



REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

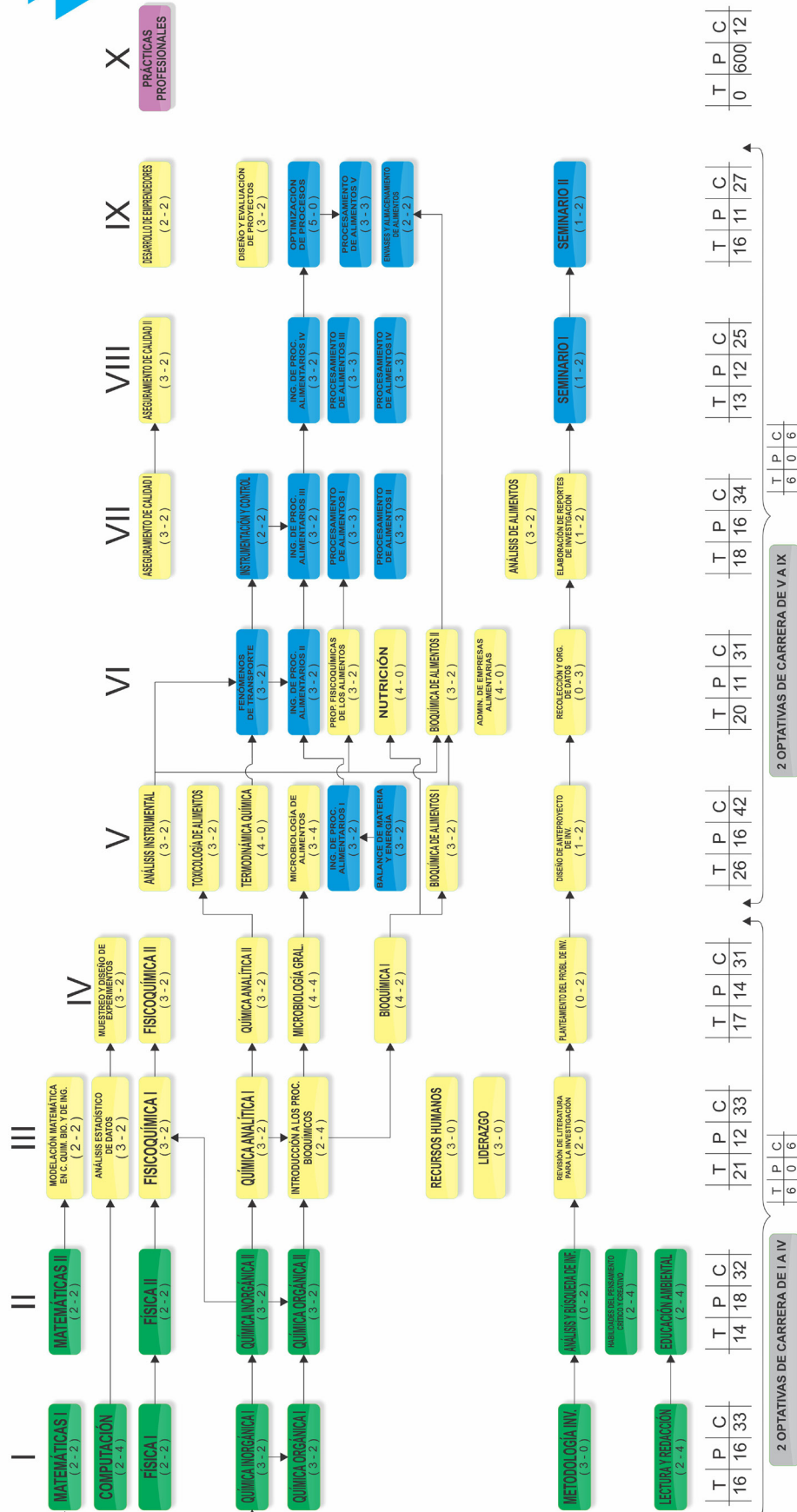
Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED



*Volumen 2
Número 15
Junio 2022
ISSN: 2594-1445*

INGENIERÍA QUÍMICA EN ALIMENTOS

MAPA CURRICULAR



FORMACIÓN INTEGRAL

[illegible]

REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

CINTILLO LEGAL

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 9 No. 15 (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 edición y diseño 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 Lucia Lázaro Suárez
Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Graciela Castro Escarpulli
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
Estudio In silico de los túneles proteicos de la succinato deshidrogenasa mitocondrial para 2-tenoiltrifluoroacetona mediante Caver Web 1.1.	2
Valdez Solana Mónica Andrea, Ventura García Erica Karime, Aguilera Ortiz Miguel, Meza Velázquez Jorge Armando, Sierra Campos Erick	
ALIMENTOS	10
Análisis bromatológico y perfil químico por UHPLC de Cordyceps militaris.....	11
Valdez Solana Mónica Andrea, Salazar Núñez Edgar Emmanuel, Corral Guerrero Iván Artemio, Aguilera Ortiz Miguel, Meza Velázquez Jorge Armando, Sierra Campos Erick	
Principales factores de contaminación por E. coli en carne bovina, alternativas de detección y control de calidad	19
Reyes-De Los Santos, J. G., Femenia-Marroig, A., González-Laredo, R. F., Olivas-Calderón, E. H., Rodríguez-González, V. M.	
QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA	35
Papel de la enzima Nitroreductasa tipo I de Trypanosoma cruzi en el metabolismo de fármacos anti-chagásicos	36
Cárdenas-Guerra Rosa E, Martínez Ignacio, Espinoza Bertha	
CIENCIAS BIOMÉDICAS	46
Estudio sobre la Secreción de la Citocina TGF- β por Células de Melanoma: Metodologías útiles de fácil implementación y bajo costo	47
Anaya-Rubio Isabel A., Tecalco-Cruz Ángeles C., González-Espinosa Claudia, Sosa-Garrocho Marcela, Macías-Silva Marina, Pérez-Calixto Mitzi P.	
Datos sociodemográficos y epidemiológicos de la COVID-19 en mexicanos	58
Maravilla Domínguez María Aurora, Quintero Fabián María Saray, Arreola Rodrigo, Irecta Nájera Cesar Antonio, Pérez Chávez Verónica, Zavala Romero Silvia Magdalena, Zavaleta Muñoz Soraya Amalí	
Nivel de Depresión y estrés en alumnos de pregrado colonizados por Blastocystis: Reporte Preliminar	69
Olivas-Ruelas Guillermo, Muñoz-Yáñez Claudia, Guangorena-Gómez Janeth Oliva	

Editorial

LA REGLA DE LAS TRES ERRES

El 17 de mayo se estableció para concientizar a la población internacional para tratar de reducir el volumen de residuos generados y así mismo poder minimizar nuestra huella de carbono. Oficialmente la Organización de las Naciones Unidas para la educación, la ciencia y la cultura (UNESCO) estableció el día mundial del reciclaje en el año de 2005 no solo desde la vista del consumidor, sino de aquellos que extraen materia prima y la transforman.

Para ello se ha fomentado el día del reciclaje aplicando tres reglas. La primera de ellas es REDUCIR lo que implica que en el momento en que realiza una compra se intente adquirir productos a granel para evitar promover la generación de más envases, además en lugar de usar bolsas de plástico de un solo uso poder usar bolsas de tela o bien de papel.

La segunda regla es REUTILIZAR, con este punto se trata de darle a las cosas que ya se terminaron de ocupar y que se van a desechar a la basura otro uso, en este contexto las botellas, bolsas y cajas de cartón pueden reutilizarse como maceteros, decoración, construir otras cosas o para hacer manualidades.

La tercera regla es RECICLAR, ya que la mayoría de los materiales que se utilizan pueden reciclarse, unos ejemplos muy importantes son que si reciclamos 1000 kg de papel se evita la tala de 17 árboles, además aunque las botellas de vidrio tardan 5,000 años en degradarse se pueden reciclar infinitamente, lo que no ocurre con los envases plásticos. Para poder llevar a cabo un reciclaje más eficiente se deben separar los residuos y depositarlos en el contenedor correspondiente ya que esto ahorra energía, tiempo y recursos.

En el contenedor azul va el papel y el cartón, en el contenedor amarillo los envases como botellas, bolsas, latas, ayuda si se limpian los envases y se aplastan para reducir su volumen, en el contenedor verde claro va el vidrio de igual forma limpiando los envases y quitando las tapas, en el contenedor verde oscuro van los residuos de materia orgánica.

Pongamos todos, nuestro granito de arena y mejoremos como clasificamos y separamos los residuos para ayudar en el proceso de reciclaje.

Los niños y niñas del mundo



**Universidad Juárez del Estado
de Durango**



**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

BIOQUÍMICA

(Bioenergética, proteínas, metabolismo, productos bioactivos)



"Nada es tan divertido como un cambio total de ideas"
Lawrence Sterne (1713-1768); novelista británico.

Estudio *In silico* de los túneles proteicos de la succinato deshidrogenasa mitocondrial para 2-tenoiltrifluoroacetona mediante Caver Web 1.1

¹Valdez Solana Mónica Andrea, ¹Ventura García Erica Karime, ¹Aguilera Ortiz Miguel,

¹Meza Velázquez Jorge Armando, ¹Sierra Campos Erick.

¹Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango.
Artículo 123 S/N Fracc. Filadelfia. Gómez Palacio, Dgo. CP 35010.

*Email: ericksier@ujed.mx

RESUMEN

Los túneles proteicos son vías de acceso para sustratos, productos, cofactores, entre otras moléculas; a los sitios activos que se encuentran en el núcleo de proteínas con estructuras tridimensionales altamente complejas, principalmente las que tienen una función de catálisis. La succinato deshidrogenasa o Complejo II de la cadena respiratoria, es una enzima conocida por participar en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena de transporte de electrones. Esta a su vez ha sido relacionada con un gran número de enfermedades que incluyen el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, por lo que el empleo de moléculas para su inhibición ha adquirido relevancia terapéutica. Y la comprensión de los mecanismos de acción de sustancias como el 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA), un inhibidor conocido de la SDH, nos brinda información acerca de la razón de sus efectos en la enzima y estos pueden ser comparados con otras potenciales drogas cuyos efectos no son conocidos por completo. En este estudio, con el empleo del servidor Caver Web fue posible llevar a cabo un análisis de la trayectoria de este ligando a través de los túneles proteicos de la SDH, que en este caso fueron los túneles 2 y 8 de la enzima, ya que se demostró que estos conectan al grupo Hemo con el sitio de quinona distante (Q_D), y tener relación con la capacidad de esta sustancia de inhibir a la SDH. Además de demostrarse que estos túneles no solo actúan de una manera individual, sino que son capaces de unirse entre sí y conducir a los ligandos a otros sitios significativos de las enzimas.

Palabras clave: Caver Web; succinato deshidrogenasa; TTFA; PLIP.

ABSTRACT

Protein tunnels are access routes for substrates, products, cofactors, among other molecules; to the active sites found in the core of proteins with highly complex three-dimensional structures, mainly those with a catalytic function. Succinate dehydrogenase or Complex II of the respiratory chain, is an enzyme known to participate in the citric acid cycle and in the electron transport chain. This has been related to a large number of diseases including cancer and neurodegenerative diseases, so the use of molecules for its inhibition has acquired therapeutic relevance. And understanding the mechanisms of action of substances such as 2-Thenoyltrifluoroacetone (TTFA), a known inhibitor of SDH, gives us information about the reason for its effects on the enzyme and these can be compared with other potential drugs whose effects are not fully known. In this study, using the Caver Web server, it was possible to carry out an analysis of the trajectory of this ligand through the SDH protein tunnels, which in this case were tunnels 2 and 8 of the enzyme, since it was shown that these could connect the Heme group with the distant quinone site (Q_D), and be related to the ability of this substance to inhibit SDH. In addition to demonstrating that these tunnels not only act individually, but that they are capable of binding to each other and leading the ligands to other significant sites of the enzymes.

Keywords: Caver Web; succinate dehydrogenase; TTFA; PLIP.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas están conformadas por una o más cadenas peptídicas que forman estructuras tridimensionales altamente complejas que contienen muchas hendiduras internas, surcos, protuberancias y huecos. Aunque dichos espacios representan una desventaja para la estabilidad de la enzima, en diversas proteínas forman subestructuras funcionalmente importantes, como sitios activos, sitios de unión, sitios alostéricos, túneles y canales (Kingsley, L.J. y cols., 2015; Biedermannová, L. y cols., 2012). Los túneles se encuentran principalmente en proteínas globulares con función catalítica, es decir, enzimas; y sirven como vías de acceso a los sitios activos dentro de su núcleo para sustratos, productos, cofactores, moléculas de agua y/o inhibidores. También pueden conectar dos sitios activos distintos dentro de una sola proteína.

Experimentalmente, se ha demostrado que estas estructuras y sus propiedades pueden definir múltiples características relevantes de las proteínas, como la especificidad del sustrato, enantioselectividad, estabilidad y actividad. Por tanto, la comprensión de las vías de transporte, sus propiedades y el impacto en el paso de los ligandos es importante para descifrar la función de la proteína, así como para aplicaciones prácticas en los campos de la ingeniería de proteínas y el diseño de fármacos (Byška, J. y cols., 2015; Stourac, J. y cols., 2019).

