo *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2016; Konidiaris *et al.*, 2013; Shakurnia *et al.*, 2013; Fuiano y Fusilli, 2012). También se ha reportado en casos de rinoconjuntivitis (Ma *et al.*, 2018; Vacher *et al.*, 2015; Mimura *et al.*, 2014) y en personas sensibles a la presencia del hongo (Chakraborty *et al.*, 2014), por su potencial alérgeno (Chul-Park *et al.*, 2019; Grinn-Gofrón y Rapiejko, 2009).

En los últimos años, *Alternaria* ha sido aislado de pacientes con onicomycosis, queratomicosis con traumatismos corneales o quirúrgicos y feohifomicosis subcutánea por traumatismos causados por espinas, astillas, ramas o agujas (Iturrieta-González, 2019; Hu *et al.*, 2015; Srinivasan *et al.*, 2004) e incluso de individuos con COVID-19 (Khatiwada y Subedi, 2020; Hosseini *et al.*, 2020b; Xiang *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2021; Vilela de Oliveira *et al.*, 2021). Ineludiblemente el impacto de los bioaerosoles en la vida actual ha sido desafortunado, afectando en gran medida al personal responsable de las áreas medico sanitarias, así como a las poblaciones más vulnerables. Por ello, resulta indispensable estudiar e investigar las rutas de acción y propagación de estos microorganismos.

Si bien, debido a la pandemia se ha visibilizado la posible vulnerabilidad del sistema sanitario, así como la facilidad con la que se puede dañar algún eslabón del sector salud, nos amplía el panorama para evitar escenarios con infecciones ocasionadas por microorganismos oportunistas. En este momento se conoce que el patrón de la enfermedad durante la pandemia está vinculado a la presencia de bacterias y hongos que en algunos casos desencadenan cuadros infecciosos severos (Hosseini *et al.*, 2020b). Salehi *et*

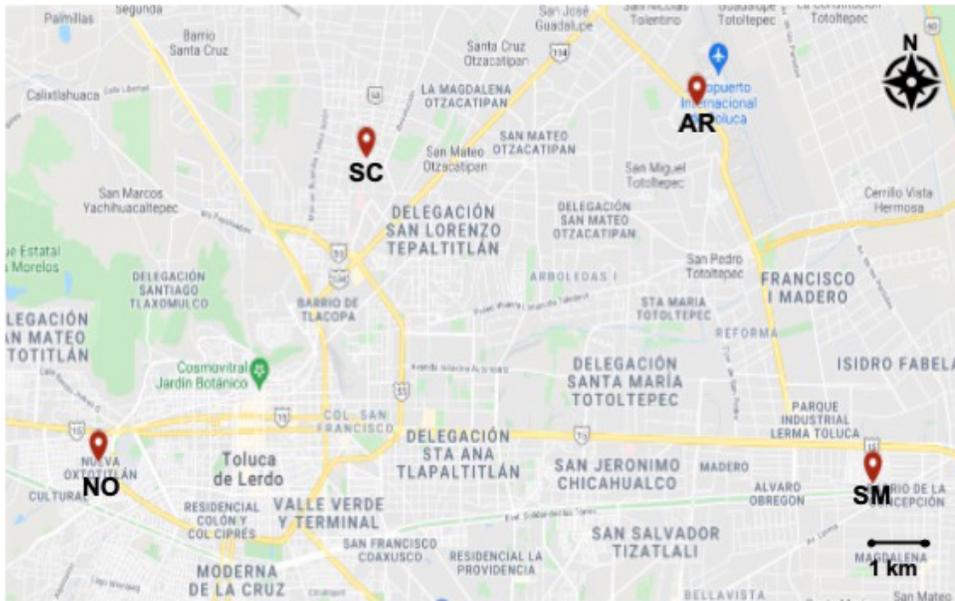


Figura 1. Sitios de muestreo en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. Cada punto corresponde a una estación de muestreo: San Mateo Atenco, Aeropuerto, San Cristóbal Huichochitlán y Oxtotitlán.

al., 2020 y Chowdhary *et al.*, 2020, mencionan la presencia de hongos en las zonas orofaríngeas, pulmonares, intestinales, nasales, oculares y en torrente sanguíneo, en muchos de estos casos clínicos se encuentra documentada la presencia del género *Alternaria* (Khatiwada y Subedi, 2020; Hosseini *et al.*, 2020^a; Xiang *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2021; Vilela de Oliveira *et al.*, 2021).

Pocos estudios han considerado a *Alternaria* como poseedor de un sistema proteolítico que podría servir como parte del mecanismo de patogenicidad en mamíferos. *Alternaria* es un saprobio, mientras que los patógenos verdaderos son dimórficos cuando infectan animales, ya que forman blastosporas una vez que penetraron en el hospedante, entre otras estrategias de infección. Mientras que la fase micelial, se caracteriza porque el hongo presenta abundantes hifas generalmente con gran cantidad de esporas o conidios que facilitan la adherencia y penetración del huésped (Shin *et al.*, 2020; Clínica Universidad de Navarra, 2013). Aun no se sabe con precisión cuáles son los mecanismos que posee, pero *Alternaria* puede parasitar reptiles y mamíferos, incluyendo humanos; de ahí que sea necesario el estudio de las proteasas, ya que hasta el momento, no se ha demostrado si podrían jugar un papel importante dentro del proceso de infección del hongo (Wu *et al.*, 2020; Lopez-Llorca *et al.*, 2002), teniendo presente que la penetración de cada grupo de microorganismos está determinada

por propiedades intrínsecas como patogenicidad, virulencia, dosis infectiva, capacidad de propagación y barreras biológicas (Mejía-Góchez, 2020).

MATERIAL Y MÉTODO

Muestreo

Los aislados de *Alternaria* utilizados en éste estudio se obtuvieron de la atmósfera de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. El material biológico se colectó en cuatro estaciones de monitoreo (Figura 1), ubicados en San Mateo Atenco (19° 16' 49.5" N, 99° 32' 30.0" W, Av. Hacienda de Tres Marías No. 260, Col. Santa Elena, (dentro de las instalaciones del tanque elevado de OPDAPAS) C.P. 52100, San Mateo Atenco, Méx.), Aeropuerto (19° 20' 4.41" N, 99° 34' 26.3" W, Calle Enequino Arevalo Alanis s/n, esq. Boulevard Miguel Alemán, Parque Industrial Exportec II, San Pedro Totoltepec, (dentro de las instalaciones del Centro Nacional de Capacitación y Adiestramiento de la Cruz Roja Mexicana), C.P.54080, Toluca, Méx.), San Cristóbal Huichochitlán (19° 19' 38.0" N, 99° 38' 3.44" W, Calle Paseo de la Luz s/n esq. Manuel Hinojosa Giles, San Cristóbal Huichochitlán, (dentro de la Escuela Primaria "Manuel Hinojosa Giles"), C.P. 50100, Toluca, Méx.) y Oxtotitlán (19° 17' 0.40" N, 99° 41' 0.56" O, Calle Lago Caimanero No. 500 esq. Laguna de la Asunción, Col. Nueva Oxtotitlán, (dentro de la Escuela Primaria "Carmen Serdán"), C.P. 50100, Toluca, Méx.) pertenecientes a la Red

Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (RAMAT). Los muestreos se realizaron cada quince días, de abril de 2014 a enero de 2015, siendo parte de la primera fase del proyecto “Estudio de microcontaminantes atmosféricos como factores de riesgo a la Salud de la Población”, financiado por SEP-CONACYT, con número 256751, mismo que concluirá en el 2022.

Para la obtención de colonias fúngicas, se utilizaron dos métodos (Figura 2):

1.- Impactación directa en cajas Petri, con agar rosa Bengala adicionado con ciprofloxacino (500 mg/L) colocados en la parte superior de la caseta de la estación de monitoreo (aproximadamente 2.5 m del nivel de la calle.). Las cajas Petri se expusieron durante 30 min y se incubaron a 28°C, durante 3 a 5 días para obtener unidades formadoras de colonias fúngicas presentes en los sitios de estudio.

2.- Toma de filtros, se utilizaron muestreadores de tipo activo y medio volumen (TCR-TECORA) para colectar la fracción de PM_{2.5} con filtros de teflón de 47 mm de diámetro. Los aparatos se programaron para que muestrearan durante 24 h de manera simultánea, transcurrido el tiempo los filtros se trasladaron al laboratorio en condiciones para material biológico (material contenedor estéril y en cadena de frío) y se sometieron a seis lavados acumulativos con 1 mL de Tween 80 al 0.05%. La suspensión resultante se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min, obtenida la pastilla, el concentrado se resuspendió nuevamente en 1 mL de Tween 80 y se depositaron 100µL en cajas Petri con agar rosa Bengala adicionado con ciprofloxacino (500 mg/L). Estas se incubaron a 28°C de 3 a 5 días.

Parámetros meteorológicos

Estos fueron obtenidos de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (RAMAT), se consideró el promedio diario para temperatura del ambiente, humedad relativa y dirección del viento de los días en que se tomaron las muestras de PM_{2.5} en cada una de las estaciones de este estudio.

Identificación macro y micromorfológica

De los aislados obtenidos por impactación directa y de los filtros, las colonias presentes se identificaron

a nivel de género, tomando en cuenta su macro y micromorfología. La identificación se llevo a cabo utilizando las claves taxonómicas de Watanabe, 2002; Barnett y Hunter, 1998; Barron, 1968. La ubicación taxonómica de los géneros encontrados, se realizó con la base de datos MycoBank (International Mycological Association, 2016), basada en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN). Para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se utilizó un contador de colonias tipo Quebec (Sol-Bat México) y la información se registró en una base de datos por estación de monitoreo, época anual y fecha de muestreo.

Aislamiento y purificación de *Alternaria* en agar papa dextrosa

Para la purificación de los aislados de *Alternaria* se utilizó agar papa **dextrosa** (PDA) a una proporción en g/L: agar 15, dextrosa 20, papa natural 300; favoreciendo así la esporulación y la producción de pigmentos característicos de algunos dermatofitos (Leslie y Summerell, 2006; Frank *et al.*, 1993). El aislamiento se realizó por transferencia repetida (Cañedo y Ames, 2004).

Determinación de actividad proteolítica

La determinación se realizó en un medio de amortiguador de fosfatos con leche descremada Svelty® (Nestlé, México) como sustrato e inductor ya que posee prácticamente todos los aminoácidos (en g/L: leche descremada 20, agar 16, fosfato monobásico de sodio 27.8 y fosfato dibásico de sodio 71.7) (Bonifaz-Trujillo, 2012). Para este procedimiento, se hizo un pozo de 0.4 cm en el centro de cada caja de Petri con el medio con inductor y se colocó una suspensión de conidios de cada aislado a probar, ajustada a 1×10^4 . Se trabajó con tres lotes experimentales con 9 réplicas cada uno, los cuales fueron sembrados en días diferentes, todos los ensayos se incubaron a 28 °C. Se midió el crecimiento radial de las colonias y el diámetro de los halos de proteólisis cada 24 h hasta las 72 h, debido a que son consideradas como las horas críticas en las que el patógeno logra penetrar en el huésped.