La succinato deshidrogenasa (SDH), también conocida como complejo II, es una enzima mitocondrial con la propiedad de participar tanto en el ciclo del ácido cítrico, donde oxida succinato a fumarato, como en la cadena de transporte de electrones, donde reduce la ubiquinona a ubiquinol. Este complejo se compone de cuatro subunidades (SDHA-B-C-D), se encuentra incrustado en la membrana mitocondrial interna y exhibe un dominio orientado a la matriz mitocondrial y otro integrado en la membrana, que se encargan de realizar las dos reacciones químicas que producen fumarato y ubiquinol (Vavra, O. y cols., 2019; Moosavi, B. y cols., 2020). Los electrones son transferidos del succinato a la ubiquinona a través de los grupos prostéticos de la SDH, la flavina-adenina dinucleótido (FAD^+), los grupos $[2\text{Fe-2S}]$, $[4\text{Fe-4S}]$ y $[3\text{Fe-4S}]$ y el grupo hemo, que forman parte integral del complejo (Hagerhall, C., 1997).

Su función es regulada a través de distintas vías moleculares en diferentes especies. Además, esta enzima

ha evolucionado para tener funciones adicionales en ciertos microorganismos y células del sistema inmune con el fin de satisfacer las demandas de energía de las células. Comprender sus mecanismos reguladores y funciones específicas en la célula puede ser útil en medicina y agricultura de muchas maneras. En primer lugar, el conocimiento de los mecanismos reguladores en humanos puede informar estrategias para diseñar nuevas terapias contra enfermedades nocivas como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas causadas por un defecto en esta enzima. En segundo lugar, conocer los mecanismos reguladores de bacterias y hongos, así como sus funciones específicas en determinados patógenos puede proporcionar pistas para encontrar nuevos agentes antimicrobianos y fungicidas. En tercer lugar, comprender las funciones adicionales de SDH en las células inmunitarias humanas durante la respuesta inflamatoria puede inspirar el diseño de métodos artificiales para mejorar dicha respuesta cuando sea necesario (Dalla Pozza, E. y cols., 2020).

Por lo que potenciales inhibidores de la SDH tienen una gran relevancia en la actualidad con propósitos farmacológicos para las patologías mencionadas anteriormente. El 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA) se ha utilizado ampliamente en estudios que examinan el papel de las mitocondrias en la producción de especies reactivas de oxígeno, en la función celular y en la muerte celular; y ha demostrado actuar como un potente inhibidor del complejo mitocondrial II y de las carboxilesterasas (Zhang J. G. y cols., 2002). Algunos estudios sugieren que su mecanismo de acción se debe a su unión a los grupos de hierro-azufre de succinato-ubiquinona reductasa (Ingledew, W. J. y cols., 1977), también existe evidencia de que este es capaz de ocupar los sitios de unión a ubiquinona (Sun, F. y cols., 2005).

Caver Web 1.0 es un servidor en línea para el análisis de túneles y canales proteicos que permite estudiar el transporte de los ligandos a través de estos caminos. El programa es fácil de usar y solo requiere de la entrada de una estructura cristalográfica de la proteína del banco de datos de proteínas (PDB, <https://www.rcsb.org/>) para la identificación de un túnel y una lista de ligandos para el análisis de la trayectoria. Utiliza el algoritmo de acoplamiento de AutoDock Vina enriquecido para: mantener un átomo seleccionado de un ligando en un disco específico ubicado a lo largo del túnel o canal, es decir, posición de restricción; y acoplar el ligando en la vecindad del límite superior de una conformación de ligando anterior para mantener el movimiento continuo

del ligando a lo largo del túnel, es decir, restricción de patrón (Vavra, O. y cols., 2019). Además, ayuda a mejorar los resultados de proyección virtual mediante el análisis de la capacidad de los inhibidores potenciales para llegar a sus posiciones vinculantes (Stourac, J. y cols., 2019).

Es por esto que la finalidad de este estudio, fue evaluar la trayectoria del TTFA a través de los distintos túneles de la SDH y comprender más acerca de su mecanismo de acción y posibles efectos en la enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de la trayectoria del ligando tenoiltrifluoroacetona o TTFA (PubChem ID: 5601) en los túneles proteicos de la succinato deshidrogenasa (PDB ID: 1ZP0) fue llevado a cabo *In silico* utilizando el servidor Caver Web 1.1 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/caverweb/>). Para que el análisis fuera desarrollado por el programa, fue requerida la estructura cristalográfica de la proteína o el código PDB, así como la estructura 3D de la molécula estudiada en formato mol2.

En este caso, la enzima fue empleada como una unidad completa o tetramérica, ya que esta tiene 4 subunidades que la conforman. Y con esto Caver Web fue capaz de proporcionar los diferentes puntos de partida para el estudio, los cuales pueden ser una cavidad catalítica o alostérica, un ligando o una secuencia en la enzima. En este caso, fue seleccionada la cavidad correspondiente a el sitio de unión a quinona distante, esto en base a la unión del ligando TTFA en la subunidad D.

Para el diseño de los túneles, se utilizaron los parámetros de configuración predeterminados por el servidor. Los cuales fueron radio mínimo = 0.9, distancia máxima = 3, radio deseado = 5, umbral de agrupamiento = 3.5, profundidad y radio del caparazón = 4 y 3, respectivamente.

Los perfiles energéticos de la trayectoria fueron calculados en dirección in, empleando los túneles que fueran capaces de conectar al sitio Q_D con el grupo Hemo, en una modalidad de límite inferior y con un delta de discretización = 0.3 Å. Para después, calcular los parámetros de energía de activación (E_a) y la diferencia de energía entre el ligando unido en la superficie y en el sitio activo (ΔE_b), en base a los valores de energía de unión del ligando con la superficie ($E_{surface}$) y con el sitio activo (E_{bound}); y la energía máxima de transición (E_{max}).

Para determinar las interacciones débiles entre la succinato deshidrogenasa y el TTFA se empleo el servidor en línea de libre acceso (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) (Adasme, M. F. y cols., 2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El TTFA es un inhibidor de la respiración en animales y bacterias. En mamíferos, el TTFA se une en el sitio de reducción a quinona de la succinato ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II). Por tanto, previene la unión de la ubiquinona. En el caso de las bacterias, el TTFA inhibe a la NADH fumarato reductasa, además inhibe al fotosistema II en plantas y la NADH ubiquinona oxidoreductasa de la bacteria *Vibrio cholerae*, disminuyendo la producción de la toxina del cólera. Este compuesto es también un quelante de metales que incluyen el lantano, Zirconio y en neodimio.

Es importante mencionar que el TTFA presenta un mecanismo de unión bien caracterizado. En el cual se une al bolsillo formado por la hélice 2L (C38–C52), la hélice 2S (D77–D91) y la región de ligadura [3Fe–4S] (B214–B219 y B166–B175). El átomo de oxígeno del grupo tenoilo forma dos enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de Trp-B173 y Tyr-D91, y otro átomo de oxígeno del grupo trifluoroacetona interactúa con la cadena lateral de Tyr-D91 a través de una molécula de agua como mediador. El átomo de sulfuro del grupo tenoilo interactúa con el grupo hidroxilo de Ser-C42. El ambiente hidrofóbico formado por los residuos Trp-C35, Met-C39, Ile-C43, Ile-C30, Pro-B169 y Trp-B172 es favorable para la unión de TTFA, especialmente para los grupos fluoroformo y tiofeno.

También existe un sitio entre las subunidades C y D, en donde esta molécula es capaz de unirse. Dos moléculas de agua rodean al inhibidor y funcionan como mediadoras en esta interacción. El átomo de oxígeno del grupo tenoilo interactúa con la cadena lateral de Tyr-D61 por medio de agua. La interacción entre el átomo de azufre del grupo tenoilo y la cadena lateral de Trp-D134 está mediada por agua (Sun, F. y cols., 2005).

El programa Caver Web es una herramienta informática que permite conocer los posibles túneles presentes en proteínas globulares o complejos multiproteicos y los enlista en rango de relevancia en base a sus características de radio de cuello de botella, longitud y curvatura. En el caso del complejo II mitocondrial, los túneles

seleccionados para este estudio fueron el número 2 y 8, de los cuales se muestran sus características en la Tabla 1. Existen diferencias claras entre estos dos túneles, ya que el túnel 8 es aproximadamente tres veces más largo y menos ancho que el túnel 2. Por tanto, el túnel dos presenta la mayor relevancia farmacológica de 0.88 en contraste con el 0.54 del túnel 8.

Tabla 1. Principales propiedades de túneles seleccionados para análisis de trayectoria

Túnel	Radio de cuello de botella (Å)	Longitud (Å)	Curvatura	Relevancia farmacológica
2	3.0	11.9	1.2	0.88
8	1.8	37.5	1.4	0.54

Es importante mencionar que el programa Caver Web no solo presentó túneles individuales, ya que como se observa en la figura 1A, ambos túneles se conectan y comunican al grupo Hemo con el sitio Q_D de la succinato deshidrogenasa. Además, esta red logra ocupar toda la porción intramembranal del complejo. Este resultado *In silico* es muy interesante ya que el sitio Q_D tradicionalmente se consideraba de poca importancia fisiológica en el flujo de los electrones desde la FADH₂ a la quinona. Por lo cual estos dos túneles fueron empleados para el análisis de trayectoria del TFFA y conocer sus potenciales energías de unión a lo largo de la red (túnel 2-8). En la figura 1B se observa que el TFFA puede colocarse fácilmente en la cavidad del túnel 2 con una buena energía de unión y que esta no se ve afectada por la disminución del radio de botella del túnel 8. Por tanto, es muy probable que el TFFA no solo se una a los sitios de unión de quinona sino también puede ocupar una región del bolsillo del grupo hemo e inhibir a la enzima a diferentes niveles del flujo de electrones dentro del complejo II mitocondrial.

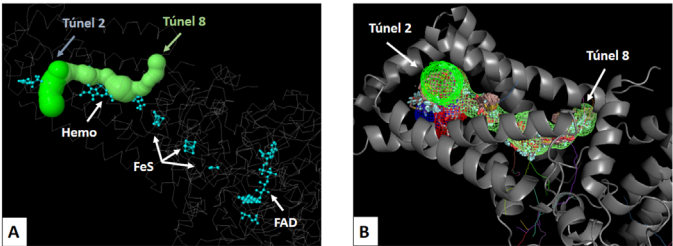


Figura 1. El panel A, muestra la visualización en esferas de los túneles 2 (verde brillante) y 8 (verde claro), y su ubicación con respecto al grupo Hemo, clusters FeS y cofactor FAD⁺ de la SDH. En el panel B, se muestra la trayectoria del TFFA en la enzima y la red de tuneles que participa en el transporte.

Al analizar los perfiles de trayectoria a través del túnel 2 (figura 2A) se observa que la energía de unión en la superficie fue de -4.3 Kcal/mol y que a una distancia de 5 a 7 Å el TFFA se une más eficientemente (-5.2 Kcal/mol) y al final del túnel 2 en el sitio activo marginal del ligando esta energía de unión cambia a -4.7 Kcal/mol.

En el caso del tunel 8, la energía de unión en la superficie fue de aproximadamente -5.0 Kcal/mol, este valor posteriormente fue disminuyendo a una distancia entre los 5 y 10 Å hasta alcanzar un valor de -2.5 Kcal/mol. A una distancia entre los 15 y 20 Å se observa un valle de energía de unión de -5.7 Kcal/mol y posteriormente en el sitio activo del ligando se alcanzó un energía de unión de -4.8 kcal/mol. Todos estos resultados nos indican que el TFFA mantiene sus interacciones con la proteína a lo largo de toda la red de tuneles.

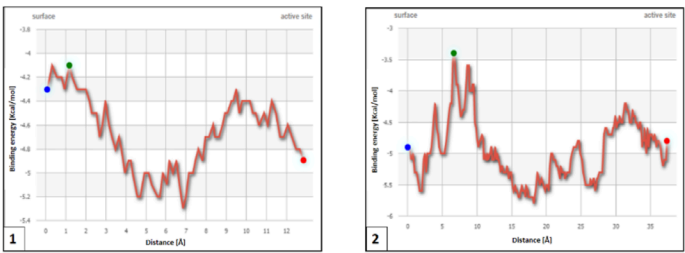


Figura 2. Perfiles energéticos de límite inferior de la trayectoria superficie-sitio alosterico del ligando TFFA para los túneles 2 (Panel 1) y 8 (Panel 2). Además, se encuentran señalados los valores empleados para los parámetros E_{surface} (azul), E_{bound} (rojo) y E_{max} (verde).

Además de los perfiles energéticos, Caver Web nos permite calcular una serie de parámetros termodinámicos de la interacción entre la enzima y el ligando. En la Tabla 2, se muestran los parámetros calculados para ambos túneles y como se puede observar, que la energía de unión fue un poco mayor para el túnel 8 con respecto al túnel 2. Sin embargo, la energía máxima fue menor para el túnel 8 que para el túnel 2. Es importante mencionar que el valor de energía de superficie fue similar para ambos túneles y que la energía de activación fue negativa para el túnel 2, pero el valor fue positivo para el túnel 8. Por último, la diferencia entre la energía de unión y la energía de superficie fue mayor para el túnel 2 y muy pequeña para el túnel 8.