Los halos de degradación de los aislados fueron medidos utilizando la metodología de Pedroza *et al.*, 2001 y Cruz-Ramírez *et al.*, 2012 modificadas, brevemente, el diámetro mayor y menor del halo así como de la colonia, se midieron. Los halos se consideraron como una señal de que el hongo está expresando enzimas extracelulares

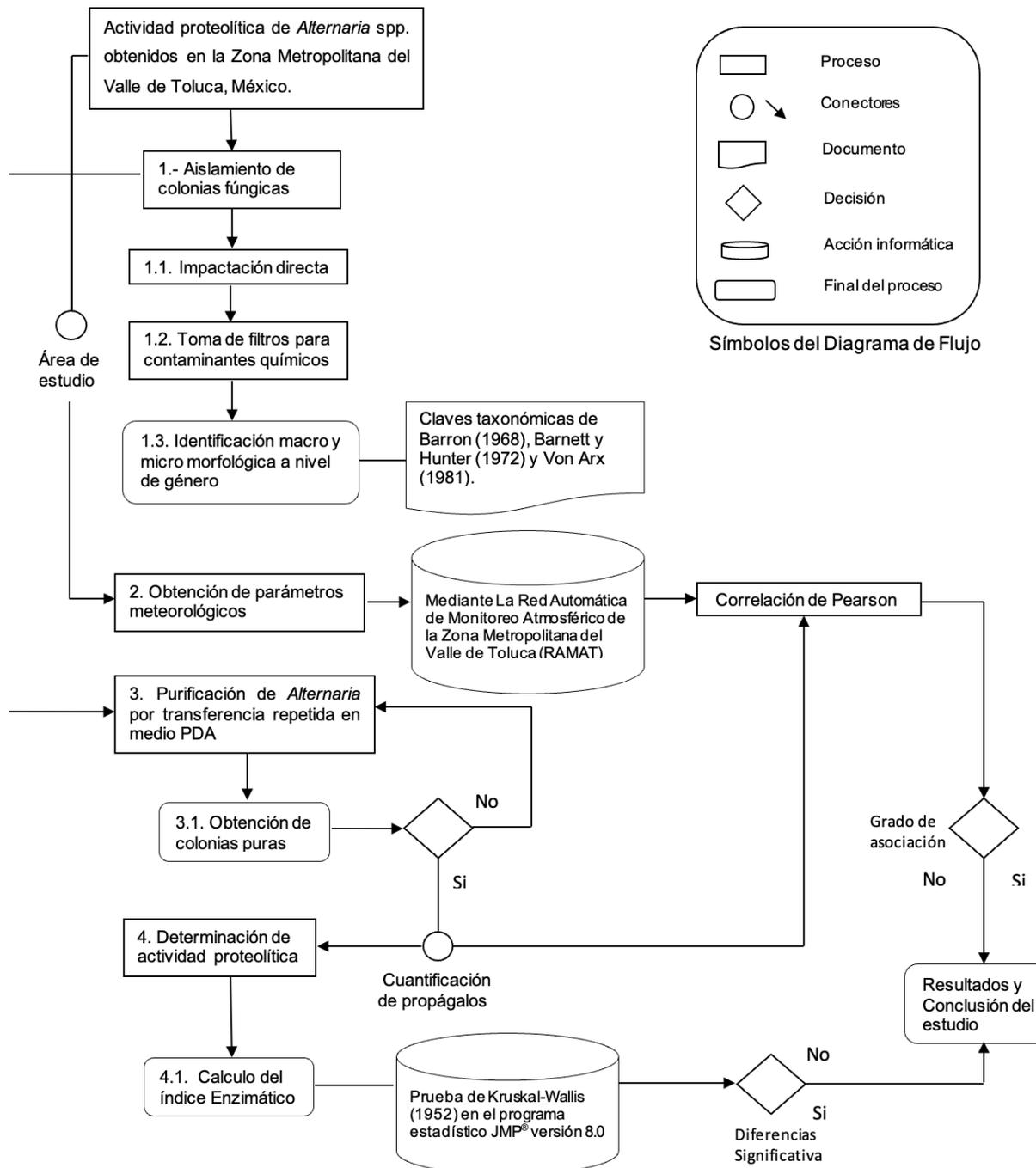
al utilizar la leche descremada. Posteriormente, se determinó el índice Enzimático (IE= $\frac{\text{halo}}{\text{diámetro de la colonia}}$), para establecer una comparación entre aislados. Las proteasas asociadas a un patógeno solo pueden ser definidas bajo un contexto dependiente de las condiciones para la viabilidad del mismo, por lo que el crecimiento de los aislados en medio de cultivo, fue primordial para el estudio.

Análisis estadísticos

Se realizó una prueba de correlación de Pearson entre la presencia de *Alternaria* y los parámetros ambientales,

temperatura del ambiente, humedad relativa, dirección y velocidad del viento con la finalidad de evaluar el grado de asociación entre las variables.

Para el análisis de los datos obtenidos del crecimiento de las colonias y sus halos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis (1952) utilizando el programa estadístico JMP® versión 8.0 (SAS Institute Inc., 1989-2019), con el fin de esclarecer diferencias estadísticas significativas entre el índice enzimático de los aislados de *Alternaria*.



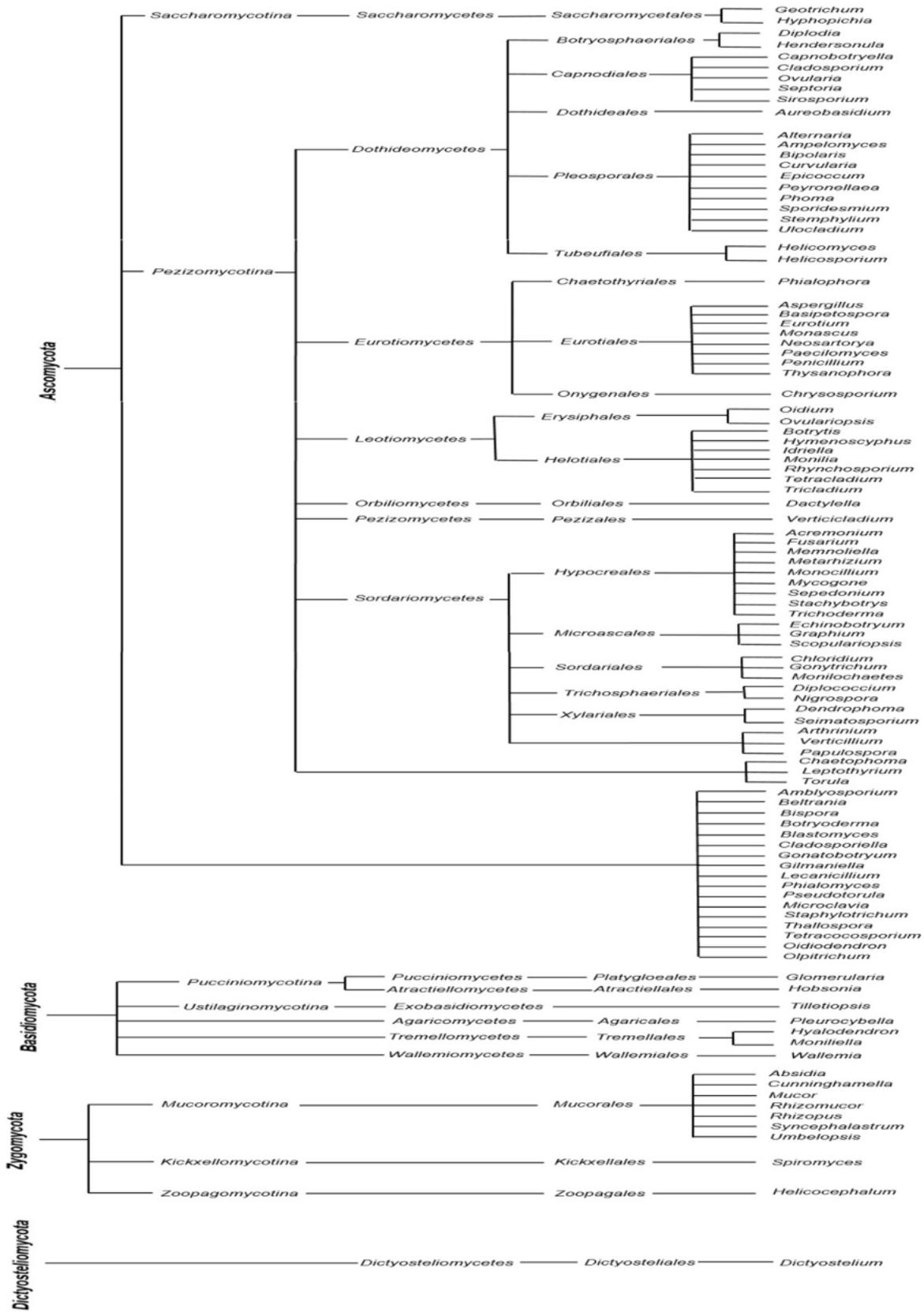


Figura 3. Clasificación taxonómica de géneros fúngicos encontrados en el Valle de Toluca

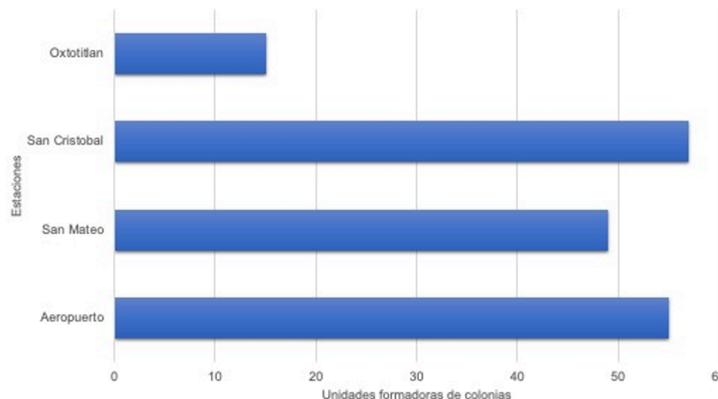


Figura 4. Número de unidades formadoras de colonias de *Alternaria* en las diferentes estaciones de muestreo.

RESULTADOS

Géneros encontrados en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca

Las muestras obtenidas por ambos métodos (impactación y filtros) provenientes de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca mostraron diversos géneros fúngicos, obteniendo la mayor cantidad por impactación, durante el muestreo que comprendió tres de las cuatro estaciones anuales (primavera, verano y otoño). A pesar del gran número de géneros fúngicos encontrados durante el estudio, los muestreos no. 1 (24 de abril), no. 10 (29 de agosto) y no. 16 (5 de noviembre) no registraron presencia de colonias fúngicas, obteniendo al final 18 muestreos, en los que se encontraron 102 géneros fúngicos (Figura 3). Los más abundantes fueron *Aspergillus* (24%), *Penicillium* (18%), *Cladosporium* (15%), *Fusarium* (9%) y *Alternaria*

(4%); equivalentes al 70% de la abundancia total, mientras que los géneros restantes representaron el 30%. Respecto a los sitios de monitoreo, *Alternaria* estuvo presente en las cuatro estaciones de muestreo durante todo el año, se registró un total de 176 UFC/año, de las cuales un 33% se encontró en la estación de San Cristóbal, el 31% en Aeropuerto, el 28% en San Mateo y el 8% restante, se concentró en Oxtotitlán (Figura 4).

Correlación entre *Alternaria* y los parámetros ambientales

Los parámetros humedad relativa y velocidad del viento mostraron tener mayor relación con la presencia de *Alternaria* en las estaciones pero en diferente época del año. En primavera, *Alternaria* tuvo una relación positiva con el parámetro dirección del viento, con una $r=0.8$ y una $r^2=0.6$, mientras que en los otros parámetros ambientales

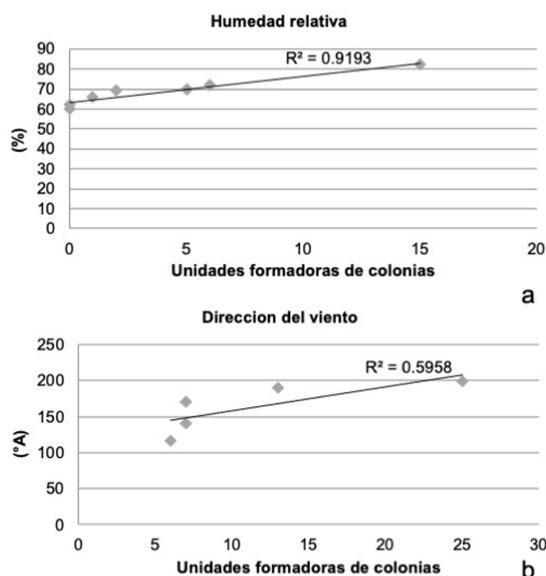


Figura 5. Relación de la cantidad de conidios de *Alternaria* y parámetros ambientales a) Dirección del viento y b) humedad relativa.

Tabla 1. Índice Enzimático de los 33 aislados de *Alternaria*, durante las primeras 24, 48 y 72 horas de cultivo en medio adicionado con leche descremada.

Cepa	24 horas	48 horas	72 horas	Promedio
1	1.3	1.3	1	1.2 ^a
2	1.3	1.3	1	1.2 ^a
3	1.3	1.3	1.1	1.23 ^a
4	1.6	0.9	0.9	1.13 ^a
5	1.5	1.1	1.3	1.3 ^a
6	1.5	1	1	1.16 ^a
7	1.2	1.2	1	1.13 ^a
8	1.5	1.5	1.1	1.36 ^a
9	1.3	1.3	1.1	1.23 ^a
10	1.6	1	1	1.2 ^{abc}
11	1.6	1.2	1.3	1.36 ^b
12	1.9	1a	1a	1.3 ^a
13	1.6	1.2	1.2	1.33 ^{ab}
14	1.2	1.1	1.1	1.13 ^a
15	1.3	1.2	1.2	1.23 ^a
16	1.5	1.2	1.2	1.3 ^a
17	1.2	1	1	1.06 ^a
18	1	1	1.1	1.03 ^a
19	1.5	1.2	1	1.23 ^a
20	1.1	1	1	1.03 ^a
21	1.4	1.1	1.1	1.2 ^a
22	1.5	0.6	1	1.03 ^a
23	1.4	1	0.9	1.1 ^a
24	1.6	1	1	1.2 ^a
25	1.7	1	1.6	1.43 ^a
26	1	1	1	1 ^a
27	1	1	1	1 ^a
28	1.2	1	1	1.06 ^a
29	1.2	1.1	1.1	1.13 ^a
30	1.2	1	1	1.06 ^a
31	1.2	1.2	1.1	1.16 ^a
32	1.3	1.1	1	1.13 ^a
33	1.2	1.2	1.1	1.16 ^a

Los valores presentados son promedios de tres lotes de 9 unidades experimentales cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

su relación fue negativa. En verano, *Alternaria* mostró tener una relación positiva con humedad relativa con una $r=0.9$ y una $r^2=0.9$, en relación con los demás parámetros ambientales, estos mostraron una relación negativa. Finalmente en otoño, *Alternaria* no mostró relación significativa con los parámetros de interés (Figura 5).

Actividad proteolítica

A partir de los 18 muestreos, se obtuvieron 178 aislados de *Alternaria* de los cuales solamente se lograron purificar 33 en PDA (25 obtenidas por impactación directa y ocho en los filtros de teflón) por el método de transferencia repetida; una vez obtenido el cultivo puro, los aislados fueron utilizados para la determinación de la proteólisis. En general a las primeras 24 h se apreció la formación de un halo pequeño así como la aparición de diminutas manchas oscuras características de las

colonias de *Alternaria*; lo que indicó la germinación de los conidios; para este día los halos midieron a entre 0.8 a 1cm de diámetro y las colonias entre 0.6 y 0.8 cm de diámetro. A las 48 h se observó un halo más diferenciado y el crecimiento de la colonia mostró un aumento, para este segundo día los halos midieron entre 1.1 a 2 cm de diámetro y las colonias entre 0.8 y 2.5 cm de diámetro. Finalmente, a las 72 h el incremento de los halos y de las colonias fue notorio; para el tercer día los halos midieron entre 2.1 y 3.1cm de diámetro, mientras que las colonias entre 0.8 y 2.8 cm de diámetro (Tabla 1).

Los valores presentados son promedios de tres lotes de 9 unidades experimentales cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

Con relación a los datos obtenidos del Índice Enzimático se encontraron diferencias significativas entre la capacidad enzimática de los 33 aislados $p < 0.0001$. Se realizó también la comparación múltiple de pares Tukey-Kramer; donde nuevamente aparecieron diferencias significativas y se delimitaron de tres grupos (A, AB y ABC).

El aislado no.25 fue el que presentó el promedio más alto en capacidad proteolítica (Grupo A; IE: 1.43). Mientras que los aislados No.10 (Grupo ABC; IE: 1.20) y No.13 (Grupo AB; IE: 1.33) mostraron una capacidad enzimática similar. Los de menor actividad fueron la 18, 20, 26 y 27 con un IE: 1 (Tabla 1).

DISCUSIÓN

La Zona Metropolitana del Valle de Toluca ha presentado una modificación en sus actividades económicas en los últimos años, ya que pasó de ser una economía sustentable rural a una industrial y de servicios, trayendo como consecuencia el incremento de partículas dañinas en el aire, aumentando las emisiones a la atmósfera y la contaminación. Los géneros más abundantes encontrados durante toda la campaña de los 18 muestreos fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Alternaria*; son considerados cosmopolitas y de gran abundancia en todo el mundo (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2019; Sánchez-Espinosa y Almaguer-Chávez, 2014; Almaguer y Rojas-Flores, 2013; Sharma *et al.*, 2011), lo que se confirmó al obtener el 71% del total de registros durante el muestreo realizado en 2014-2015 en la primera fase del estudio en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca.

Asimismo, la presencia de estos géneros puede estar vinculada con enfermedades respiratorias, alergias, asma, conjuntivitis y diversos padecimientos de la piel o respiratorios (Imran-Bukhary y Ali, 2021; González-Díaz, 2016; Castellanos-Moguel *et al.*, 2013). Frecuentemente los casos de asma alérgica son de etiología fúngica, dominados principalmente por géneros como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*. La Sociedad de Alergología e Inmunología Clínica de España, menciona que los síntomas alérgicos más comunes son rinoconjuntivitis con 55.5% y asma 28%, siendo la causa principal el polen, epitelios de animales y esporas de hongos (Tsitsi-Pfavayi *et al.*, 2021; Rendueles, 2015).

En este estudio, *Alternaria* mostró estar relacionado positivamente con los parámetros dirección del viento ($r = 0.8$) y humedad relativa ($r = 0.9$), durante el periodo de primavera y verano lo que pudo favorecer a este género en dichas épocas del año. Hosseini *et al.*, (2020a) encontraron que la lluvia beneficia la liberación de esporas, pudiendo explicar la relación entre las condiciones ambientales de verano y la humedad relativa, mientras que las condiciones ambientales para primavera y la relación con la dirección del viento, podrían estar ligadas a las corrientes de aire predominantes en el Valle de Toluca que van del Sureste al Oeste durante todo el año, favoreciendo la dispersión de contaminantes (Gobierno del Estado de México, 2005).

En cuanto a las pruebas de capacidad proteolítica, *Alternaria* mostró tener efecto de tratamiento, tanto estadísticamente como por aspecto del halo. Existe mucha documentación acerca de la patogenicidad de *Alternaria* y sus alteraciones en plantas, así como el registro de innumerables casos clínicos de afecciones ocasionados a humanos y algunos animales (Iturrieta-González *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Chakaraborty *et al.*, 2014; Sečniková *et al.*, 2014; Shakurnia *et al.*, 2013; Konidiaris *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2011); sobre todo en organismos inmunodeprimidos o vulnerables (Khatiwada y Subedi, 2020; Hosseini *et al.*, 2020b; Xiang *et al.*, 2020; Soltani *et al.*, 2021; Vilela de Oliveira *et al.*, 2021). La información disponible solo se remite al registro de los casos, por lo que hay muy poca documentación conocida o estudiada de las enzimas asociadas, mecanismos de acción y protocolos para su estandarización. Saprófitos comunes como *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Curvularia* y *Alternaria* poseen actividades

enzimáticas complejas que les permiten utilizar la queratina, principal componente del estrato córneo de la piel, así como de uñas y cabello (Daines *et al.*, 2020; Gugnani, 2000) representando un riesgo inminente en la situación actual de alerta mundial (Soltani *et al.*, 2021; Vilela de Oliveira *et al.*, 2021; Khatiwada y Subedi, 2020; Hosseini *et al.*, 2020b; Xiang *et al.*, 2020).

En el marco de lo planteado en el estudio, la prevalencia de *Alternaria* fue observada durante todo el periodo de muestreo y las concentraciones de conidios en el ambiente mostraron ser suficientes para aislarlo y purificarlo, incluso a partir de los filtros para PM_{2.5} en los que según la literatura, no sería común encontrarlos por su tamaño (Velázquez, 2020).

CONCLUSIONES

En este estudio se detectó gran cantidad de géneros fúngicos en la atmósfera de la ZMVT, siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Alternaria* los más abundantes durante las épocas del año muestreadas. *Alternaria* estuvo presente durante tres de las estaciones del año y las cantidades de conidios obtenidos de la atmósfera, mostraron ser suficientes para aislarlo y purificarlo, incluso a partir de filtros para PM_{2.5}. Respecto a los parámetros meteorológicos, la humedad relativa y la dirección del viento mostraron tener relación con el incremento de *Alternaria*, favoreciendo su supervivencia y desarrollo.

El género *Alternaria* realiza procesos de hidrólisis de proteínas en medio sólido, por lo que se considera que los aislados de la ZMVT cuentan con el sistema proteolítico que les permitiría penetrar hospedantes animales susceptibles incluyendo al ser humano. El presente estudio abre la oportunidad a proyectos enfocados a los mecanismos de acción de algunos saprobios, tomando en cuenta las implicaciones que propiciarían la dispersión de estos microorganismos en un momento tan crucial en la salud mundial.

Agradecimientos

Amalinalli Guadalupe Mejía Góchez agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar la Maestría en Ciencias Agropecuarias en la UAM-X. Este trabajo es parte del proyecto

Estudio de microcontaminantes atmosféricos como factores de riesgo a la Salud de la Población, financiado por SEP-CONACYT, con número 256751.

REFERENCIAS

- Almaguer, M., T.I. Rojas-Flores, 2013. Airborne culturable fungi of the atmosphere of Havana, Cuba. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* 20: 35-45.
- Andersen, Z.J., K. Bønnelykke, M. Hvidberg, S.S. Jensen, M. Ketzel, S. Loft, M. Sørensen, A. Tjønneland, K. Overvad, O. Raaschou-Nielsen, 2012. Long-term exposure to air pollution and asthma hospitalizations in older adults: a cohort study. *Thorax* 67: 6-11. Doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200711.
- Barnett, H. L., B. B. Hunter, 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4 ed. Mc Millan, New York. Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Barron, G.L., 1968. *The genera of Hyphomycetes from soil*. Robert Krieger Publish. Co. Florida.
- Bonifaz-Trujillo, J.A., 2012. *Micología médica básica*. Mc Graw Hill, 4 ed, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Blackwell, M., 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species. *American Journal of Botany* 98: 426-438.
- Caballero-Segura, B., E.T. Romero-Guzmán, L.R. Reyes-Gutiérrez, M. José-Yacaman., 2005. Bioaerosoles transportados por agua de lluvia en el valle de Toluca caracterizados por microscopia electrónica de barrido. COMECyT, EdoMex-CO1-09. Disponible en: <http://inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/CN205820Bioaerosoles.pdf>
- Cañedo, V., T. Ames, 2004. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa, Lima.
- Casadevall. A. 2012. Fungi and the rise of mammals. *PLoS. Pathogens* 8: e1002808. doi:10.1371/journal.ppat.1002808.
- Castellanos-Moguel, J., M.T. Núñez-Cardona, T. Falcón-Bárceñas, R.V. Díaz-Godoy, 2013. Enemigos invisibles: Hongos y partículas en la atmósfera, efectos sobre la salud. *Entretextos* 14:18-23. <http://entretextos.leon.uia.mx/num/14/PDF/E14-Art3.pdf>