Tabla 2. Resultados de perfiles de energía calculados para TFFA en túneles seleccionados

Parámetros	Túnel 2	Túnel 8
Energía de unión (E _{bound})	-4.3	-4.9
Energía máxima (E _{max})	-4.1	-3.4
Energía de superficie (E _{surface})	-4.9	-4.8
Energía de activación (E _a)	-0.8	1.4
Diferencial de energía (ΔE _{bs})	-0.8	-0.1

Por último, se realizó un análisis del tipo de interacción que se presenta en el sitio de unión al ligando en ambos túneles y aprovechar la información del modelado molecular que se obtiene del Caver Web. Para el sitio de unión del ligando en el túnel 2, el programa Protein-ligand interaction profiler (PLIP) nos reportó que el TFFA

forma cuatro puentes de hidrogeno con los residuos Trp134D, Thr199B, Met241B y Tyr245B. Mientras que para el sitio de unión del ligando del túnel 8, el programa PLIP nos indica que el TFFA interactúa con los residuos Arg46C, Pro169B e His216B mediante tres puentes de hidrogeno. Es importante mencionar que los residuos reportados anteriormente en general no coinciden con los reportados previamente en el estudio cristalográfico de la proteína, pero nos dan un acercamiento muy preciso de como el ligando se acomoda en el sitio de unión a través del análisis de trayectoria.

CONCLUSIÓN

Este estudio reportó por primera vez la existencia de una red de túneles que conectan al sitio Q_D con el grupo hemo de la succinato deshidrogenasa y que mediante el uso de herramientas informáticas fue posible conocer cómo se internaliza el TFFA desde la superficie de la cavidad hasta el sitio donde se une la quinona u otros grupos prostéticos del complejo II mitocondrial.

REFERENCIAS

- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic acids research*, 49(W1), W530-W534.10.
- Ingledew, W. J., & Ohnishi, T. O. M. O. K. O. (1977). The probable site of action of thenoyltrifluoroacetone on the respiratory chain. *Biochemical Journal*, 164(3), 617-620.
- Biedermannová, L., Prokop, Z., Gora, A., Chovancová, E., Kovács, M., Damborský, J. and Wade, R. C. (2012) A single mutation in a tunnel to the active site changes the mechanism and kinetics of product release in haloalkane dehalogenase LinB. *J. Biol. Chem.*, 287, 29062–29074.
- Byška, J., Le Muzic, M., Gröller, M. E., Viola, I., & Kozlikova, B. (2015). AnimoAminoMiner: Exploration of protein tunnels and their properties in molecular dynamics. *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, 22(1), 747-756.
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2020, February). Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 98, pp. 4-14). Academic Press.
- Hagerhall, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 107–141.
- Kingsley, L. J. and Lill, M. A. (2015) Substrate tunnels in enzymes: Structure–function relationships and computational methodology. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.*, 83, 599–611.
- Moosavi, B., Zhu, X. L., Yang, W. C., & Yang, G. F. (2020). Genetic, epigenetic and biochemical regulation of succinate dehydrogenase function. *Biological Chemistry*, 401(3), 319-330.
- Stourac, J., Vavra, O., Kokkonen, P., Filipovic, J., Pinto, G., Brezovsky, J., ... & Bednar, D. (2019). Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W414-W422.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057.
- 12. Tian, G., & Haffner, C. D. (2001). Linear relationships between the ligand binding energy and the activation energy of time-dependent inhibition of steroid 5α-reductase by Δ1-4-Azasteroids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21359-21364.
- Vavra, O., Filipovic, J., Plhak, J., Bednar, D., Marques, S. M., Brezovsky, J., ... & Damborsky, J. (2019). CaverDock: a molecular docking-based tool to analyse ligand transport through protein tunnels and channels. *Bioinformatics*, 35(23), 4986-4993.
- Zhang JG, Fariss MW: Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 2002 Feb 15;63(4):751-4.

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



Grupo disciplinario 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		
Monitoreo de <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> de rastros TIF de la Comarca Lagunera	M.C. Saulo Zuñiga Sosa	
Bio-economía regional de microalgas para el tratamiento de aguas residuales		
Microbioma: Salud ambiental, animal y humana	Dr. Jesús Vásquez Arroyo	

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

LGAC: Desarrollo e innovación de Alimentos

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Desarrollo de alimentos precocidos por extrusión a base de maíz pigmentado (<i>Zea mays</i> L.)	Miguel Aguilera Ortiz	
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.	Erick Sierra Campos	  
La inhibición de la proteína desacoplante por el extracto de la hoja de la <i>Moringa oleifera</i> favorece la recuperación de las células β pancreáticas en ratas diabéticas		
Los polifenoles del extracto de <i>Moringa oleifera</i> evitan la disfunción mitocondrial y estimulan el estado REDOX celular en ratas con diabetes tipo II.		
Identificación y efecto farmacológico de los polifenoles presentes en los azahares de la <i>Moringa oleifera</i>		
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 óxido nítrico sintasa		
Compuestos activos con capacidad hipoglucemiante en <i>Cnidoscolus chayamansa</i> (chaya), <i>Euphorbia prostrata</i> (Hierba de la golondrina), y <i>Jathropa dioica</i> (Sangre de drago).	Juan Ramón Esparza Rivera	
Producción de hortalizas de alta rentabilidad con sustratos y soluciones nutritivas orgánicas bajo invernadero.	Jorge Armando Meza Velázquez	
Diseño y uso de cubiertas comestibles a base de polisacáridos para aumentar la vida de anaquel de frutas y hortalizas		
Aplicación de tecnologías emergentes para la conservación de alimentos		

ALIMENTOS

(Alimentos funcionales, biotecnología e innovación de los alimentos)



*"Es curioso, pero solamente cuando ves a las personas hacer el ridículo,
te das cuenta de lo mucho que las quieres"*

Agatha Christie (1891-1976); escritora inglesa.

Análisis bromatológico y perfil químico por UHPLC de *Cordyceps militaris*

¹Valdez Solana Mónica Andrea, ¹Salazar Núñez Edgar Emmanuel, ¹Corral Guerrero Iván Artemio, ¹Aguilera Ortiz Miguel, ¹Meza Velázquez Jorge Armando, ¹Sierra Campos Erick

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango.
Av. Artículo 123 s/n Fracc, Filadelfia, 35010 Gómez Palacio, Dgo.

*Email: ericksier@ujed.mx

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la composición proximal y perfil químico por UHPLC del hongo *Cordyceps militaris* adquirido de Tlaxcala, México, y se comparó con *C. militaris* adquirido de China. Mediante un análisis bromatológico, se determinó humedad, proteínas, grasas, cenizas, fibra, carbohidratos totales y contenido energético. Como resultado para la cepa mexicana y china respectivamente se obtuvo 70.54 g y 68.35 g de carbohidratos, 9.55 g y 14.12 g de fibra, 4.23 g y 3.86 g de proteína, 5.33 g y 2.85 g de lípidos, 8.58 g y 5.48 g de humedad, 1.77 g y 5.34 g de cenizas y un contenido energético de 347.05 kcal y 314.49 kcal. Finalmente, por medio de UHPLC se determinaron 6 micro metabolitos, de los cuales se identificaron a la adenosina y cordicepina. El cultivo de *C. militaris* en México en comparación con el chino, conlleva a un aumento del valor nutrimental de la cepa, además de una mayor producción de cordicepina, el cual es un metabolito con alto valor terapéutico. La composición proximal de ambas muestras se encuentra dentro de los rangos normalmente reportados, en donde el factor determinante para la variación dentro de su composición serán los medios utilizados durante su cultivo, ya que, en el caso particular de este hongo, suponen un coste elevado.

Palabras clave: *Cordyceps militaris*, análisis bromatológico, composición proximal, contenido energético, perfil químico, UHPLC, cordicepina.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the proximate composition and chemical profile by UHPLC of the *Cordyceps militaris* mushroom acquired from Tlaxcala, Mexico, and China. Moisture, protein, fat, ash, fiber, total carbohydrates and energy content were determined by bromatological analysis. The results for the Mexican and Chinese strains were 70.54 g and 68.35 g of carbohydrates, 9.55 g and 14.12 g of fiber, 4.23 g and 3.86 g of protein, 5.33 g and 2.85 g of lipids, 8.58 g and 5.48 g of moisture, 1.77 g and 5.34 g of ash and an energy content of 347.05 kcal and 314.49 kcal, respectively. Finally, 6 micro metabolites were determined by UHPLC, of which adenosine and cordycepin were identified. The cultivation of *C. militaris* in Mexico, compared to the Chinese, leads to an increase in the nutritional value of the strain, in addition to a higher production of cordycepin, which is a metabolite with high therapeutic value. The proximate composition of both samples is within the normally reported ranges, where the determining factor for the variation in their composition will be the media used during their cultivation, since, in the particular case of this fungus, they involve a high cost.

Keywords: *Cordyceps militaris*, proximate analysis, nutritional composition, energy content, chemical profile, UHPLC, Cordycepin.

INTRODUCCIÓN

El género *Cordyceps* tienen alrededor de 750 especies identificadas que se distribuyen en muchas regiones del mundo, pero se encuentran principalmente en el sur de Asia, Europa y América del Norte. Treinta y cinco especies de *Cordyceps* han sido reportadas en la literatura con propiedades medicinales o tiene un informe sobre el aislamiento de compuestos bioactivos. La diversidad fitoquímica de este género presenta más de 200 metabolitos que incluyen nucleósidos, esteroides, péptidos cíclicos, flavonoides, dihidrobenzofuranos, bioantracenos, policétidos, terpenos, alcaloides y fenoles aislados de varias especies de *Cordyceps* (Olatunji et al., 2018).

El hongo oruga medicinal *Cordyceps militaris* es una especie entomopatógena que infecta y crece parasitariamente en larvas o pupas de lepidópteros. Se caracteriza por la producción de estromas de color naranja a rojo anaranjado que brotan del cadáver del huésped muerto. *C. militaris* es uno de los hongos medicinales más importantes y conocidos; es capaz de estimular el rendimiento energético, el sistema inmunitario, cuenta con efectos cardioprotectores, capaz de estabilizar los niveles de glucemia, además de actuar como promotor del crecimiento. Este hongo es bastante codiciado por la cordicepina, nucleósido con propiedades antitumorales, antifúngicas y antivirales, por lo que se utiliza como terapia complementaria a pacientes que ya están sometidos a quimioterapia (Ouyang et al., 2018).

C. militaris tiene un tipo de cultivo bastante complejo, ya que, al ser un hongo parásito, requiere el acondicionamiento específico del hospedero para crecer de manera adecuada, la producción de esporocarpos de *C. militaris in vitro*, conlleva a una producción de cordicepina y adenosina menor en comparación a sus homólogos recolectados de manera silvestre, por lo que la adquisición de cuerpos fructíferos de manera comercial es bastante costosa. Los cuerpos fructíferos de *C. militaris* pueden ser adquiridos de libre venta en forma seca completa, polvo, capsulas y extracto. Sin embargo, el crecimiento lento y la especificidad del hospedero son dos aspectos que limitan la producción en masa, por lo que en los últimos años se ha preferido aislar cepas vivas y cultivarlas en biorreactores para lograr satisfacer las necesidades de consumo y reducir la presión sobre los recursos naturales. Actualmente se ha desarrollado el cultivo de micelio de *C. militaris* utilizando medios artificiales en los que se han informado varios métodos

para la producción de cordicepina, como el cultivo en superficie (Masuda et al., 2007) y el cultivo sumergido (Mao et al., 2005; Liu et al., 2015).

C. militaris presenta amplia distribución en México y se ha recolectado sobre larvas y pupas de lepidópteros nocturnos de las familias Geometridae, Noctuidae y Sphingidae en diferentes tipos de bosques como: bosque mesófilo de Montana, bosques de Pinus-Quercus, bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical perennifolio, bosques de Abies Mill, Tsuga Carrière y Picea Link con vegetación decidua (Rubio-Bustos et al., 1999)

En México sólo se ha extraído cordicepina del cultivo *in vitro* en medio líquido de una especie silvestre de *Cordyceps sp*, lo cual indica que especies de entomopatógenos silvestres de México tienen potencial de ser cultivadas en laboratorio para optimizar la producción de biomasa, cordicepina y otros metabolitos (López, 2017). Por su amplio espectro terapéutico y su constitución altamente nutritiva, *C. militaris* podría ser un buen candidato como alimento funcional. Por tanto, es indispensable implementar técnicas de cultivo *in vitro*, realizar estudios bromatológicos y metabolómicos para iniciar el aprovechamiento sustentable como alimento funcional de las especies silvestres del género *Cordyceps*.

El contenido nutricional de los hongos varía de acuerdo con la especie, su etapa de desarrollo, así como de la región en la que crecen, época del año y tipo de suelo. Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar la composición proximal y el perfil químico por UHPLC del hongo *C. militaris* cultivado en México, y realizar su comparación con aquel cultivado en China.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra para el análisis bromatológico

La muestra de *Cordyceps militaris* fue adquirida de manera comercial, por un distribuidor ubicado en Tlaxcala, México, mientras que la muestra China fue adquirido mediante internet. Una vez que fue recibido se verificó su estado, el cual se encontró en estado seco con una apariencia similar a hojuelas de maíz y tonalidad amarillo naranja. Una vez que se verificó su apariencia, se tomaron fotos y posteriormente las muestras de hongo fueron pulverizadas en una licuadora convencional para los pasos posteriores.

Humedad

Se pesaron 1.5 gramos de hongo previamente pulverizado, y se colocaron en crisoles a peso constante. Posteriormente se llevaron a un horno de convección natural 65 litros-thermo scientific-51028112-OGS60 durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se registró el peso perdido para poder determinar la humedad presente en la muestra donde a el peso del crisol a peso constante con la muestra seca (P) se le restó el peso del crisol sin muestra (P1), sobre los gramos empleados para la determinación, donde todo se multiplica por 100 (AOAC Official Method 930.04, 1997).

$$\text{Humedad} = \frac{(P - P1)}{\text{g de muestra}} \times 100$$

Proteína

Se pesaron 0.5 g de hongo pulverizado, y se realizó el proceso Kjeldahl para determinación de proteínas, empleando digestor Kjeldahl de marca LABCONCO clave LABCO05011 y destilador Kjeldahl MODEL 65000. El volumen de reactivos se ajustó empleando una cantidad cuatro veces inferior a la establecida por el método de la AOAC. Para el cálculo se emplea la siguiente fórmula: (Proteína AOAC Official Method 978.04, 1997).

$$\% N = \frac{(\text{gasto en mL} * N \text{ HCl} * 0.014 * 100)}{\text{g de muestra}}$$

Grasa

Determinación de grasa (AOAC, 985.15, 1990).

La determinación del contenido lipídico en el hongo, se realizó por el método de Goldfish. Brevemente, se pesaron 2 g que previamente fueron desecadas. Se colocaron en un dedal de celulosa, y enseguida se añadieron 50 mL de éter de petróleo al vaso Goldfish llevado a peso constante durante 24 h en una estufa a 100°C; Se colocó en el aparato de extracción de grasas tipo Goldfish marca CRAFT® junto con el dedal que contiene la muestra, la cual se dejó a reflujo por espacio de 1 hora 15 minutos aproximadamente. Se retiró el vaso y se registró el peso ganado en dicho vaso.

$$\text{Grasa} = \frac{(\text{Peso ganado en vaso goldfish} - \text{peso de vaso goldfish})}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Cenizas

De acuerdo con el método de la (AOAC., 923.03, 1990).

En un crisol a masa constante, se puso 1.5 g de muestra previamente desecados; se colocó el crisol con muestra en una parrilla y se quemó lentamente el material hasta que ya no desprendió humos, evitando que se proyectara fuera del crisol.

Se llevó el crisol a una mufla y se efectuó la calcinación completa (550 - 600°C x 60 minutos según el método del A.O.A.C.) Se dejó enfriar en la mufla, se transfirió al desecador para su completo enfriamiento y se determinó la masa del crisol con cenizas. Se realiza el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas} = \frac{(P - p)}{M} \times 100$$

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos. p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos.

Fibra

Se realizó la determinación de este método en base a la **Norma Oficial Mexicana NOM-F-90-S-1978 Determinación de Fibra Cruda en Alimentos**. Este método se basa en la digestión ácida y alcalina de la muestra obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que con calcinación posterior se determina la fibra cruda. Para la determinación de fibra, se empleó el equipo para fibra Cruda marca CRAFT®, también llamado Multiunidades de Extracción. El objetivo en este equipo es producir un sistema de digestión simulada, en donde las muestras sometidas a dicha digestión al final de la prueba contienen partes no digestibles tales como celulosa y otros materiales.

$$\text{Fibra cruda} = \frac{(Ps - Pc) - 2}{M} \times 100$$

Ps = masa en gramos del residuo seco M = masa de la muestra en gramos.

Pc = masa en gramos de las cenizas.

Carbohidratos

El contenido total de carbohidratos se calculó sustrayendo a cien los contenidos de ceniza, grasa, fibra, humedad y proteína, expresados como g/100 g.

Por último, la energía proporcionada por 100 g de hongo seco se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Energía (kcal/100 g)} = \text{Carbohidratos} \times 4 + \text{Grasa} \times 9 + \text{Proteína} \times 4$$

Los carbohidratos y proteínas aportan 4 kcal/g, mientras que la grasa aporta 9 kcal/g.

Preparación de los extractos de *Cordyceps militaris* y estándar de cordicepina

Se procesaron 7 gramos del esporocarpo de *C. militaris*, se suspendió en 35 mL de etanol (TEDIA UN1170) grado HPLC, el extracto paso por baño ultrasónico a 42 KHZ (BRANSONIC 3510R-MTH) por 2 horas, las muestras fueron filtradas y centrifugadas 3500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, y concentrado en rotavapor (BUCHI R-210) hasta obtener un volumen final de 6 mL. El estándar de Cordicepina fue adquirido de Merck (C3394-25MG) y preparado a 62.5 pg/mL en etanol HPLC.

Análisis por UHPLC

Para el análisis por UHPLC (Thermo DIONEX-uHPLC UltiMate 3000), los extractos acuosos de *C. militaris* fueron diluidos 1:2000 en etanol grado HPLC respectivamente, y fueron pasados por un filtro para jeringa con un poro de 0.22 μm (MS PTFE Syringe Filter) antes de ser inyectados. El ensayo por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución, se llevó a cabo en una columna Hypersil GOLD™ aQ C18 (100 mm x 2.1 mm tamaño de partícula 1.9 μm) a una temperatura de 30°C, se cargaron 3 μL de cada muestra por auto muestreador a 10°C en un loop de 100 μL . El gradiente de elución fue programado de la siguiente manera: minuto 0 - 2 (B) 65%, minuto 2 - 30 (B) 90%, minuto 30 - 70 (B) 90%. El tiempo total de la corrida fue de 70 minutos a un flujo de 0.1 mL/min, se utilizó el detector de fluorescencia (DIONEX UltiMate 3000) a 45°C, con una longitud de onda de excitación de 270nm y emisión de 334 nm y electroquímico a un potencial de 800 mV a 27°C (DIONEX UltiMate 3000).

RESULTADOS

Como se observa en la figura 1, la muestra china tiene un tono naranja en comparación a la mexicana con una tonalidad amarillo, además, el *C. militaris* chino tiene un tamaño mayor y una forma alargada, en contraste la muestra mexicana es más pequeña, y estos datos sugieren que las condiciones de cultivo, cosecha y origen fueron distintas para ambas muestras. Por tanto, es necesario determinar la cantidad de nutrientes y metabolitos para determinar su potencial uso terapéutico.



Figura 1. Captura fotográfica del hongo *Cordyceps militaris*, donde el panel A corresponde a la muestra mexicana, mientras que en el panel B se muestra a su homólogo de origen chino.

En el análisis bromatológico se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros importantes de la composición proximal entre el *C. militaris* de origen mexicano y el chino, los cuales se muestran en la Tabla 1.

El contenido de humedad en el *C. militaris* mexicano fue 1.5 veces mayor que el chino. Basándose en el peso seco, ambas muestras de hongos presentaron un contenido bajo en proteína total en un rango de 3.86 g a 4.23 g, ligeramente más alta que el contenido en el cordyceps chino, pero sin diferencias significativas. Es interesante mencionar que el contenido lipídico en el hongo mexicano fue aproximadamente dos veces mayor que el hongo chino. Mientras que en el contenido de cenizas, la muestra china posee una cantidad tres veces mayor de minerales que la muestra mexicana.

Para el *C. militaris* mexicano, el contenido de fibra correspondió a 9.55 g, mientras que en el chino presento un contenido mayor, siendo de 14.12 g. Además, ambas muestras de *C. militaris* tienen un contenido en carbohidratos semejante (70.54 y 68.35 g). Finalmente para los valores de contenido energético, el *Cordyceps militaris* mexicano presenta un aporte de (347.05 kcal/100g) el cual es 10% mayor que el que se adquirió de China (314.49 kcal/100 g).

Los carbohidratos se calcularon por diferencia restando a 100 los valores obtenidos de los demás parámetros.
*P = <0.001

Tabla 1. Composición nutricional del hongo *Cordyceps militaris*.

Parámetro	g/100 g de <i>Cordyceps militaris</i> (mexicano)	g/100 g de <i>Cordyceps militaris</i> (chino)
Humedad (g / 100 g)	8.58 ± 0.04	5.48 ± 0.02*
Cenizas (g / 100 g)	1.77 ± 0.09	5.34 ± 0.13*
Grasa (g / 100 g)	5.33 ± 0.1	2.85 ± 0.08*
Proteínas (g / 100 g)	4.23 ± 0.05	3.86 ± 0.05*
Fibra (g / 100 g)	9.55 ± 0.15	14.12 ± 0.4*
Carbohidratos totales (por diferencia) (g / 100 g)	70.54	68.35
Contenido energético (Kcal / 100 g)	347.05	314.49*

Los carbohidratos se calcularon por diferencia restando a 100 los valores obtenidos de los demás parámetros. *P = <0.001

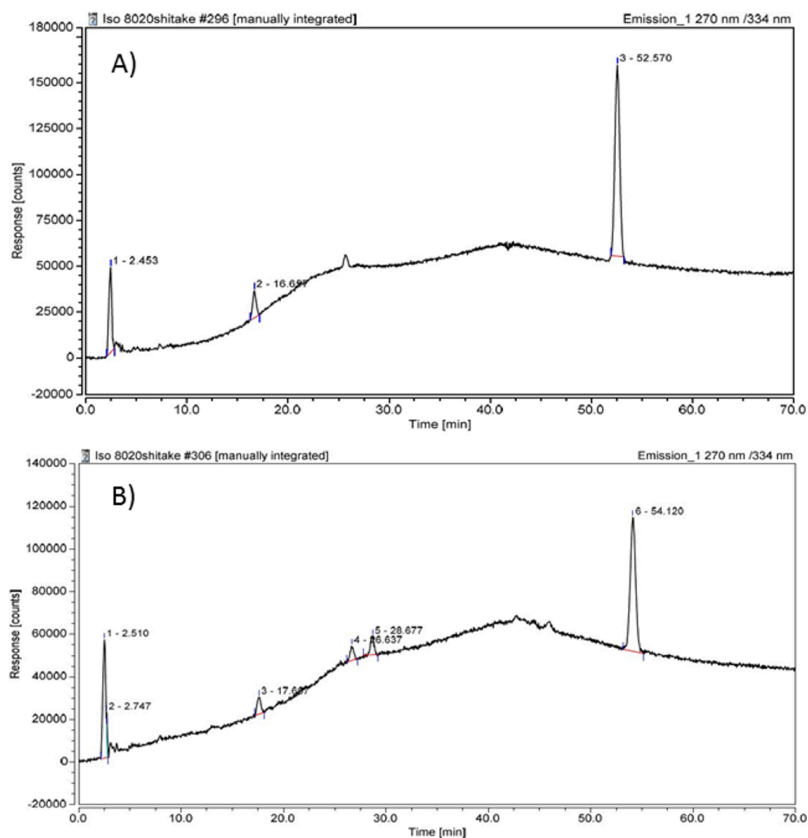
Además de evaluar el contenido de macronutrientes, se realizó un análisis fitoquímico mediante UHPLC a los extractos hidroalcohólicos del hongo. Existen diversos métodos para separar y detectar los principales componentes en las diferentes especies de *Cordyceps* sp. Por tanto, se realizó y validó un método empleando una columna Hypersil GOLD™ aQ C18 como fase estacionaria y un gradiente de elución de dos componentes (Agua con 0.1% de ácido fórmico y Acetonitrilo) con un detector de fluorescencia con una longitud de excitación de 270 nm y de emisión de 334 nm. Bajo estas condiciones experimentales se lograron separar todos los componentes de las muestras y los datos demostraron que en *C. militaris*, existen 6 compuestos

de mayor abundancia, los cuales corresponden a los micronutrientes presentes en el hongo, la adenosina presentó un tiempo de retención (tR) de 2.5 min y la cordicepina presentó un tR de 53.0 min (Figura 2).

Al comparar el cociente cordicepina/adenosina entre ambas muestras se logró observar que la muestra mexicana presentó un valor C/A de 3.7 en comparación con la muestra china cuyo valor C/A fue 2.1. Estos resultados sugieren que el hongo mexicano posee de dos a tres veces más cordicepina. Además, ambas muestras mostraron un nivel semejante del pico 3. Sin embargo, esta misma muestra no cuenta con 3 de los componentes (pico 2, 4 y 5) detectados en el hongo chino, los cuales no fueron identificados en este estudio, pero se sugiere pueden ser otros nucleósidos, dihidrobenzofuranos y bioxantracenos (Tabla 2).

Tabla 2. Área relativa de los principales componentes del extracto etanólico de *C. militaris*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área relativa <i>C. militaris</i> mexicano (%)	Área relativa <i>C. militaris</i> chino (%)
Pico 1 (Adenosina)	2.45 - 2.51	19.51	26.27
Pico 2 (desconocido)	2.74	No detectado	2.69
Pico 3 (desconocido)	16.65 - 17.66	7.87	5.01
Pico 4 (desconocido)	25.4 - 26.63	No detectado	3.98
Pico 5 (desconocido)	28.67	No detectado	4.79
Pico 6 (Cordicepina)	52.57 - 54.12	72.62	57.26

**Figura 2.** Cromatograma de fluorescencia representativo. A) extracto de *C. militaris* cultivado en México; B) extracto de *C. militaris* cultivado en China.

DISCUSIÓN

De acuerdo con Sakakibara *et al* (2010) la especie *Cordyceps militaris* ha sido utilizada por su actividad farmacológica anticancerígena, antiinflamatoria, inmuno-potencializadora y reguladora. Además, se le ha reconocido la capacidad de producir componentes con actividad biológica como adenosina, cordicepina y exopolisacáridos, ergosterol y manitol y péptidos como cordimina con actividad antifúngica. Respecto a enzimas, se conocen aquellas con actividad fibrinolítica.

En base a Nguyen *et al* (2006) el contenido proteico de *C. militaris* presenta una cantidad abundante de aminoácidos esenciales como metionina y lisina. Por otro lado, se han detectado en el hongo otras proteínas como albúmina y globulina, con las que se tratan personas que tengan hepatitis B y colesterol alto, por lo que previene la aterogénesis.