- Chakraborty, P., A. Chakraborty, D. Ghosh, J. Mandal, S. Biswas, U.K. Mukhopadhyay, S.G. Bhattacharya, 2014. Effect of airborne *Alternaria* conidia, ozone exposure, PM10 and weather on emergency visits for asthma in school-age children in Kolkata city, India. *Aerobiologia* 30: 137-148. Doi: 10.1007/s10453-013-9312-4.
- Chhonkar, A., D. Kataria, S. Tambe, C. S. Nayak, 2016. Three rare cases of cutaneous phaeohyphomycosis. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 49(2): 271-274. DOI: 10.4103/0970-0558.191321.
- Chowdhary, A., B. Tarai, A. Singh, A. Sharma, 2020. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India. *Emerging Infectious Diseases* (26): 11. DOI: 10.3201/eid2611.203504.
- Chul-Park, S., S. In Kim, C. Sang Hwang, H-J. Cho, J.-H. Yoon, C-H. Kim, 2019. Multiple airborne allergen-induced eosinophilic chronic rhinosinusitis murine model. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 276: 2273-2282. DOI: 10.1007/s00405-019-05465-x.
- Cruz-Ramírez, C. A., L. S. Villalba-Corredor, J.F. Mikán-Venegas, S.A. Ospina-Sánchez, 2012. Screening for a fungal protease with potential in the bioremediation of historical valuable documents in Bogota. *Archive. Rev. Colomb. Biotecnol.* (XIV) 1, 108-120.
- Daines, M., L. Zhu, R. Pereira, X. Zhou, C. Bondy, B.M. Pryor, J. Zhou, Y. Chen, 2020. *Alternaria* induces airway epithelial cytokine expression independent of protease-activated receptor. *Respirology*. 25: 502-510. DOI: 10.1111/resp.13675.
- Universidad de Navarra, 2013. Hongo dimórfico. Pamplona, España. <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hongo-dimorfico>.
- Fuiano, N., S. Fusilli, C. Incorvaia, 2012. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergologia et Immunopathologia* 40:71-74. Doi: 10.1016/j.aller.2011.03.010.
- Frank, V., G. Tánová, L. Takácsová, 1993. Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 148: 229-232. Doi: 10.1016/S0232-4393(11)80096-X.
- Gobierno del Estado de México, 2005. Plan Regional de Desarrollo Urbano del Valle de Toluca. Estado de México: Gobierno del Estado de México. http://seduv.edomexico.gob.mx/dgau/planes_regionales/prduvt/Doc%20PRDUVT.pdf
- Gomes, J., C. Vilarinho, M.L. Duarte, C. Brito, 2011. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Alternaria alternata* unresponsive to itraconazole treatment. *Case Reports in Dermatological Medicine* 11: 4. Doi: 10.1155/2011/385803.
- González-Díaz, S.N., A. Arias-Cruz, J.A. Ibarra-Chávez, B. Elizondo-Villareal, D.M., Rivero-Arias, M.R. Salinas-Díaz, 2016. Prevalencia de sensibilización a hongos en pacientes con alergia respiratoria. *Revista Alergia México*. 63(2): 143-153. DOI: 10.29262/ram.v63i2.161
- Gottwald, T.R., T.M. Trocine, L. W. Timmer, 1997. A computer controlled environmental chamber for the study of aerial fungal spore release. *Phytopathology*. 87: 1078-1084. Doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.10.1078.
- Grinn-Gofrón, A., P. Rapiejko, 2009. Occurrence of *Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp. spores in Western, Northern and Central-Eastern Poland in 2004-2006 and relation to some meteorological factors. *Atmospheric Research*, 93: 747-758. Doi: 10.1016/j.atmosres.2009.02.014.
- Hosseini, N., Y. Hajizadeh, M. Nikaeen, M. Hatamzadeh, 2020a. Spatiotemporal variation of ambient bioaerosols in a large and industrialized metropolis of Iran and their association with PM_{2.5} and meteorological factors. *Aerobiologia*. 37: 105-117. DOI: 10.1007/s10453-020-09672-6.
- Hosseini, A., R. Pandey, E. Osman, A. Victorius, F. Li, T. Didar, L. Soleymani, 2020b. Roadmap to the Bioanalytical Testing of COVID-19: From Sample Collection to Disease Surveillance. *Sensors ACS*: 5 (11), 3328-3345. DOI: 10.1021 / acssensors.0c01377.
- Hu, W., Y. Ran, K. Zhuang. J. Lama, C. Zhang, 2015. *Alternaria arborescens* infection in a healthy individual and literature review of cutaneous alternariosis. *Mycopathologia*. 179: 147-152. DOI: 10.1007/s11046-014-9822-9.
- Imran Bukhari, S.S., Z. Ali, 2021. Characterization of bioaerosols and particulate matter (PM) in residential settings of asthmatic patients of Lahore, Pakistan. *Iran Journal Allergy Asthma Immunology*. 20(2): 143-155. DOI:10.18502/ijaai.v20i2.6048.

- Iturrieta-González, I., I. Pujol, S. Iftimie, D. García, V. Morente, R. Queralt, M. Guevara-Suárez, A. Alastruey-Izquierdo, F. Ballester, M. Hernández-Restrepo, J. Gené, 2019. Polyphasic identification of three new species in *Alternaria* section Infectoriae cause human cutaneous infection. *Mycoses*. 63: 212-224. DOI: 10.1111/myc.13026.
- JMP®, 1989-2019. Versión 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Khatiwa, S., A. Subedi, 2020. Lung microbiome and coronavirus disease 2019 (COVID-19): Possible link and implications. *Human Microbiome Journal* (17). DOI: 10.1016/j.humic.2020.100073.
- Konidaris, V., A. Mersinoglou, T.A. Vyzantiadis, D. Papadopoulou, K.G. Boboridis, P. Ekonomidis, 2013. Corneal Transplant Infection due to *Alternaria alternata*: A Case Report. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*. (2013): 1-3. Doi: 10.1155/2013/589620
- Kruskal W. H., W. A. Wallis, 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583–621. Doi: 10.2307/2280779.
- Leslie, J.F., S.B. Summerell, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa.
- Liu, A.W., A.C. Bateman, A. Greenbaum, K. Gavin, J. Clarridge, J. Grim, 2016. Cutaneous phaeohyphomycosis in a hematopoietic stem cell transplant patient caused by *Alternaria rosae*: first case report. *Transplant Infections Diseases*. 19: e12698. DOI: 10.1111/tid.12698.
- López-LLorca, L.V., T. Carbonell, S. Gómez-Vidal, 2002. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. *Mycological Progress* 1: 249-256. Doi: 10.1007/s11557-006-0022-y.
- Ma, M., J.L. Redes, C.M. Percopo, K.M. Druey, H.F. Rosenberg, 2018. *Alternaria alternata* challenge at the nasal mucosa results in eosinophilic inflammation and increased susceptibility to influenza virus infection. *Clinical Experimental Allergy*. 48: 691-702. DOI: 10.1111/cea13123.
- Mejía-Góchez, A. G., 2020. Contaminación ambiental: Bioaerosoles. Celebremos la biodiversidad. Universidad Abierta y a Distancia de México (UnADM), Boletín de la División De Ciencias de la Salud, Biológicas y Ambientales (DCSBA) mayo-junio: No.25, 14-17.
- Mimura, T., S. Yamagami, H. Fujishima, H. Noma, Y. Kamei, M. Goto, A. Kondo, M. Matsubara, 2014. Sensitization to Asian dust and allergic rhinoconjunctivitis. *Environmental Research* 132: 220–225. Doi: 10.1016/j.envres.2014.04.014.
- MycoBank data base, 2016. International Mycological Association (IMA), © Copyright 2016. Website built using BioloMICS Software. <http://www.mycobank.org>
- Nakasone, K.K., S.W. Peterson, S-C. Jong, 2004. Preservation and distribution of Fungal cultures. In: Mueller, G.M, G.F. Bills, M.S. Foster (eds.), *Biodiversity of Fungi, Inventorying, and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 37-47.
- Pedroza, A. M., A. Matiz, D. Gomez, 2001. Manual de laboratorio: Introducción a la biotecnología. *Pontificia Universidad Javeriana*. 27-32p.
- Percopo C.M., M. Ma, E. Mai, J.L. Redes, L. S. Kraemer, M. Minai, I.N. Moore, K.M. Druey, H. F. Rosenberg, 2020. *Alternaria alternata* accelerates loss of alveolar macrophages and promotes lethal influenza A infection. *Viruses*. 12: 946. DOI: 10.339/v12090946.
- Ramos-e-Silva, M., C.M. Oliveira-Lima, R. Casz-Schechtman, B. Moritz-Trope, S. Carneiro, 2010. Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clinics in Dermatology* 28: 217-225. Doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.008.
- Rendueles, B.E., 2015. Importancia del conocimiento de las esporas atmosféricas en zonas urbanas y su relación con la morbilidad por asma. *Revista Salud Ambiental (Especial XIII Congreso Español de Salud Ambiental)* 15: 12-64.
- Rodríguez-Gómez, C., C. Ramírez-Romero, F. Cordoba, G.B. Raga, E. Salinas, L. Martínez, I. Rosas, E.T. Quintana, L.A. Maldonado, D. Rosas, T. Amador, H. Alvarez, L. A. Landino, 2020. Characterization of culturable airborne microorganisms in the Yucatan Peninsula. *Atmospheric Environment*. 223: e117183. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2019.117183.

- Salehi, S., A. Abedi, S. Balakrishnan, A. Gholamrezanezhad, 2020. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Systematic Review of Imaging Findings in 919 Patients. *American Journal of Roentgenology* (215):87-93. DOI: 10.2214/AJR.20.23034.
- Sánchez-Espinosa, K.C., M. Almaguer-Chávez, 2014. Aeromycology and human health. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 67(3): 23 p. <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/45/33>
- Secretaría del Medio Ambiente (SEDEMA), 2014. Características de los Contaminantes: Partículas Suspensas Totales (PST), Menores a 10 Micras (PM₁₀) y Menores a 2.5 Micras (PM_{2.5}). Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. Gobierno de Estado de México. http://portal2.edomex.gob.mx/rama/contaminacion_atmosferica/caracteristicas_contaminantes/index.htm
- Sečnicková, Z., K. Jůzlová, N. Vojáčková, D.V. Kazakov, L. Hošková, J. Fialová, M. Džambová, J. Hercogová, 2014. The rare case of *Alternaria alternata* cutaneous and pulmonary infection in a heart transplant recipient treated by azole antifungals. *Dermatologic Therapy* 27: 140-143. Doi: 10.1111/dth.12096.
- Shin, S-H., M-K., Ye, D-W., Lee, M_H., Chae, S-Y., Choi, 2020. Development and immunopathological characteristics of an *Alternaria*-induced chronic rhinosinusitis mouse model. *PLoS ONE* 15(6): e0234731. DOI: 10.1371/journal.pone.0234731.
- Silva-Barreto, S., D. Vilela-de-Rezende, L.E. Bassay-Blum, 2011. Fungos em sementes de plantas ornamentais. *Revista Brasileira de Sementes*, 33: 561 - 573. DOI: 10.1590/S0101-31222011000300019.
- Shakurnia, A.H., M.A. Assarenhzadegan, A. Amini, G.I. Shakerinejad, 2013. Prevalence of fungal allergens in respiratory allergic patients in Ahvaz City, Southwest Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 6: e4864. Doi:10.5812/jjm.4864.
- Sharma, R., R. Deval, V. Priyadarshi, S.N. Gaur, V.P. Singh, A.B. Singh, 2011. Indoor fungal concentration in the homes of allergic/asthmatic children in Delhi, India. *Allergy & Rhinology* 2(1): 21-32. DOI: 10.2500/ar.2011.2.0005.
- Soltani, S., A. Zakeri, M. Zandi, M. Mobini Kesheh, A. Tabibzadeh, M. Dastranj, S. Faramarzi, M. Didehdar, H. Hafezi, P. Hosseini, A. Farahani, 2021. The Role of Bacterial and Fungal Human Respiratory Microbiota in COVID-19 Patients. *Bio Med Research International* (2021), ID 6670798, DOI: 10.1155/2021/6670798.
- Tsitsi Pfavayi, L., E. Nimele Sibanda, F. Mutapi, 2020. The pathogenesis of fungal-related diseases and allergies in the African population: the state of evidence and knowledge gaps. *International Archives of Allergy and Immunology*. 181:257-269. DOI: 10.1159/000506009.
- Vacher, G., H. Niculita-Hirzel, T. Roger, 2015. Immune responses to airborne fungi and non-invasive airway diseases. *Seminars in Immunopathology*. 37: 83-96. DOI: 10.1007/s00281-014-0471-3.
- Velázquez, P.D., 2020. Identificación y caracterización de una especie del género *Alternaria* aislada de semillas de coriandro (*Coriandrum sativum*) procedentes del norte de Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Paraná, Grupo Factores Bióticos y Protección Vegetal, 7-10.
- Vilela de Oliveira, G. L., C.N. Simão Oliveira, C. Figueiredo Pinzan, L. Vedovato Vilela de Salis, C. Ribeiro de Barros Cardoso, 2021. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19. *Front. Immunol.* 12:635471. DOI: 10.3389/fimmu.2021.635471.
- Watanabe, T., 2002. Pictorial Atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd. Edition. CRC. Press. Boca Raton, Fla. 506 p.
- Woolhouse, M., E. Gaunt, 2007. Ecologic origins of novel human pathogens. *Critical Reviews Microbiology* 33:231-242. Doi: 10.1080/10408410701647560.
- Wu, X., B. Lee, L. Zhu, Z. Ding, Y. Chen, 2020. Exposure to mold proteases stimulates mucin production in airway epithelial cells through Ras/Raf1/ERK signal pathway. *PLoS ONE* 15(4): e0231990. DOI: 10.1371/journal.pone.0231990.
- Xiang, L., G. Yong, L. Ruiting, S. Tu, N. Xiu, 2020. The lung tissue microbiota features of 20 deceased patients with COVID-19. *Journal of Infection* (8): e64-e67. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.06.047