Hay diversos componentes que suelen emplearse para cultivar *C. militaris*, donde la función es proveer una alta cantidad de fuente de carbono, así como de nitrógeno, lo cual no solo permite aumentar el contenido nutrimental del hongo una vez que se ha recolectado, sino también ayuda a aumentar la producción de cordicepina. Respecto a las principales fuentes de carbono se emplean glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, manosa, celulosa, fructosa y carboximetilcelulosa, los cuales se adicionan a medios experimentales de extracto de levadura y peptona. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, se utilizan levadura, soya, triptona, extracto de malta, hidrolizado de caseína, peptona proteica, Bacto™ peptona y suero de leche.

Kim *et al* (2019) realizaron un estudio donde investigaron los efectos del componente medio en la producción de cordicepina utilizando diversas fuentes de carbono y nitrógeno. Se encontró que la glucosa y el hidrolizado de caseína (CH) fueron los más efectivos como fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de cordicepina (2.3 veces más en comparación al resto de los componentes empleados) con una producción máxima de cordicepina de aproximadamente 445 mg/L. Este antecedente nos indica que posiblemente la calidad de la fuente de carbono y nitrógeno utilizada en la muestra mexicana para su cultivo fue de mejor calidad que su contraparte china (Tabla 2).

Chan *et al* (2015) realizaron un análisis proximal a la especie *Cordyceps militaris* donde cultivaron y obtuvieron una cepa CBS-132098 de *C. militaris*. Ellos cultivaron al

hongo *Cordyceps militaris* en un medio con componentes como glucosa, peptona, extracto de levadura, KH_2PO_4 y MgSO_4 . Según dicho estudio, el valor energético del cuerpo fructífero de *C. militaris* cepa CBS-132098 es de 401 kcal/100 g, superior al del micelio de *C. militaris* (336 kcal/100 g).

En la tabla 3, se realizó un análisis comparativo del análisis proximal de este estudio con aquel realizado por Chan *et al.*, 2015. Es interesante mencionar que los niveles de proteína de este trabajo fueron solo un 10% de aquellos reportados por la referencia y que el contenido de grasa y cenizas fueron semejantes al micelio de la CBS-132098.

Tabla 3. Composición nutricional de la referencia vs este estudio.

Parámetro	<i>Cordyceps militaris</i> (cuerpo fructífero) (CBS-132098)	<i>Cordyceps militaris</i> (micelio) (CBS-132098)	<i>Cordyceps militaris</i> (cuerpo fructífero) (GK-101)	<i>Cordyceps militaris</i> (cuerpo fructífero mexicano)	<i>Cordyceps militaris</i> (cuerpo fructífero chino)
Humedad (%)	5.7 ± 0.77	13.1 ± 1.1	3.15	8.58 ± 0.04	5.48 ± 0.02*
Cenizas (%)	5.1 ± 0.06	5.7 ± 0.22	5.63	1.77 ± 0.09	5.34 ± 0.13*
Grasa (%)	8.8 ± 0.12	2.2 ± 0.13	34.51	5.33 ± 0.1	2.85 ± 0.08*
Proteínas (%)	59.8 ± 3.63	39.5 ± 1.4	17.77	4.23 ± 0.05	3.86 ± 0.05*
Carbohidratos totales (%)	29.1 ± 0.81	39.6 ± 2.81	38.94	70.54	68.35
Contenido energético (Kcal / 100 g)	401 ± 1.8	336 ± 12	401	347.05	314.49*

*P = <0.001

Es posible observar que los valores obtenidos a partir de los cuerpos fructíferos del *Cordyceps* CBS-132098 son aproximados a los obtenidos con las cepas mexicana y china, presentando solamente una amplia variación en el contenido proteico, que puede deberse a la técnica o factor de conversión empleados para su determinación, así como las condiciones y medios de crecimiento utilizados, como las fuentes de nitrógeno que pudiesen haberse empleado (levadura, soya, triptona, extracto de malta, etc.).

Por otro lado, Huang *et al* (2006) informaron en su estudio los contenidos de carbohidratos, cenizas brutas, fibra, grasas y proteínas en el cuerpo fructífero de *C. militaris* (GK-101). Según la literatura, la discrepancia en la composición proximal del cuerpo fructífero se debe principalmente a las diferencias en las cepas utilizadas, el origen ecológico y las condiciones de cultivo. Ellos trabajaron con un cultivo puro de *C. militaris* (GK-101) donde, para la producción del hongo el cultivo se inoculó en un matraz que contenía 1,5 L de medio líquido y se incubó a 25°C y 100 rpm. El medio líquido (1 L) estaba compuesto por 20 g de sacarosa, 10 g de extracto de levadura, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de KH_2PO_4 y 1 g de MgSO_4 a pH 6,0. Tras 14 días de incubación, los

hongos se cosecharon y se lavaron cinco veces con agua desionizada y se liofilizaron.

Dado que los *Cordyceps* son muy difíciles de recolectar debido a su pequeño tamaño y a su restringida área de crecimiento, la producción en masa de estos hongos se ha establecido mediante el cultivo artificial. Lee *et al* (2015) cultivaron *C. militaris* seco en un medio floral compuesto por gluten, proteína de soja, levadura de cerveza y licor de maíz (el método de cultivo y la composición del medio fueron patentados en Corea (Lee, 2006). Los autores informaron que los cuerpos fructíferos de *C. militaris* utilizados en su estudio contenían alrededor de 2.3 veces más cordicepina (1,6 mg/g de MS) que *C. militaris* cultivado tradicionalmente en pupas de fauna (0,7 mg/g de MS). Contenía 8,6% de humedad, 76,2% de carbohidratos totales, 12,2% de fibra bruta, 1,0% de extracto de éter, 3,2% de ceniza bruta, y 7,4% de extracto libre de nitrógeno.

Mediante análisis UHPLC se pudieron determinar 6 picos, de los cuales los más abundantes fueron la adenosina y cordicepina, los demás metabolitos no pudieron ser identificados, pero acorde a lo reportado por Ronming Yu 2007, lo más probable es que se trate de distintos nucleósidos. Es importante mencionar que el cociente C/A reportado en este estudio estuvo en el rango de 2.1 a 3.7 y estos valores fueron inferiores a los reportados por un estudio realizado con muestras de Tailandia (Eiamthaworn *et al.*, 2022). Es importante mencionar que nuestro método fue capaz de identificar adenosina y cordicepina en las muestras de *C. militaris* y que tanto el perfil cromatográfico como las cantidades encontradas de 1.5 mg/g y 3.8 mg/g, respectivamente están acordes a lo reportado previamente en la literatura (Yu, *et al.*, 2006).

El cultivo de *C. militaris* mexicano, conlleva a que las condiciones son las ideales para una mayor producción de cordicepina comparado a la cepa China, lo que lo hace terapéuticamente de mayor interés y valor. Sin embargo, se requiere de más estudios biomédicos para caracterizar sus efectos en células aisladas y modelos animales.

CONCLUSIÓN

El perfil químico obtenido por UHPLC del hongo medicinal *C. militaris* adquirido de dos regiones completamente distintas (México y China), presentó una mayor concentración de cordicepina para la muestra mexicana con respecto a la china, mientras que la

cantidad de adenosina en la muestra china fue mayor que la mexicana. Adicionalmente, la muestra china presentó tres componentes (pico 2,4 y 5) que la muestra mexicana no tiene. En el caso de la composición proximal, los parámetros que tuvieron diferencia con respecto a las referencias fueron cenizas, proteínas y carbohidratos presentando mayor cantidad en la muestra china que la mexicana. En comparación entre la muestra china y mexicana los parámetros que más se destacaron fueron humedad, cenizas y grasas.

REFERENCIAS

- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 15th ed. Washington, DC: AOAC; 1990.
- Boontiam W, Wachirapakorn C, Wattanachai S (2020) Growth performance and hematological changes in growing pigs treated with *Cordyceps militaris* spent mushroom substrate, *Veterinary World*, 13(4): 768-773.
- Burrola-Aguilar, C., & López Rodríguez, L. (2019). Hongos parásitos de insectos y otros hongos: una alternativa de alimento funcional. *Agro Productividad*, 12(5).
- Chan, Jannie & Barseghyan, Gayane & Asatiani, Mikheil & Wasser, Solomon. (2015). Chemical Composition and Medicinal Value of Fruiting Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Caterpillar Medicinal Fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*.
- Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. & Sakakibara M. (2010). Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), 961-968.
- Eiamthaworn K, Kaewkod T, Bovonsombut S, Tragoolpua Y. Efficacy of *Cordyceps militaris* Extracts against Some Skin Pathogenic Bacteria and Antioxidant Activity. *Journal of Fungi*. 2022; 8(4):327. <https://doi.org/10.3390/jof8040327>
- Huang SJ, Tsai SY, Lee YL, Mau JL. Nonvolatile taste components of fruit bodies and mycelia of *Cordyceps militaris*. *LWT – Food Sci Technol*. 2006;39:577–83.
- Isaka M, Kirtikara K, Hywel-Jones NL, Thebtaranonth Y. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc Chem Res*. 2005;38:813–23.

- Jung E., Kim K., Bae C., Kim J. K., & Kim H. (2007). A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 833-838.
- Kim J., Sapkota K., Park S., Choi B., Kim S., Nguyen T., y otros. (2006). A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Microbiol*, 622-631.
- Liu JM, Zhong YR, Yang Z, Cui SL, Wang FH. Chemical constituent of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1989;14:608-9.
- Liu JM, Yang S, Yang X, Chen Z, Li J. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris*. *Zhongguo Yao Za Zhi*. 1997;22:111-3.
- Masuda M, Urabe E, Sakurai A, Sakakibara M. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzym Microb Technol*. 2006;39:641-6.
- Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Int J Med Mushrooms*. 1999;1:9-30.
- Muller WEG, Seihard G, Beyer R, Breter HJ, Maidhof A, Zahn RK. Effects of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzymes. *Cancer Res*. 1977;37:3824-33.
- Olatunji OJ, Tang J, Tola A, Auberon F, Oluwaniyi O, Ouyang Z. The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Fitoterapia*. 2018 Sep;129:293-316. doi: 10.1016/j.fitote.2018.05.010. Epub 2018 May 24. PMID: 29775778.
- Rubio-Bustos S., Guzmán-Dávalos L. y Navarrete-Heredia J. L. (1999). Especies entomopatógenas de *Cordyceps* (Fungi Ascomycotina) en México. *Boletín del Instituto de Botánica*, 7, 135-157.
- Shih IL, Tsai KL, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem Eng J*. 2007;33:193-201.
- Shen Q, Chen S. Effect of *Cordyceps militaris* on the damage of rats induced by n-hexane. *Zhong Yao Cai*. 2001;24:112-6.
- Varshney VK, Pandey A, Kumar A, Rathod D, Kannoja P. Chemical screening and identification of high cordycepin containing cultured isolate(s) of medicinal Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.). *Int J Med Mushrooms*. 2011;13:327-33.
- Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms*. 2010;12(1):1-16.
- Yu L., Zhao J., Li S. P., Fan H., Hong M., Wang Y. T., & Zhu Q. (2006). Quality evaluation of *Cordyceps* through simultaneous determination of eleven nucleosides and bases by RP-HPLC. *Journal of Separation science*, 29(7), 953-958.

Principales factores de contaminación por *E. coli* en carne bovina, alternativas de detección y control de calidad

Study of the main factors of contamination by *E. coli* in bovine meat, alternatives of detection and quality control

¹Reyes-De Los Santos, J. G., ²Femenia-Marroig, A., ³González-Laredo, R. F.,

¹Olivas-Calderón, E. H., ^{1*}Rodríguez-González, V. M.

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

²Área de Ingeniería Química, Departamento de Química, Universitat de les Illes Balears, Ctra. Valldemossa Km. 7.5, E-07071 Palma de Mallorca, España.

³Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Durango, Blvd. 10 Felipe Pescador 1830 Ote., 34080, Durango, Dgo. Mexico.

*E-mail: vicrogfcq7@ujed.mx

RESUMEN

La carne con su valor nutricional derivado de sus proteínas, que es procesada para su venta al público, es un alimento que puede ser afectado por algunos factores en la proliferación de microorganismos, que podemos categorizarlos en parámetros intrínsecos y parámetros extrínsecos, además de otras condiciones que pueden estar involucradas a lo largo del proceso. La *Escherichia coli* es una de las bacterias que se encuentran principalmente en el ganado bovino, dentro de la clasificación encontramos seis tipos de acuerdo en su función de mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia. Las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por el consumo de agua o comida contaminada, la cual puede ocurrir de forma endógena, o bien ocurrir en algún punto del procesamiento y transformación. Al ser un problema de salud pública a nivel mundial que afecta a cualquier persona de cualquier edad y que genera graves enfermedades gastrointestinales, implica una preocupación en la industria alimentaria que deriva de la prevalencia de *E.coli*, la cual es común identificarla en la carne bovina. Es por eso que es importante conocer, controlar y asegurar los diferentes procesos que están involucrados en la manipulación y conservación de los alimentos aplicando el control de calidad en la industria cárnica.

Palabras Clave: *E. coli*, Carne bovina, Control de calidad.