Aplicación de dos consorcios microbianos para promover el rendimiento de jamaica criolla (*Hibiscus sabdariffa*) en Guerrero, México

(Application of two microbial consortia to promote the yield of creole jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) in Guerrero, Mexico)

^{1,2}Orbe-Díaz Diana I, ¹Sampedro-Rosas María Laura, ¹Juárez-López Ana Laura, ³Palemón Alberto Francisco, ⁴Ramírez-Rojas Sergio G, ⁵Forero-Forero Ángela Victoria, ^{2*}Toribio-Jiménez Jeiry.

¹Centro de Ciencias de Desarrollo Regional, Universidad Autónoma de Guerrero, Acapulco, Guerrero. Amates 13, El Tigre, 39630 Acapulco de Juárez, Guerrero. Mexico.

²Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Cd. Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, 39070, México. Teléfono (52) + 747 4719310 ext. 4526

³Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, UAGro. Periférico Poniente s/n. Colonia Villa de Guadalupe. CP. 40010 Iguala de la Independencia, Gro., México

⁴Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental Zacatepec. Km 0.5. Carretera Zacatepec a Galeana, C.P. 62780. Zacatepec, Morelos, México

⁵Faculty of Sciences, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Av. Universidad 3000, Circuito Exterior s/n, Delegación Coyoacán, 04510, Mexico City, Mexico

*E-mail correspondencia: jeiryjimenez2014@gmail.com

RESUMEN

El cultivo de jamaica en México, es de gran importancia debido al número de empleos que se generan en época de cosecha, sin embargo, los rendimientos en la Costa Chica, en el estado de Guerrero son bajos, por ello resulta importante diseñar y aplicar nuevas estrategias biotecnológicas basados en Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV) de bajos costos y fáciles de implementar para aumentar el rendimiento en Tonelada/Hectárea (Ton/Ha) de los cultivos. Se probaron dos consorcios microbianos conformados por A) *Klebsiella sp* PB02 y *Klebsiella sp* HPA-43 y B) *Klebsiella sp* PB02, *Klebsiella sp* HPA-43 y *Trichoderma sp* en dos parcelas de jamaica criolla. Se hicieron cuatro inoculaciones en todo el ciclo del cultivo por asperjado. Como control se utilizaron plantas tratadas de manera tradicional por el productor. Al final del ciclo se colectaron y pesaron los cálices de cada tratamiento y se obtuvo el rendimiento en Ton/Ha en cada parcela. Los resultados obtenidos fueron para la parcela uno, 0.43 para el tratamiento A, 0.28 para el tratamiento B y para el control 0.19; mientras que en la parcela dos se obtuvieron 0.46 Ton/Ha, 0.47 Ton/Ha y 0.43 Ton/Ha respectivamente. Por lo que se propone una estrategia eficaz de bajo costo capaz de incrementar los rendimientos en peso fresco de cálices

de jamaica criolla.

Palabras clave: Jamaica, MPCV, consorcio, rendimiento, *Klebsiella sp*, *Trichoderma sp*.

ABSTRACT

The cultivation of jamaica in Mexico, is of great importance due to the number of jobs generated at harvest time, however, yields on the Costa Chica, in the state of Guerrero are low, so it is important to design and implement new biotechnological strategies based on plant growth promoter microorganisms (MPCV) of low costs and easy to implement to increase the yield Ton/Hectare (Ton/Ha) of crops. Two microbial consortia consisting of A) *Klebsiella sp* PB02 and *Klebsiella sp* HPA-43 and B) *Klebsiella sp* PB02, *Klebsiella sp* HPA-43 and *Trichoderma sp* were tested on two plots of creole jamaica. Four inoculations were made throughout the spraying cycle. Traditionally treated plants by the producer were used as a control. At the end of the cycle, the calyxes of each treatment were collected and weighed and the yield was obtained in Ton/Ha on each plot. The results obtained were for plot one, 0.43 for treatment A, 0.28 for treatment B and for control 0.19; while on plot two 0.46 Ton/Ha, 0.47 Ton/Ha and 0.43 Ton/Ha were obtained respectively. So, an effective low-cost strategy

is proposed capable of increasing fresh yields of creole jamaica calyxes.

Keywords: jamaica, PGPM, consortia, production, *Klebsiella sp*, *Trichoderma sp*.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es considerada una planta de gran importancia socioeconómica en México, a partir de ella se elaboran bebidas, mermeladas, salsas, pigmentos, etc. (SADER, 2016). En el país, se cosechan 18 mil hectáreas con un rendimiento promedio de 0.265 Ton/Ha. Aunque la superficie cosechada y el rendimiento por unidad de superficie son bajos, los agricultores obtienen altos ingresos por su buen nivel de comercialización y el incremento en la demanda. Particularmente en la Región Costa Chica, en el estado de Guerrero, el cultivo es atendido por productores de escasos recursos, que realizan el cultivo y cosecha de manera manual generando una fuente importante de empleos temporales que aumentan los costos de producción, como lo demuestra un estudio del Centro de Validación y transferencia de Tecnología de Sinaloa A.C. (2012) en donde compararon los métodos de cosecha anual y mecanizado, encontrando una diferencia de hasta 70 jornales por hectárea entre un método y otro (Serrano, 2008;), la mayor producción proviene de la variedad criolla, que se siembra únicamente en el ciclo agrícola de primavera-verano, con poca o nula tecnificación y/o fertilización, esto provoca un bajo rendimiento en comparación a un cultivo industrializado. En 2019 datos del SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera) indican que en total se cosecharon 14,125.66 Ha con un rendimiento de 0.38 Ton/Ha y un valor de producción de \$161,036,028.90 Para incrementar la producción y rendimientos en muchos cultivos se han empleado estrategias amigables con el ambiente, de bajo costo y de fácil aplicación por los productores, es por ello que el uso de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV's) han sido probado con éxito en jitomate, maíz, lechuga, mango por mencionar algunos (Toribio *et al* , 2020; Herrera-Quiterio, *et al* 2020; Chávez-González, *et al*, 2016; Guevara-Luna, *et al*, 2018; Romero-García V, *et al*, 2016; Orrala-Ramos E, 2015; Pérez U *et al*, 2015). Los MPCV más usados destacan a *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Rhizobium sp* y *Trichoderma sp*, pero no se encontraron reportes del uso de bacterias del género *Klebsiella sp* solas y combinadas con *Trichoderma sp* como estrategia de incrementar la

producción de jamaica, es por ello que este trabajo refleja un primer reporte del uso y aplicación de una alternativa atractiva de bajo costo capaz de aumentar el rendimiento de los cultivos de jamaica en la Costa Chica de Guerrero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de la parcela.

Se seleccionaron dos parcelas en la comunidad del Pericón en la Región Costa Chica de Guerrero, en el periodo del temporal de julio-noviembre de 2019, dado que la jamaica se siembra junto o separada de los cultivos de maíz en temporada de lluvias. Las dos parcelas se usaron exclusivamente para jamaica y ambas tenían suelos diferentes para observar la acción de los consorcios cada parcela tenía un total de 15 surcos de aproximadamente 70 m de largo por 50 cm de ancho con 464 plantas por surco. Se utilizaron semillas de la variedad criolla donadas por dos productores de la comunidad, para la parte experimental se utilizaron únicamente dos surcos por tratamiento, usando de 4 a 7 semillas por pocillos de 20 cm de profundidad y a un espacio de 60 cm de separación entre cada pocillo. El riego fue de temporal y el testigo absoluto fueron surcos en los que no se adicionó ningún microorganismo, solo se asperjaron las plantas con agua y se cultivaron de forma tradicional por los productores de la región (la técnica de siembra consiste en el deshierbe y sin agroquímicos).

Descripción de las cepas bacterianas.

Las cepas que se utilizaron fueron reactivadas en agar nutritivo e incubadas a 37 °C/24h y se fueron donadas del biobanco del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico - Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Las cepas previamente aisladas de la rizosfera y se confirmaron *in vitro* como promotoras de crecimiento vegetal, y etiquetadas como *Klebsiella sp* PB02 y *Klebsiella sp* HPA-43 (Las cepas presentaban la capacidad producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas), fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de enzimas líticas (lipasas, esterases, proteasas, celulasas, amilasas) y sideróforos. (Nava & Gutiérrez, 2017).

Así mismo se usó una cepa de *Trichoderma sp* donada por el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, campo experimental de Zacatepec, Mor). Esta cepa se administró en una suspensión de esporas de 5 mL/L a una concentración de 1×10^3 calculada también por D.O600nm. (Michel-Aceves *et al*, 2008)

Pruebas de competencia microbiana

Para determinar la sinergia o antagonismo de los consorcios a utilizar se realizaron pruebas de competencia microbiana, haciendo una suspensión bacteriana en solución salina al 0.9% v/v (de cada cepa) a una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml; posteriormente en una caja de Petri con agar nutritivo se colocó una gota de la suspensión con ayuda de una aguja de inoculación estéril y se dispersó de extremo a extremo, las cepas se interceptaron en el centro de la caja, se dejó secar y de incubaron por 24 hrs/ 30°C para evaluar su crecimiento, y se interpretaron como sinergismo las cepas que entrecruzaba su crecimiento y antagonismo las que se inhibían (Olivas E. 2004).

Diseño de los consorcios y preparación de inóculos.