ABSTRACT

Meat with its nutritional value derived from its proteins that is processed for sale to the public is a food that can be affected by some factors in the proliferation of microorganisms where we can categorize them in intrinsic parameters and extrinsic parameters, in addition to other conditions that may be involved throughout the process. *Escherichia coli* is one of the bacteria that are mainly found in cattle, within the classification we find six types of agreement in their function of pathogenicity mechanisms and virulence factors. Foodborne illnesses are caused by the consumption of contaminated food or water, which can occur endogenously, or occur at some point in processing and transformation. Being a global public health problem that affects anyone of any age and that generates serious gastrointestinal diseases, it implies a concern in the food industry that derives from the prevalence of *E.coli*, which is commonly identified in beef. That is why it is important to control and ensure the different processes that are involved in the handling and preservation of food.

Keywords: *E. coli*, Bovine meat, Quality control.

INTRODUCCIÓN

La carne y sus productos derivados son vulnerables a alteraciones provocadas por actividad microbiana, factores químicos y físicos que ocurren durante cada una de las operaciones, por ejemplo, faenamiento, procesamiento, almacenamiento o envío, afectando la calidad de la carne, siendo la contaminación por *Escherichia coli* (*E. Coli*) uno de los principales problemas que pueden causar graves daños a la salud a través del consumo de carne cruda o mal cocida. Identificando las causas que pueden favorecer la prevalencia de *E. coli*, se podrá tener un panorama general al describir los factores de la posible contaminación de la carne con este microorganismo. La *E. coli* productora de toxina Shiga, guarda relación con el serotipo O157H:7 pues es el más fácil de distinguir bioquímicamente de otras cepas, es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente, su presencia en los alimentos es indicador de contaminación fecal, es causante de infecciones importantes en el hombre, por ello la importancia en la detección de contaminación por coliformes (NOM-009-Z00-1994, NOM-194-SSA1-2004).

El departamento de Agricultura de los EE. UU investigaron un brote de infección por *E.coli* O103 productora de toxina Shiga entre el 1 de marzo y el 1 de mayo del 2019, diez estados reportaron un total de 209 casos por esta cepa vinculados a la carne molida de res. El 51% de las personas afectadas eran mujeres. De 191 personas con información disponible, 29 que representa el 15% fueron hospitalizadas. Se notificaron dos casos de síndrome urémico hemolítico y no se notificaron muertes. En México de acuerdo a la Dirección General de Epidemiología a través del Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información, hasta la semana 46 del 2020, los casos por entidad federativa de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo fueron en total 1,181,569 en hombres y 1,355,354 en mujeres. En el estado de Durango durante esa semana se registraron 508 casos y en total acumulado es de 16,975 en hombres y 20,182 en mujeres.

A través de este estudio de carácter documental, mediante el análisis y obtención de información de donde se define, se caracteriza y se describe el valor nutricional de la carne; se pretende mostrar, reconocer e informar, sobre la prevalencia de *E.coli* en la carne de bovino y el impacto a la salud por su consumo, describir

las pruebas y métodos de análisis normalizados para su identificación, así como identificar los principales factores que favorecen la contaminación de esta carne y analizar la importancia de las buenas prácticas en los procesos y procedimientos de la industria cárnica.

La Carne y su composición

Es la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas (NOM-194-SSA1-2004). El Codex Alimentarius define la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin” (FAO, 2015).

Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad. Rica en vitamina B12 y hierro, los cuales no están fácilmente disponibles en las dietas vegetarianas (FAO, 2015). En la Tabla 1, se muestra la composición nutricional de diferentes tipos de carne y otros alimentos, (NOM-194-SSA1-2004).

Tabla 1. Composición nutricional de las carnes y otras fuentes de alimento por 100 g **

Producto	Agua	Proteína	Grasas	Cenizas	KJ*
Carne de vacuno (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	485
Canal de vacuno	54.7	16.5	28.0	0.8	1351
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	469
Canal de cerdo	41.1	11.2	47.0	0.6	1975
Carne de ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	410
Carne de pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	439
Carne de venado (ciervo)	75.7	21.4	1.3	1.2	431
Grasa de vaca (subcutánea)	4.0	1.5	94.0	0.1	3573
Grasa de cerdo (tocino dorsal)	7.7	2.9	88.7	0.7	3397
Leche (pasteurizada)	87.6	3.2	3.5		264
Huevos (cocidos)	74.6	12.1	11.2		661
Pan (centeno)	38.5	6.4	1.0		1000
Patatas (cocidas)	78.0	1.9	0.1		301

** Tecnología de procesamiento de carne para pequeños y medianos productores (FAO, 2007)

Escherichia coli

Es un bacilo Gram negativo de entre 1,1 – 1,5 x 2 – 6 µm perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Aparecen aislados o en parejas, no forman esporas y pueden ser móviles gracias a flagelos peritricos. Son aerobios y anaerobios facultativos por lo que disponen de metabolismo respiratorio y fermentativo. Son oxidasa-negativo y forman ácidos y gas a partir de la mayor parte de los hidratos de carbono fermentables (EFSA BIOHAZ Panel, 2011).

Son mesófilos típicos, crecen a temperaturas entre 7°C y 50°C, alcanzando su crecimiento óptimo a 37°C, con valores de pH próximos a la neutralidad y un valor mínimo de actividad de agua de 0.95. Para realizar el serotipado de las diferentes cepas, se ha utilizado la estructura antigénica formada por el antígeno somático o antígeno O, el antígeno flagelar o antígeno H y el antígeno capsular o antígeno K. El antígeno somático se caracteriza por ser un lipopolisacárido presente en la membrana exterior de la bacteria. Si utilizamos el sistema propuesto por Kauffman, se conocen alrededor de 180 antígenos somáticos (O1 a O185) (EFSA, 2011).

El flagelo de *E. coli* está formado por varias subunidades de una única proteína, denominada flagelina, que está codificada por el gen *fliC*. Se conocen 56 antígenos flagelares (H1 a H56) (EFSA BIOHAZ Panel, 2011).

El antígeno capsular radica en el polisacárido ácido capsular (CPS), clasificándose este en dos grupos, I y II. Hoy en día, en función de sus mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia, las distintas cepas de *E. coli* se clasifican en seis grupos: *E. coli* enteropatógenicos (EPEC), *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC), *E. coli* enteroinvasivos (EIEC), *E. coli* enteroagregativos (EAEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enterohemorrágicos, verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC) (Rodríguez-Ángeles, 2002; Garrity y col., 2006).

E. coli productora de toxina Shiga, produce toxinas conocidas así, por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*; puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C, se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4.4, y en alimentos con una actividad de agua (aw) mínima de 0.95. Es la más importante por

su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos (OMS, 2018).

Se han descrito dos tipos: la toxina Shiga 1 (Stx1) o verotoxina 1 (VT1) y la toxina Shiga 2 (Stx2) o verotoxina 2 (VT2); la capacidad de detección de las toxinas Stx activas mediante el test de toxicidad en células Vero explica ambas denominaciones (Stx/VT). Stx 1 se divide a su vez en tres subtipos y Stx2 en siete subtipos. (Feng y col., 2011; Zhang y col. 2015).

Las cepas STEC presentan factores de virulencia adicionales. La intimina, proteína de la membrana externa, es responsable de la adhesión de las bacterias al epitelio intestinal. Se encuentra codificada en el gen *eae* que forma parte de la isla de patogenicidad cromosómica denominada *Locus for Enterocyte Effacement* (LEE). El gen *eae* está presente en las cepas de algunos de los serotipos más virulentos: O157:H7, O26:H11, O103:H2 (Louie y col., 1994; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Otro factor de virulencia importante es la enterohemolisina codificada por el gen *ehxA* y situado en el plásmido EHEC, la presencia del LEE y el plásmido EHEC son marcadores de las cepas clásicas enterohemorrágicas, de los principales serotipos implicados en el 80% de los casos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU) en Europa y Estados Unidos (Wu y col., 2008; Mora y col., 2009). El grupo de cepas EHEC/VTEC/STEC, son capaces de producir toxinas, codificadas por bacteriófagos, muy similares a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Bugarel y col., 2010).

STEC O157

El primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 fue en 1975 a partir de una muestra de heces de un paciente con diarrea sanguinolenta, registrando el primer brote en 1982 por el consumo de hamburguesas. A pesar de que las cepas STEC no-O157 provocan más casos esporádicos y brotes que STEC O157, es más difícil realizar el estudio epidemiológico y encontrar los alimentos implicados debido a que *E. coli* O157:H7 es más patógena que la mayoría de las cepas no-O157. Esto conlleva que los brotes de *E. coli* O157:H7 sean reconocidos e investigados más rápidamente (Kaspar y col., 2009).

Aproximadamente el 52% de los brotes alimentarios producidos por *E. coli* O157:H7 se relacionan con productos de origen bovino. Los productos implicados

con mayor frecuencia son hamburguesas y carne picada poco cocinada (Alexandre y col., 2001; Di Pillo, 2018).

Según Rodríguez-Ángeles, 2002; el serotipo de las cepas *E. coli* O157:H7 no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa; se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio en el intestino del ganado bovino. (Mora y col., 2007).

La prevalencia de *E. coli* O157:H7 en carne de ovino es muy baja, en torno a un 2%, aunque Chapman (2000), concluyó que su aislamiento era mayor en productos cárnicos de ovino que en productos cárnicos de vacuno.

Respecto a las especies cinegéticas, además de haber actuado como vectores en brotes de origen alimentario dispersando *E. coli* O157:H7 en zonas de cultivos, la bacteria se ha aislado de cecina y solomillo de ciervo (Jay y col., 2007).

Transmisión de *E. coli* O157: H7

Se transmite al hombre por el consumo de alimentos contaminados, como carne picada cruda o poco cocida y leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones. Ejemplos de alimentos implicados en brotes de *E. coli* O157: H7 son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado con leche cruda. Encuestas epidemiológicas en Estados Unidos han demostrado que se presentan más de 200,000 casos por año de intoxicaciones por *E. coli* O157: H7, resultando mínimo en 200 muertes (Juska y col. 2003; Bekele y col., 2014; Di Pillo, 2018; OMS, 2018).

Síntomas de la enfermedad causada por *E. coli* productora de toxina Shiga

Destacan los calambres abdominales y la diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). También puede haber fiebre y vómitos. El periodo de incubación varía entre tres y ocho días, con una mediana de tres a cuatro días. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el SHU (Noris y Remuzzi, 2009). La

mayoría de brotes y casos de SHU se han relacionado con el serotipo *E. coli* O157:H7; por ello, podemos encontrar a estos patógenos clasificados en dos categorías: STEC O157 y STEC no-O157 (Kaspar y col., 2009; Bekele y col., 2014; Zhang y col. 2015).

El Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas). Se estima que hasta un 10% de los pacientes con infección por *E. coli* productora de toxina Shiga pueden desarrollar SHU, con una tasa de letalidad de 3%-5%, siendo la causa más común de insuficiencia renal aguda en los niños de corta edad. Con cualquier síntoma se debe buscar atención médica. Los antibióticos no deben formar parte del tratamiento de los pacientes con enfermedad por *E. coli* productora de toxina Shiga, y posiblemente aumentan el riesgo de SHU posteriormente (OMS, 2018).

STEC no-O157

Desde que se produjo el primer brote en Japón en 1984 por una cepa de *E. coli* O145:H, los serogrupos no-O157 más relacionados con casos de enfermedad en humanos son el O23, O45, O103, O111, O121 y O145 (Kannali y col., 1985).

Estos serogrupos se han denominado como el *big six* por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Brooks y col., 2005).

Se han aislado diferentes cepas de STEC no-O157 en carne y derivados cárnicos de todas las especies domésticas de, leche de vaca y oveja, queso de oveja, carne de caza ciervo, jabalí, muflón y carne picada de ternera (Martin y Beutin, 2011).

DETERIORO MICROBIANO DE LAS CARNES ROJAS FRESCAS

El deterioro de alimentos y bebidas en general, es el resultado de la actividad microbiana de una variedad de microorganismos. La flora microbiana que coloniza un alimento o bebida en particular depende en gran medida de las características del producto y de la forma en que se procesa y es almacenado. Los parámetros que afectan la proliferación de microorganismos en los alimentos pueden ser categorizados en cuatro grupos: (i) parámetros intrínsecos; (ii) parámetros extrínsecos; (iii) modos de procesamiento y conservación; y (iv) parámetros implícitos (Jay y col., 2005).

El deterioro de los alimentos puede considerarse como cualquier cambio que haga que un producto sea inaceptable para el consumo humano. La mayoría de los estudios científicos acerca del deterioro de la carne, tratan sobre la carne de bovino, infiriendo que el comportamiento en las carnes de cerdo, borrego, cordero o ternera, tienen un comportamiento similar. La carne es tal vez el más perecedero de todos los alimentos, debido a la gran cantidad de compuestos químicos que contiene en abundancia de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos, como son: agua, proteínas, tejidos miofibrilar, sarcoplasmático y mitocondrial, grasas, sustancias no proteicas solubles, nitrogenados como creatina y aminoácidos; carbohidratos como ácido láctico, glucógeno, glucosa-6-fosfato, glicógeno y glucosa; compuestos inorgánicos como fósforo soluble, potasio, sodio, magnesio, calcio y zinc; además de trazas de metales y vitaminas (Jay y col., 2007; Polpakdee y Angkititrakul, 2015).

Durante el trozado de las canales, a las porciones grandes se les recorta el exceso de grasa y tejidos (trimming) que, comúnmente, se utiliza en la elaboración de carne molida cruda y una amplia variedad de productos listos para comer. A lo largo de la cadena alimentaria, este proceso de recorte y posterior molienda distribuye patógenos en toda la carne. La matriz alimentaria de riesgo en este perfil es el “trimming” y la carne molida bovina. Las carnes frescas rojas y la mayoría de los productos cárnicos cuentan con ambientes relativamente ácidos (pH 5.4-5.8, en carne bovina) y con una disponibilidad de agua entre 0.98 – 0.99, condiciones favorables para la multiplicación de todas las especies microbianas (Bekele y col. 2014; Di Pillo, 2018).

Parámetros intrínsecos

Son las propiedades físicas, químicas y estructurales inherentes al alimento. Los más importantes son la actividad del agua, acidez, potencial redox, nutrientes disponibles y sustancias antimicrobianas naturales. Los microorganismos necesitan de “agua disponible” para crecer, conocida con el término “actividad de agua” (aw) y varía de 0 a 1.0. Ésta es el agua que no está ligada a otras moléculas del alimento. La menor aw en la cual una bacteria patógena crece es 0.85. Los mejores valores de actividad de agua para el crecimiento bacteriano están entre 0.97 y 0.99, de modo que los alimentos con aw dentro de este rango serán potencialmente más peligrosos y los diferentes tipos de carne pueden alcanzar valores superiores a 0.95. La adición de sal, azúcar u

otras sustancias causan reducción de la aw. Este valor también puede ser disminuido por la evaporación del agua (deshidratación) o por la congelación (Condori, 2014).

La acidez de los alimentos es medida por una escala que varía de 0 (muy ácido) a 14.0 (muy alcalino o básico) siendo el 7.0 el pH neutro. La mayoría de los microorganismos crecen mejor próximos a la neutralidad y por ello la totalidad de los alimentos considerados potencialmente peligrosos tienen un pH entre 4.6 y 7.0. Apoyándose en este concepto los alimentos fueron divididos en dos categorías: poco ácidos (pH 4.6-7.0) y ácidos (pH < 4.6). Los microorganismos aerobios necesitan valores de pH positivo para su crecimiento. En este grupo se incluyen casi todos los mohos, levaduras oxidativas y muchas bacterias, principalmente aquellas que deterioran los alimentos (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, etc.) y algunas bacterias aerobias patógenas (como la del *Bacillus cereus*). De la misma manera, los microorganismos anaerobios necesitan valores de pH más pequeños. En este grupo se encuentran algunas bacterias patógenas (*Clostridium botulinum*) y de deterioro. Algunas bacterias aerobias crecen mejor en condiciones un poco reducidas y se denominan microaerofilas, como los *Lactobacilos* y *Streptococcus* (Condori, 2014).

Parámetros extrínsecos

Son factores del entorno en el que se almacena un alimento. La temperatura es el factor ambiental que más afecta el crecimiento de los microorganismos. A pesar de que ellos crecen bien en un intervalo de -8° a +90°C (17.6 a 194°F), la temperatura óptima para casi todos los microorganismos patógenos es de 35°C (95°F). La temperatura afecta el curso de la fase latente, velocidad de crecimiento, exigencias nutricionales, composición química y enzimática de las células. Los efectos letales de la congelación y refrigeración dependen del microorganismo en cuestión y de las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento. Alterando los gases de la atmósfera es posible retrasar la multiplicación microbiana en los alimentos sin disminuir la humedad relativa. El almacenamiento de los alimentos en atmósferas gaseosas (como las de CO₂) en cantidades previamente establecidas se denomina “atmósferas controladas”. La concentración de CO₂ no debe exceder del 10%. Se han usado atmósferas de gas carbónico para aumentar el tiempo de almacenamiento de carnes. Las bacterias Gram-negativas son más sensibles al CO₂ que

las Gram-positivas. Las atmósferas con CO₂ y O₂ juntos han sido más eficaces que aquellas con gas carbónico solo (Condori, 2014).

Bacterias relacionadas con la contaminación de la carne

Identificar al organismo que ha producido una infección o intoxicación alimentaria o generado el deterioro del alimento, es una tarea laboriosa y compleja (Mossel y col., 2003). Según Dsani y col., 2020, en un estudio se demostró que, *E. coli*, fue detectada en un 48% (98/205) del total de todas las muestras. La proporción de carne contaminada con *E. coli*, en un matadero municipal fue del 79% (50/63), la porción contaminada en sacrificio informal fue del 53% (42/79/ y del 9.5% (6/63) en un rastro particular. En la Tabla 2, se presentan las bacterias que se encuentran habitualmente en los alimentos. Se estudian por métodos que combinan técnicas de resurrección o pre- enriquecimiento, aislamiento en medios de cultivos comunes o selectivos, e identificación a través de pruebas bioquímicas. Estos análisis permiten, determinar el género bacteriano involucrado y algunas especies. Sin embargo, ciertos organismos muy próximos filogenéticamente precisan de técnicas complejas de biología molecular, para poder distinguir uno y otro (Jay y col., 2005). En la Tabla 3, se muestran los valores mínimos de algunas variables para el desarrollo de algunas bacterias.

En general, las bacterias de interés alimentario se pueden cultivar con facilidad y su morfología y/o movilidad se determina por la simple observación de una preparación en fresco, con el microscopio óptico a 1,000 aumentos. Las diferentes técnicas de tinción (Gram, endosporos, flagelos) brindan mayor información sobre el microorganismo en estudio. Los parámetros fisiológicos usados comúnmente en la identificación del agente bacteriano son la tolerancia al oxígeno y la temperatura, la formación de pigmentos, la producción de catalasa y oxidasa, la acción sobre la glucosa por vía oxidativa o fermentativa y otra actividad enzimática. (Mossel y col., 2003).

Bacterias gram-negativas

Los bacilos Gram-negativos, catalasa-positivos, son los agentes más importantes en el deterioro de los alimentos y al mismo tiempo los patógenos más relevante de origen entérico transmitidos por alimentos (Jay y col., 2005).

Bacilos oxidasa-negativos fermentadores. Dentro de las

enterobacterias se destaca el género *Salmonella*. La única especie llamada *Salmonella entérica* tiene seis subespecies y diversos serotipos, por ejemplo *S. enterica* serovar Typhimurium; *S. entérica* serovar Enteritidis; *S. enterica* serovar Gallinarum biovar pullorum, que se resumen como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Downes e Ito, 2001).

Tabla 2. Bacterias frecuentemente halladas en los alimentos. (Jay y col., 2005)

Alimentos	Microorganismos
Carnes rojas y aves	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Listeria</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Vagococcus</i> .
Carnes procesadas	<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Weissella</i>
Huevos y subproductos	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Staphylococcus</i>
Pescados y mariscos	<i>Aeromonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Vibrio</i> .
Leche	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> .
Frutas y hortalizas	<i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> .
Zumos de frutas y hortalizas	<i>Acetobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> .
Cereales y harinas	<i>Bacillus</i>

Tabla 3. Valores mínimos de pH, temperatura y actividad de agua para el crecimiento de algunas bacterias. (Doyle, 1997)

Bacterias	pH mínimo	a _w mínima	T, °C mínimo
<i>Aeromonas</i>	6,0	0,97	-0,5
<i>Bacillus</i>	4,4 - 4,9	0,91 - 0,95	7
<i>Clostridium</i>	4,6 - 5,0	0,94 - 0,97	3,3 - 10
<i>Escherichia</i>	4,4	0,95	7 - 8
<i>Lactobacillus</i>	3,0 - 3,4	0,93	2 - 6
<i>Listeria</i>	4,4	0,92	-0,4
<i>Psdeudomonas</i>	5,0	0,97	0 - 4
<i>Plesiomonas</i>	4,0	0,96	8
<i>Salmonella</i>	3,8	0,94	5,2
<i>Shigella</i>	4,9 - 5,0	0,96	6,1 - 7,9
<i>Staphylococcus</i>	4,0	0,86	7
<i>Vibrio</i>	4,8 - 5,0	0,94 - 0,96	5 - 10
<i>Yersinia</i>	4,2	0,96	-1,3

Algunos serotipos de *Escherichia coli* son patógenos, por ejemplo *E. coli* O157:H7. *Yersinia enterocolítica* provoca una fiebre entérica y las especies de *Shigella* son responsables de la disentería bacilar. *Bacilos oxidasa-negativos no fermentadores*. Los bacilos aeróbicos, no acidúricos pues no crecen por debajo de pH 4,5, por ejemplo, *Acinetobacter*, forman parte de las bacterias que causan la alteración de los alimentos proteicos frescos, almacenados en frío, como carne, pescado y ovoderivados. Los bacilos acidúricos oxidantes de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, tienen un rol muy importante en la alteración de bebidas alcohólicas y de frutas pues oxidan el etanol (Mossel y col., 2003).

Bacilos oxidasa-positivos no fermentadores. En este grupo se encuentran *Alcaligenes* (móvil), también *Psychrobacter* y *Flavobacterium* (inmóviles) que participan en el deterioro de carnes bajo refrigeración y algunos vegetales. Este último género se caracteriza por la producción de pigmentos amarillos a rojos. *Shewanella putrefaciens* crece anaeróbicamente en presencia de Fe^{++} y causa el enverdecimiento de las carnes envasadas al vacío (Jay y col., 2005).

Pseudomonas presenta flagelos polares. Varias especies de este género son psicrotolerantes y, por lo tanto, tienen un efecto importante en el deterioro de alimentos conservados a temperaturas de refrigeración como huevos frescos, carne, pescado y leche. Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* es un organismo mesófilo patógeno que a veces se puede encontrar en los alimentos, el suelo y el agua. Algunas especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* deterioran vegetales (Doyle y col., 1997).

Bacilos oxidasa-positivos fermentadores. En este grupo se incluyen los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*. Las especies de *Aeromonas* suelen ser psicrotolerantes y heterofermentadoras, están asociadas con la alteración de alimentos proteicos frescos cuando el desarrollo de los organismos aerobios obligados está limitado, por ejemplo, en los productos envasados al vacío (Jay y col., 2005).

Bacterias gram-positivas

Bacilos catalasa-negativos, no esporulados, inmóviles. Las especies de *Lactobacillus* pueden ser anaerobias facultativas o microaerófilas. Se las divide en *homofermentativas* si degradan glucosa produciendo sólo ácido láctico, y *hetero-fermentativas* si forman una mezcla de ácido láctico, CO_2 , etanol y/o acetato. El ácido láctico disminuye el pH del medio e inhibe el desarrollo de otras bacterias, favoreciendo adaptabilidad a diferentes hábitats. Son frecuentes en la leche fresca, ovoproductos, canales de mamíferos y de aves antes de su almacenamiento. *Carnobacterium* se encuentra en pescados, canales de aves y carnes rojas envasadas al vacío (Jay y col., 2005).

Bacilos catalasa-negativos, esporulados. El género anaeróbico *Clostridium* altera alimentos sometidos a calentamiento. Los clostridios productores de ácido butírico crecen a bajas temperaturas y ocasionan deterioro en quesos.

Clostridium botulinum sintetiza una toxina letal en alimentos con $pH \geq 4.5$ y es esta toxina la causa directa

de la enfermedad conocida como botulismo. Otra especie patógena es *Clostridium perfringens* que produce enteritis cuando se encuentra en un número elevado en el alimento. *Bacilos catalasa-positivos, esporulados.* El género *Bacillus* es un agente de alteración de alimentos que han sido sometidos a calentamiento. *Bacillus coagulans* y *Geobacillus stearothermophilus* alteran los productos enlatados acidificando el contenido (ICMSF. 1998).

Bacillus cereus causa enteritis o gastroenteritis cuando se encuentran en un número elevado en el alimento. *Bacilos catalasa-positivos, no esporulados.* *Brochothrix thermosphacta* se encuentra con frecuencia en la superficie de la carne fresca. *Corynebacterium diphtheriae* y *Listeria monocytogenes* pueden ser transmitidos por los alimentos. Este último es uno de los pocos patógenos psicrotróficos. *Cocos catalasa-negativos.* En este grupo se encuentran *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aerococcus*. Los *Enterococcus* son de interés en higiene de alimentos como organismos marcadores. Son relativamente termodúricos y pueden sobrevivir en la leche pasteurizada (Mossel y col., 2003).

Cocos catalasa-positivos Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Una diferencia entre estos dos géneros es que los estafilococos no crecen a temperaturas inferiores a $7^{\circ}C$ y por lo tanto no causarían problemas en alimentos adecuadamente refrigerados. Numerosas cepas de *Staphylococcus aureus* producen una potente enterotoxina (Mossel y col., 2003).

Bacterias tolerantes

Algunos microorganismos han desarrollado una fuerte resistencia a factores abióticos, son capaces no sólo de sobrevivir sino de multiplicarse en condiciones de presión osmótica elevada, temperatura alta o baja, o valores de pH y presión de oxígeno extremos. Varias bacterias patógenas halladas en los alimentos, como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enterovirulento, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, son termotróficas porque tienen temperaturas críticas (mínima-óptima-máxima) varios grados más elevados si se las compara con los otros organismos mesófilos (Downes e Ito, 2001; Mossel y col., 2003). La Tabla 4, presenta las pruebas corrientes para la identificación de las bacterias.

MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis de los alimentos para determinar la existencia, tipo y número de microorganismos es básico para la microbiología. Sin embargo, ninguno de los métodos utilizados habitualmente permite determinar el número exacto. Son cuatro los métodos básicos utilizados para investigar el número “total” de microorganismos: Recuento en placa (SPC) para la determinación del número de células viables. Método del número más probable (NMP) de gérmenes como cálculo estadístico del número de células viables. Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora. Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables.

Tabla 4. Pruebas corrientes para la identificación de las bacterias (Madigan y col., 2004).