Solo se formularon dos combinaciones: A) *Klebsiella sp* PB02 y *Klebsiella sp* HPA-43 (solo las bacterias) y B) *Klebsiella sp* PB02, *Klebsiella sp* HPA-43 y *Trichoderma sp* (bacterias más el hongo). Para preparar los inóculos se usó la concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml de cada cepa bacterianas en caldo nutritivo (BD Bioxon™) y del hongo 1×10^3 esporas/ml. El inóculo final de bajo costo se hizo a un volumen de 8 litros (6 L de agua estéril, 200 gr de melaza, 1.7 L de solución salina al 0.8% y 100 mL de cada cepa bacteriana y 5mL/L de la suspensión de esporas), se dejó estabilizar durante 3 días (para que las cepas se activaran metabólicamente) (Modificado de Pantoja-Guerra *et al*, 2018). Para la inoculación se utilizó un litro del inóculo final por cada 19 litros de agua para cargar las bombas de aspersión.

Inoculación de plantas.

A los 15 días posteriores de la siembra de las semillas de jamaica se hizo la primera inoculación para esto se usaron por tratamiento bombas de aspersión previamente lavadas y secadas (20L *Truper*®) para asperjar se procuró impregnar toda la planta y la base del tallo con la finalidad de alcanzar la rizosfera, en total se realizaron cuatro inoculaciones con las mismas condiciones y concentraciones de MPCV en los días 15, 47, 75 y 121 respectivamente en el desarrollo del

cultivo, finalizando el ciclo de producción en el día 176 con el corte y pesaje fresco de los cálices (Norhayati *et al*, 2019). Durante todo el ciclo se vigiló la aparición de signos y síntomas de las enfermedades pata negra y manchado de cáliz (Ortega-Acosta, *et al*, 2015). El control biológico se manejó de acuerdo a las prácticas culturales y agrícolas del productor.

Colecta de datos.

Se colectaron los cálices de ambas parcelas, tanto los surcos inoculados como los manejados como control, se pesaron en fresco y el los datos se analizaron en el programa SAS con un ANOVA y una prueba de Tukey a un α de 0.05, para reconocer las diferencias significativas entre los datos del control y las plantas inoculadas.

Análisis económico.

Los datos fueron extrapolados a rendimiento Ton/Ha a partir de la longitud del surco, el espacio de separación entre los surcos, y comparado con los rendimientos reportados por Sistema de Información Agrícola y Pesquera (SIAP, 2019).

Acompañamiento técnico.

Durante las visitas para inocular las plantas, se atendieron todas las dudas de los productores y se explicó sobre el uso y preparación de bioinoculantes a base de consorcios microbianos, también se estableció un canal de comunicación para que pudieran estar en contacto constante con el equipo de trabajo.

Consideraciones de bioseguridad.

Todos los residuos de las preparaciones fueron inactivados en el lugar (campo) con hipoclorito de sodio al 6% y transportados al laboratorio para ser dispuestos como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se describen los resultados obtenidos del uso y aplicación de dos consorcios para jamaica a base de MPCV, primeramente se observó que todas las cepas probadas hacen sinergia a una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC, ya que al conjuntarse en el centro de la placa no se inhiben (ver figura 1), Pantoja *et al* (2018) menciona la importancia de utilizar cepas nativas que

estén aclimatadas a las condiciones propias de cada tipo de suelo según la región en la que se vayan a aplicar los MPCV's determinará en gran medida el éxito o fracaso de un biofertilizante, lo que concuerda con lo hecho en este estudio.

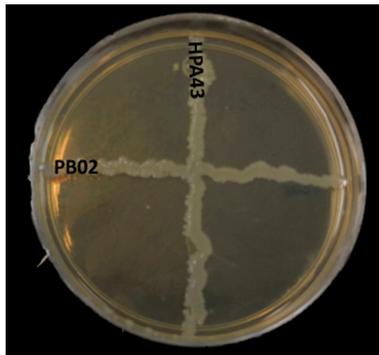


Figura 1.- Pruebas de competencia microbiana.

Se sembraron dos parcelas exclusivas para jamaica en una superficie de 420 m² aproximadamente cada una; el ciclo del cultivo duró 176 días. Al final, se cosecharon y separaron los cálices frescos de cada experimento, obteniendo una producción diferencial en cada parcela basado en los rendimientos Ton/Ha. En la parcela uno se obtuvo un 0.43 Ton/Ha para el tratamiento A, 0.28 Ton/Ha para el tratamiento B y para el control 0.19 Ton/Ha; mientras que en la parcela dos se obtuvieron 0.46 Ton/Ha, 0.47 Ton/Ha y 0.43 Ton/Ha respectivamente. La diferencia tan drástica en el rendimiento entre una parcela y otra puede estar determinada por la naturaleza del suelo como de los nutrientes disponibles en cada una, siendo esto coherente con lo reportado por Meléndez-Monroy *et al* (2016) el cual reporta que

las poblaciones bacterianas presentes en la rizósfera en los cultivos de jamaica varían de acuerdo con la etapa fenológica de la planta y con las características nutricionales del suelo siendo de los componentes determinantes para la estructura de la rizósfera y de las comunidades bacterianas que habitan en ella, así como las variaciones en la concentración de P y Mg del suelo (Tabla 1 y figura 2).

Ahmed *et al.* (2017), Norhayati *et al.* (2019) y Hassan *et al.* (2020) concluyeron por separado que la aplicación de biofertilizantes a base de bacterias del género *Azotobacter* y *Azospirillum* en cultivos de jamaica, benefician el crecimiento, producción de materia seca e incrementa el rendimiento; las cepas utilizadas en este estudio no pertenecen a dichos géneros. Sin embargo, Martínez-Romero *et al.* (2018), en un análisis molecular, concluyen que *K. variicola* se encuentra asociada a plantas y posee genes capaces de promover el crecimiento vegetal y que *K. quasipneumoniae* puede adaptarse tanto a entornos clínicos como ambientales, esto se debe a los genes encontrados en su genoma. En este caso, ambos aislamientos son de origen ambiental, por lo que concuerda con la capacidad de promoción de crecimiento vegetal descrita. Moreno & Galvis (2013) y Armenta-Bojórquez (2010), mencionan a *Klebsiella* uno de los géneros de vida libre capaz de promover el crecimiento vegetal destacando su capacidad de fijar nitrógeno. Por su parte, el género *Trichoderma* destaca por su capacidad de biocontrol aunque también se han descrito mecanismos directos de promoción de crecimiento, como lo señalan González *et al* (2017) y



Figura 2.- Parcelas de trabajo. A) Parcela 1 inicio de cultivo, B) Parcela 2 inicio de cultivo, C) Cosecha parcela 1 y D) Cosecha parcela 2.

Tabla 1 Rendimiento total de cada tratamiento en las parcelas expresado en Ton/Ha

RENDIMIENTO Ton/Ha		
	Parcela 1	Parcela 2
Tratamiento A (<i>Klebsiella sp</i> PB02 y <i>Klebsiella sp</i> HPA-43)	0.43	0.46
Tratamiento B (<i>Klebsiella sp</i> PB02, <i>Klebsiella sp</i> HPA-43 y <i>Trichoderma sp</i>)	0.28	0.47
Control	0.19	0.43

Hernández-Melchor *et al* (2019).

En este estudio se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos; siendo más efectivo el tratamiento A en la parcela uno y el tratamiento B en la parcela dos (ver Tabla 1). Los rendimientos Ton/Ha de los mejores tratamientos fueron de 0.43 y 0.47 para ambas parcelas respectivamente. *Los rendimientos se encuentran arriba de la media estatal reportada en 2019 por el SIAP, la cual fue de 0.41 Ton/Ha.* Esto evidencia la eficacia en el uso de tratamientos a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, sin embargo, los rendimientos se encuentran por debajo de lo reportado en Puebla y Jalisco (SIAP, 2019).

Después de 30 días del corte y pesaje de los cálices, los productores observaron que en los tallos dejados en las parcelas comenzaron a emitir inflorescencias nuevamente. Dado que en esta región el corte de jamaica se realiza al final del ciclo de cultivo. Para los productores resultó atractivo y mostraron mayor interés en el uso de los consorcios microbianos, baratos y de fácil aplicación como alternativa de biofertilización. Este acompañamiento técnico podría ayudar a generar mayores ganancias para los productores ya que entenderían de mejor manera el cultivo y optimizarían varios puntos en el proceso de cultivo y cosecha.

Christian & Jackson, (2010) reportan que a 35 días después de la floración es el tiempo adecuado para el corte de los cálices para evitar pérdida de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, este tiempo podría ser un buen punto de referencia para los tiempos de inoculación. Ramos-Gutiérrez *et al* (2020) por su parte, indican que no hay diferencias significativas en las variables de rendimiento si se comparan los métodos de cosecha única y continua, a pesar de ello, los productores al basarse en la percepción visual, si han percibido diferencias y mostraron interés en la aplicación y uso de los consorcios. Esto es un ejemplo que los investigadores deben interesarse en bioformular productos basados

en consorcios microbianos autóctonos que favorezcan el desarrollo y rendimiento de los cultivos, integrando variables que ayuden a explicar los fenómenos de mayor producción y menos desgaste al ambiente.

CONCLUSIONES

Se hace un primer reporte del uso de MPCV's basados en *Klebsiella sp* y *Trichoderma sp* como una estrategia de bajo costo y fácil manipulación que ayuda a incrementar los rendimientos en peso fresco de cálices de jamaica criolla en la Región Costa Chica de Guerrero, y que puede tecnificar la producción de jamaica beneficiando directamente la economía de los productores

REFERENCIAS

- Ahmed M. El Naim, Agwa I. Ahmed, Khalid. A. Ibrahim, Abdallateif M. Suliman, Eltayeb S. N. Babikir. (2017). Effects of Nitrogen and Bio-fertilizers on Growth and Yield of Roselle (*Hibiscus sabdariffa var sabdariffa L.*). International Journal of Agriculture and Forestry, 7(6), 145-150. DOI: 10.5923/j.ijaf.20170706.05
- Al-Sayed, H. M., Hegab, S. A., Youssef, M. A., Khalafalla, M. Y., Almaroai, Y. A., Ding, Z., & Eissa, M. A. (2020). Evaluation of quality and growth of roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) as affected by bio-fertilizers. Journal of Plant Nutrition, 43(7), 1025-1035. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1711938>
- Armenta-Bojórquez A.D.; García-Gutiérrez C.; Camacho-Báez J. R.; Apodaca-Sánchez M.A.; Gerardo-Montoya L.; Nava-Pérez E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai, 6, 51-56. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/461/46112896007.pdf>
- Centro de Validación y transferencia de Tecnología de Sinaloa A.C. (2012). Jamaica con potencial productivo y rentable para Sinaloa. Fundación Produce-SAGARPA-Gobierno del Estado de Sinaloa.

- Chávez González J.D., Rodríguez Barrera M.A., Romero Ramírez Y., Ayala Sánchez A., Ruvalcaba Ledezma J.C., & Toribio-Jiménez J. (2016). *Pantoea agglomerans* productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(4), 961-968.
- Christian, K. R., & Jackson, J. C. (2009). Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8), 663-667. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.05.007>.
- Gonzalez AH, M., & Vicente G, Q. (2016). Isolation of *Trichoderma spp.* from Desert Soil, Biocontrol Potential Evaluation and Liquid Culture Production of Conidia Using Agricultural Fertilizers. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 7(1). <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000163>
- González-Martínez A.J. & Chamorro-Íncar M.A. (2017). Efecto de la densidad poblacional de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Agronomía y Ambiente Revista Facultad de Agronomía UBA*. 37(2),131-139. ISSN 2344-9039 (en línea)
- Guani -Sánchez G.D. & Morales Vargas A.T. (2019). Evaluación de la capacidad de producción de lipasas en cepas de *Yarrowia lipolytica*. En: Encuentro de Jóvenes Investigadores. Universidad de Guanajuato. Celaya, Guanajuato. México. Disponible en: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3099/2563>
- Guevara-Luna, J., Alvarez-Fitz, P., Ríos-Leal, E. et al. (2018) Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World J Microbiol Biotechnol* 34, 88. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2469-9>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, ahead, 0-0. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205>
- Herrera-Quiterio A., Toledo-Hernández E., Aguirre-Noyola J.L., Romero Y., Ramos J., Palemón-Alberto F. y Toribio-Jiménez J. (2020). Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*. 10.1016/j.ram.2019.08.003.
- Martínez-Romero, E., Rodríguez-Medina, N., Beltrán-Rojel, M., Toribio-Jiménez, J., & Garza-Ramos, U. (2017). *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. *Salud Pública de México*, 60(1, ene-feb), 29. <https://doi.org/10.21149/8156>
- Meléndez-Monroy M., Aranda-Ocampo S., Carrillo-Castañeda G., Hernández-Morales J., & Soto-Rojas L. (2016). Rizobacterias nativas en jamaica antagonistas a *Phytophthora parasitica* Dastur: aislamiento y caracterización. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(2), 151-158. Recuperado en 27 de enero de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000200151&lng=es&tlng=es.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2), 185-191. Recuperado en 27 de enero de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000200012&lng=es&tlng=es.
- Moreno L.Y., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37. Recuperado en 27 de enero de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942013000100003&lng=es&tlng=es.
- Nava CG. & Gutiérrez IG. (2017). Evaluación de *Klebsiella variicola*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella quasipneumoniae* como reguladoras de crecimiento radicular de *Solanum lycopersicum*. Universidad Autónoma de Guerrero. Tesis de Licenciatura no publicada. Guerrero, México.
- Norhayati Y., and Ng, W.H. and Adzemi M.A., (2019) Effects of organic fertilizers on growth and yield of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on BRIS soil. *Malaysian Applied Biology*, 48 (1). pp. 177-184. ISSN 0126-8643
- Olivas E. & Alarcón R. 2004. Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología Básica y Microbiología de Alimentos. Depto. De Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Ciudad Juárez. Chihuahua.

- Orrala Ramos E.L. (2015). Efecto de la inoculación con bacterias nativas promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en el cultivo de remolacha (*Beta vulgaris* L.), en la comuna Prosperidad, cantón Santa Elena. La Libertad. UPSE, Matriz. Facultad de Ciencias del Agrarias. 88p.
- Ortega-Acosta, S. A., Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D. L., & Ayala-Escobar, V. (2015). First Report of *Corynespora cassiicola* Causing Leaf and Calyx Spot on Roselle in Mexico. *Plant Disease*, 99(7), 1041-1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>.
- Pantoja Guerra, M. F., Mendoza Reyes, S., & Valero Valero, N. O. (2018). Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium* sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 31-41. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>
- Pérez UA, Ramírez MM, Zapata YA, Córdoba JM. 2015. Efecto de la inoculación simple y combinada con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu*. 16(1): 95-10.
- Ramos-Gutiérrez, F. A., Ramírez-Cortés, B., Sánchez-Machuca, M. L., Caro-Velarde, F. J., & García Paredes, J. D. (2020). Yield and quality of three varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) with continues harvest and unique harvest. *Revista bio ciencias*, 7, e707. Epub 18 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e707>
- Romero-García, V., García-Ortiz, V., Hernández-Escareño, J., & Sánchez-Yáñez, J. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 313-319. doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.20>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2016). Conoce más sobre la flor de jamaica. Consultado el 15 de mayo de 2021 en <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/conoce-mas-sobre-la-flor-de-jamaica>
- Serrano A. V. (2008). Algunas características del cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en la Costa de Oaxaca. INIFAP. SAGARPA. Folleto Técnico Núm. 14. Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá, Oaxaca., México. 51 p.
- SIAP. (2019). Datos abiertos-Estadística de producción agrícola de 2019. Consultado el 28 de julio de 2020 en <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Toribio Jiménez J, Martínez Blanco B, Antonio Vejar V, Bello-Martínez J, Alberto Palemón F, Romero Ramírez Y, Orbe-Díaz D. (2020). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal para incrementar la producción de *Lactuca sativa* L. en campo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas [Internet]*. 11(2):449-52.

Cuerpo académico UJE-CA-125 Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública
LGAC: Factores de virulencia y drogensensibilidad de las enfermedades infecciosas y Salud Pública

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Perfil microbiológico de úlceras de pie diabético y actividad antimicrobiana	<div data-bbox="841 655 1084 680" data-label="Text"> <p align="center">Aurora Martínez Romero</p> </div> <div data-bbox="1198 590 1474 751" data-label="Image"> </div>	
Identificación de fuentes de contaminación, una estrategia de saneamiento básico en la prevención de brucelosis humana		
Evaluación del efecto inhibitor y potenciador del plasma rico en plaquetas ante fármacos en microorganismos nosocomiales y su correlación con resistencia a fármacos		
Aplicación del árbol de neem en agricultura, industria, medicina y ambiente: una revisión.		
Diagnóstico de brucelosis caprina por serología y PCR múltiple		
Aislamiento de Mycobacterium abscessus en un paciente con afección cutánea		
Asociación entre el fenotipo del sistema sanguíneo ABO y leucemias	<div data-bbox="831 1297 1091 1323" data-label="Text"> <p align="center">José de Jesús Alba Romero</p> </div> <div data-bbox="1203 1108 1474 1260" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="1203 1381 1474 1499" data-label="Image"> </div>	
Análisis de los factores de crecimiento y su efecto inhibitor en microorganismos de importancia clínica		
Aislamiento e identificación de Aeromonas productoras de biopelícula en peces del río Nazas		
Aislamiento e identificación de microorganismos nosocomiales más frecuentes y análisis de sus factores de virulencia		
Análisis de expresión de los genes que codifican para bombas de expulsión y su correlación con resistencia a fármacos de primera y segunda línea por el método de azul de alamar en cepas de micobacterias		
Análisis de los genes lasI/lasR y rhlI/rhlR como reguladores de transcripción de los factores de virulencia dependientes del Quorum sensing y su correlación a fármacos en cepas de Pseudomana aeruginosa aislada de pacientes hospitalizados		
Evaluación de los métodos para el diagnóstico de salmonelosis por ELISA y aglutinación en pacientes crónicamente expuestos	<div data-bbox="824 1650 1101 1675" data-label="Text"> <p align="center">Sandra Hernández González</p> </div> <div data-bbox="1219 1682 1458 1835" data-label="Image"> </div>	
Determinación de Plomo (Pb) y Arsénico (As) en cápsulas de gelatina dura y blanda para uso farmacéutico		

Problema de bioquímica clínica

¹ Sierra Campos Erick y ¹Valdez Solana Mónica Andrea

¹Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 71588 10 y 7 15 29 64.

Email: ericksier@gmail.com; valdezandyval@gmail.com

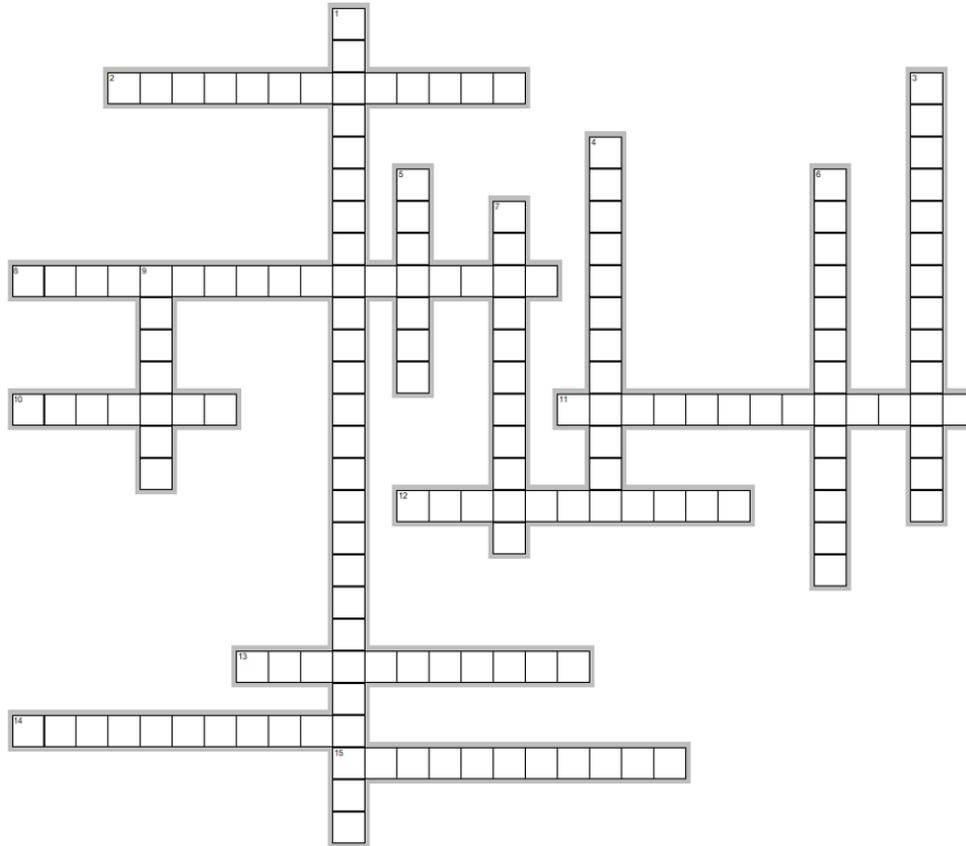
Defina que es un hemograma, indique el significado clínico, ¿Cuál es la utilidad clínica?, ¿Cuáles pueden ser las causas de tener valores altos o bajos?

Crucigrama de Bacteriología Médica

¹ Sierra Campos Erick y ¹Valdez Solana Mónica Andrea

¹Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 71588 10 y 7 15 29 64.

Email: ericksier@gmail.com; valdezandyval@gmail.com



HORIZONTALES

2. Fundador de la microbiología marina
8. Realizó descubrimientos sobre el ciclo de vida de trypanosoma
10. Descubridor del efecto de la penicilina en cultivos bacterianos
11. En Gram normalmente aparecen como cadenas largas de color morado. Su aislamiento requiere de sangre o medios enriquecidos con suero
12. Primero en observar las bacterias
13. Género de bacterias por cocos y bacilos gram negativos considerados patógenos oportunistas de animales y plantas y en medios deficientes de hierro producen pigmentos difusibles como la piocianina
14. Fenómeno que se produce entre *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*
15. Descubridor del agente infeccioso de la peste bubónica

VERTICALES

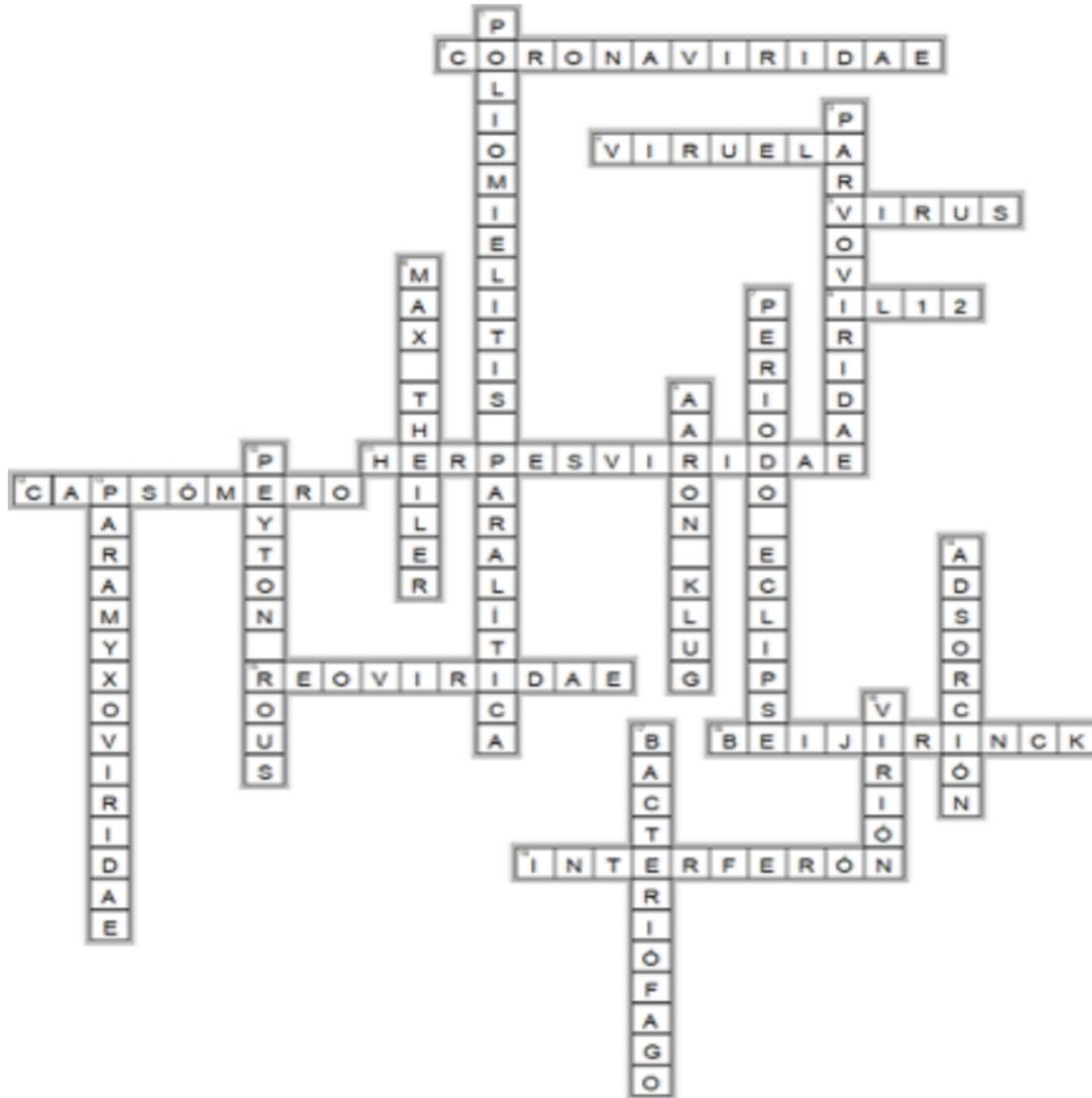
1. Agente bacteriano causante de la tuberculosis
3. Bacteriólogo japonés descubridor del agente infeccioso de la neurosífilis
4. pionera en el desarrollo de vacunas contra fiebre tifoidea, cólera y tos ferina
5. Refutó la teoría de la generación espontánea
6. Rama de la biología que estudia la morfología, ecología, genética y bioquímica de las procariontas
7. Bacilos pleomórficos Gram positivos, esporógenos, anaerobios estrictos. En heridas mal cuidadas agente causal de la gangrena
9. Recibió el premio Nobel en 1908 por sus trabajos en la inmunología y por ser pionero en el uso de tintes y colorantes para detectar e identificar bacterias, así como el desarrollo del primer antibiótico a base de colorantes capaces de teñir y matar selectivamente

Respuesta al Crucigrama de virología del número anterior

¹ Sierra Campos Erick y ¹ Valdez Solana Mónica Andrea

¹ Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 71588 10 y 7 15 29 64.

Email: ericksier@gmail.com; valdezandyval@gmail.com



Verticales

2. Agente viral que se origina de las membranas intracelulares
4. Hallazgo encontrado en la momia de Ramsés V en el siglo XII a. C.
5. En latín significa veneno
8. Citocina principal que se produce durante la infección viral por la célula presentadora de antígeno
11. Agente que se origina de la membrana nuclear
12. componente de la cápside construido de varias moléculas proteicas idénticas
15. Familia que presenta una doble cadena de RNA
18. Observó enfermedades en plantas en las que el agente causal no logró ser aislado
19. Inmunomodulador durante la respuesta inmune a infección por virus y activa células NK

Horizontales

1. Descrita en piedra durante la 18 ava. dinastía egipcia
3. Familia que presenta un único filamento de ADN.
6. Desarrollo la vacuna contra la fiebre amarilla
7. Fase inicial en la que ocurre la denudación, liberación y replicación de las partículas virales
9. Desarrollo la microscopía electrónica cristalográfica que permitió ver la interacción entre el material genético y las proteínas
10. Identificó los virus inductores de tumores
13. agente que se origina de la membrana celular
14. Etapa en la que se da la interacción de receptor - antireceptor
16. Se denomina a la partícula viral completa o infectante
17. virus específicos de las bacterias

Respuesta al problema bioquímico del número anterior

¹ Sierra Campos Erick y ¹Valdez Solana Mónica Andrea

¹Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 71588 10 y 7 15 29 64.

Email: ericksier@gmail.com; valdezandyval@gmail.com

Una solución de proteína (0.3 mL) fue diluida con 0.9 mL de agua. A 0.5 mL de esta solución diluida, se le adicionaron 4.5 mL de reactivo de Biuret y se incubó hasta el desarrollo de color. La absorbancia de la mezcla a 540 nm fue de 0.18 en un tubo de ensayo de 1 cm de diámetro. Una solución estándar (0.5 mL, que contiene 4 mg de proteína/mL) más 4.5 mL del reactivo de Biuret dan una absorbancia de 0.12 en el tubo de ensayo del mismo tamaño. Calcule la concentración de proteína en la solución desconocida no diluida.

SOLUCIÓN

En base a los datos presentados en el párrafo anterior donde se indica la absorbancia obtenida en base a la concentración del estándar, se procede a obtener el valor del coeficiente de extinción molar para las condiciones de trabajo, utilizando la ecuación de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon * b * c \quad \text{dónde}$$

A= Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar

b= longitud de la cubeta

c= concentración

Despejando el coeficiente de extinción molar y sustituyendo los valores del estándar se obtiene el valor de **0.03 mL/mg*cm**

$$\epsilon = \frac{A}{b * c}$$

$$\epsilon = \frac{0.12}{1 \text{ cm} * 4 \text{ mg/mL}}$$

Con este valor se sustituye nuevamente en la ecuación de Lambert-Beer, utilizando ahora los valores de la muestra problema y despejando la concentración.

$$c = \frac{A}{b * \epsilon}$$

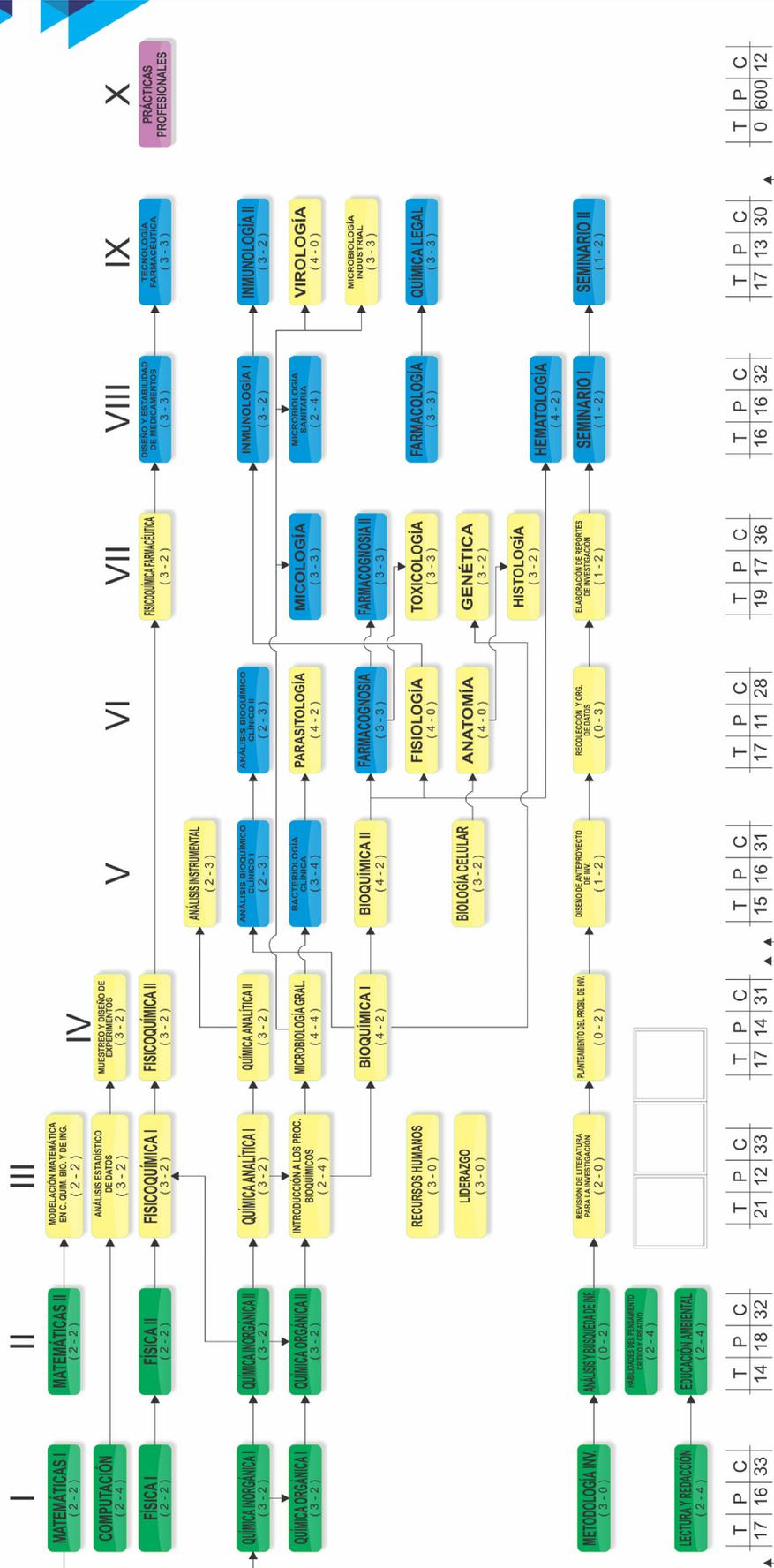
$$c = \frac{0.18}{1 \text{ cm} * 0.03 \text{ mL/mg} * \text{cm}}$$

El valor obtenido al realizar la operación es de **6 mg/mL**, sin embargo, aún se debe considerar la primera dilución en donde indica que 0.3 mL de la disolución de proteína se diluyó con 0.9 mL de agua. Para ello se debe obtener el factor de dilución (las veces que se diluyó) y multiplicar el resultado obtenido anteriormente por el factor de dilución para conocer la concentración de la muestra problema de proteína. El factor de dilución se obtiene dividiendo el volumen total de dilución (1.2 mL) entre el volumen de la muestra que se diluye (0.3 mL), dando un factor de dilución de 4. Por ello los 6 mg/mL se multiplican por cuatro obteniendo **24 mg/mL** como concentración para la solución de proteína.



QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MAPA CURRICULAR



FORMACIÓN INTEGRAL

ÁREA BÁSICA
 ÁREA DISCIPLINAR
 EJERCICIO PROFESIONAL
 OPTATIVAS
 EJE TRANSVERSAL

ÁREA BÁSICA
 ÁREA DISCIPLINAR
 EJERCICIO PROFESIONAL
 OPTATIVAS
 EJE TRANSVERSAL

FORMACIÓN INTEGRAL
 ACTIVIDADES DE VINCULACIÓN: **8 CREDITOS.**
 SERVICIO SOCIAL: **10 CREDITOS.**
 PRACTICAS PROF.: **12 CREDITOS**
 EXP. RECP.: **4 CREDITOS**



REMDIS (fcqgp.ujed.mx/remdis)

ISSN: 2594-1445

Publicación Semestral de Investigación Científica en
Ciencias Alimentarias y de Salud.

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio
Universidad Juárez del Estado de Durango

www.ujed.mx

Artículo 123 S/N Col. Filadelfia, Gómez Palacio,
Durango, México CP 35010

Teléfono (871) 715 8810 ext. 224

e-mail: editorremdis@gmail.com