PRUEBA	PRINCIPIO	USO MÁS COMÚN
Catalasa	Descompone el H ₂ O ₂	<i>Bacillus</i> (+); <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> (-)
Citrato (única fuente de C)	Alcalinización del medio	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Salmonella</i> (+); <i>Escherichia</i> y <i>Edwardsiella</i> (-)
Coagulasa	Coagulación del plasma sanguíneo	<i>Staphylococcus aureus</i> (+); <i>S. epidermidis</i> (-)
Descarboxilasas de lisina, ornitina o arginina	Liberación de CO ₂ y amina	Diferenciación de bacterias entéricas
Desaminación de fenil-alanina	Producción de ácido fenil-pirúvico	Identificación de <i>Proteus</i> y <i>Providencia</i>
Fermentación de azúcares y polialcoholes	Producción de ácido y/o gas	Diferenciación de bacterias entéricas
β - galactosidasa	Hidrólisis de o nitrofenil- β-galactosido dando nitrofenol amarillo	<i>Citrobacter</i> y <i>Arizona</i> (+); <i>Salmonella</i> (-)
Hidrólisis de almidón	La solución I2 - I- da azul con almidón	Identificación de <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Flavobacterium</i>
Hidrólisis de gelatina	Licua el gel de gelatina al 12%	Identificación de <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Flavobacterium</i>
Indol	Conversión del triptofano en indol	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Salmonella</i> (-); <i>Escherichia</i> y <i>Edwardsiella</i> (+)
Oxidación-fermentación	Producción de ácido	Aerobiosis: <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> Anaerobiosis: bacterias entéricas, <i>Staphylococcus</i>
Oxidasa	Citrocromo c oxida aceptor artificial de electrones	<i>Moraxella</i> , <i>Aeromonas</i> y <i>Pseudomonas</i> (+); <i>Acinetobacter</i> y bacterias entéricas (-)
Producción de H ₂ S (negro con Fe+++)	Reducción de tiosulfato o descomposición de aminoácidos azufrados	Identificación de <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Proteus</i>
Reducción de nitrato	Aceptor de electrones alternativo reducido a NO ₂ - o N ₂	Bacterias entéricas (comúnmente +)
Rojo de metilo	pH < 4,3 por fermentación ácida mixta	<i>Escherichia</i> (+, rojo) <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> (-)
Ureasa	Descomposición de urea en 2 NH ₃ + CO ₂	<i>Klebsiella</i> y <i>Proteus</i> (+); <i>Escherichia</i> y <i>Providencia</i> (-)
Voges-Proskauer	Formación de acetofina por fermentación de glucosa	<i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> (+); <i>Escherichia</i> (-) Identificación de <i>Bacillus</i>

El recuento en placa es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (u.f.c.) en un alimento. Cada vez es más frecuente recurrir a la determinación de microorganismos indicadores para determinar la inocuidad de un alimento (Cano, 2006).

Métodos normalizados para cuantificación de enterobacterias

El recuento total de enterobacterias se utiliza como indicador de contaminación fecal, y como uno de los indicadores de Buenas Prácticas de Fabricación. Se utiliza como indicador de la calidad microbiológica de alimentos procesados, y recuentos elevados señalan una elaboración inadecuada o una contaminación posterior, o ambas cosas a la vez; siempre implica un riesgo higiénico-sanitario. ISO 7402. Directiva general para el recuento, sin revivificación, de las *Enterobacteriaceae*. Técnica del NMP y método por recuento de colonias. Esta directiva expone dos métodos para el recuento de enterobacterias. El primero de ellos se recomienda utilizar en muestras que se sospecha que presentan contaminación baja (1 - 100 por mililitro o gramo de muestra). NF V 08-054. Método de rutina para la enumeración de *Enterobacteriaceae* mediante el recuento de colonias. Este método se basa en la siembra en profundidad con el medio agar biliado cristal violeta glucosa, en una placa de Petri, con una cantidad determinada de la muestra a examinar, si el producto es líquido o una cantidad determinada de la suspensión madre en el caso de los otros productos. Incubación de las placas a 30° C durante 24 horas +/- 2 horas. Cálculo del número de *Enterobacteriaceae* por mililitro o por gramo de muestra, a partir del número de colonias características confirmadas obtenidas en las placas de Petri (Cano, 2006).

Métodos normalizados para cuantificación de coliformes totales

En conjunto los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, y *Klebsiella*. Todos son fermentadores de la lactosa en 48 horas. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, en el suelo, las plantas, etc. No son muy buenos como indicadores, pero se utilizan como indicadores de contaminación fecal y son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario poco satisfactorio.

A pesar de todo lo anterior, tienen un valor acreditado como indicadores de inocuidad, por ejemplo, en el sistema APPCC. Crecen en presencia de sales biliares, que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas. Capaces de fermentar la lactosa con producción de gas, característica suficiente para hacer determinaciones presuntivas. Su facilidad de cultivo y de diferenciación los hace casi ideales como indicadores. SO 4831.

La Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35 °C de la muestra diluida en un medio líquido. Este procedimiento suele aplicarse muestras destinadas a evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias en la industria alimentaria.

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994.

La Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994 establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa. El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Placas con colonias no características. Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución. Informar: UFC/g o mL en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

Métodos rápidos

Se define como “método rápido” a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. En las últimas cuatro décadas hubo numerosos avances en el desarrollo de métodos rápidos y desde hace 15 años este campo cobró gran importancia en investigación y en la industria alimentaria.

Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, microarrays, biochips (Leotta, 2009). Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como agencias regulatorias internacionales (USDA/FSIS, 2008), los recomendados por la ISO (International Standards Organization) y AOAC (International Association of Official Analytical Chemists), entre otras (Feldsine y col., 2002).

BUENAS PRÁCTICAS EN LA INDUSTRIA DE LA CARNE

La higiene de la carne es una ciencia demandante y tiene que tratar con diferentes clases de riesgos. Los químicos peligrosos a nivel de la producción primaria incluyen: residuos de medicamentos veterinarios y de pesticidas, contaminantes ambientales e industriales, y promotores de crecimiento prohibidos. Por muchos años, la inspección de la carne se enfocó hacia formas de contaminación microbiológica que causa lesiones macroscópicas. Esto incluye, por ejemplo, tuberculosis, ántrax, salmonelosis en cerdos y parásitos como *Cysticercos*. El tipo y prevalencia de estos patógenos cambia radicalmente con las prácticas de producción, procesamiento y manejo de los alimentos en los diferentes países. Nuevas zoonosis como *Escherichia coli* O157:H7 y los agentes infecciosos de las encefalopatías espongiiformes transmisibles/bovina (BSE/TSE, sus siglas en inglés) continúan emergiendo. Revisiones recientes identifican que los portadores sanos de patógenos peligrosos son los causantes principales de la mayoría de los riesgos de origen cárnico a la salud humana, por ejemplo, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. Conocimientos recientes revelan que la dosis infecciosa media para los diferentes patógenos de origen cárnico puede variar desde algunas células, por ejemplo, *E. coli* O157:H7, hasta muchos millones de células, por ejemplo, varias especies de *Salmonella* spp. Para las diferentes serovariantes de *Salmonella*, el Comité Científico de la Comisión Europea sobre

Medidas Veterinarias relacionadas a la Salud Pública estima que la dosis para enfermedades infecciosas varía desde 10^1 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (u.f.c.). Esto tiene implicaciones obvias para la implementación de medidas de inocuidad alimentaria por la industria (FAO, 2007).

Programas de higiene en la carne

La mayoría de las actividades de producción, procesamiento, almacenamiento, distribución y venta requerirán programas hechos a la medida que documenten todos los requisitos de higiene. La industria tiene la responsabilidad primordial de documentar e implementar tales programas, con supervisión y verificación por parte de la autoridad regulatoria gubernamental con tal jurisdicción (desde ahora referida como la “autoridad competente”). Tres bloques formadores pueden ser usados en el desarrollo práctico de un programa específico de higiene de la carne: Buenas prácticas de higiene (GHP del inglés Good hygienic practice); El Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP); Evaluación de riesgo (FAO, 2007).

Buenas Prácticas de Higiene (GHP)

Las GHP usualmente consisten en una descripción cualitativa de todas las prácticas sobre las condiciones y medidas necesarias para asegurar la inocuidad y la idoneidad de los alimentos. Muchas costumbres se basan en experiencia empírica y en la práctica, y cubren tanto el proceso como el ambiente de producción de los alimentos. Debería decirse que las GHP son el único componente del programa de higiene de la carne que trata los asuntos de inocuidad no ligados al alimento. Los requerimientos regulatorios de las GHP son generalmente normativos y describen los requerimientos de proceso más que los resultados. Se pueden incluir algunas especificaciones cuantitativas, por ejemplo, niveles de cloro en agua potable, conteo de placas aeróbicas para superficies de trabajo, y rangos de defectos de contaminación visible en canales frías. En la mayoría de los casos, la efectividad de los componentes de GHP de un programa de higiene de la carne no podrán ser validados en términos de lograr un nivel particular en la protección al consumidor, es decir, no son basados en el riesgo. El Código internacional de prácticas recomendado: principios generales de higiene de los alimentos del Codex (FAO/OMS, 1999) proporciona una plataforma de GHP para desarrollar programas individuales de higiene.

Evaluación del riesgo

Un programa de higiene basado en el riesgo requiere entender el nivel de protección al consumidor que se puede lograr con ciertas medidas. Esto comprende el conocimiento del nivel de control de peligros que se alcanza en una etapa particular en la cadena de producción del alimento relativo al nivel esperado de protección. Para alimentos en comercio internacional, esto se llama “nivel apropiado de protección” (sus siglas en inglés ALOP). Establecer este enlace es tarea de las instituciones de gobierno y científicas más que de la industria. Si un segmento de la cadena de producción de los alimentos ha recibido una evaluación de riesgo, la implementación de un programa de higiene de la carne basado en el riesgo puede implicar el establecimiento de límites regulatorios para el control de peligros. En otros casos, el modelo de evaluación de riesgo puede ser usado para determinar las medidas de higiene con el impacto más significativo en reducir tal riesgo, y pueden especificarse en reglas independiente de los límites regulatorios, por ejemplo, obligación de lavar los animales antes del sacrificio (FAO, 2007).

Higiene Personal

La finalidad de cualquier organismo es sobrevivir y proliferar, asegurando la supervivencia de la especie. Esto se aplica tanto en microorganismos que causan las enfermedades como en animales y seres humanos. Cuando un organismo patógeno entra al cuerpo y produce enfermedad, se multiplica haciendo copias de él mismo para diseminarse en las excreciones del huésped enfermo. Estos organismos son bastante resistentes, y pueden sobrevivir los procedimientos normales de lavado para plantear un riesgo en los alimentos. Algunos organismos también permanecen en el cuerpo, aunque la persona haya sanado, por lo que estarán presentes en las heces. Es recomendable que se investiguen las muestras fecales sobre las causas de la gastroenteritis antes de que la persona regrese a manejar alimentos, o debería haber un período de tal vez tres semanas después de la recuperación durante el cual la persona no debería manejar alimentos. La vestimenta personal puede portar microorganismos que hayan sido recogidos de una amplia variedad de fuentes al entorno donde se procesan los alimentos. Para proteger los alimentos de la vestimenta personal, se deberían usar monos (overalls) protectores. Se deberían usar botas impermeables limpias, y se deberían limpiar antes de comenzar o retomar el trabajo después de un reposo, y al final de

la sesión de trabajo. El uso de joyería, relojes y otros objetos desprendibles deben ser evitados. La suciedad y organismos tales como *S. aureus* se pueden acumular en o alrededor de tales objetos, y también poner en riesgo de contaminación con objetos extraños si caen dentro de los alimentos. De manera similar, cosméticos, pestañas y uñas postizas y perfumes fuertes, no deberían permitirse por el riesgo de contaminación y de saborizar los alimentos. Todas las partes del cuerpo portan numerosos microorganismos, incluyendo el *S. aureus*. La atención especial a la higiene personal minimizará el riesgo de contaminación. Se debería tener cuidado de no tocar los oídos, nariz, boca, ojos y cabello mientras se trabaja con elementos. Estas partes del cuerpo pueden portar un número mayor de organismos que pueden ser transmitidos a los alimentos. También el masticar, comer, escupir y fumar debería ser desalentado, ya que estas actividades involucran tocarse la boca, y la saliva puede diseminarse en el ambiente (FAO, 2007).

Sistema de control para operaciones del proceso: el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP)

Los principios generales de higiene conocidos como Buenas Prácticas de Higiene (GHP) o Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) son la base sobre la que se construye el sistema HACCP, que es un sistema de control de alimentos más sofisticado que las GHP, que “identifica, evalúa y controla los peligros para la seguridad de los alimentos” (FAO/OMS, 1999).. Por lo que las GHP son un requisito y no existe implementación efectiva de plan HACCP sin GHP existentes y efectivas. Aunque algunos riesgos de nivel bajo para la salud pública se pueden controlar a través de los principios de las GHP, las GHP solas son insuficientes para manejar riesgos de más alto nivel que requieren medidas adicionales, más específicamente dirigidas y provistas por un HACCP (FAO, 2007).

Los límites críticos (CLs) en un CCP pueden ser designados como “límites regulatorios” por la autoridad competente. Un peligro es un agente biológico, químico o físico que esté presente en, o la condición de, alimentos que pueden causar efectos dañinos a la salud humana. Los peligros biológicos son las preocupaciones más grandes de los mataderos, e incluyen microorganismos patógenos (bacterias, hongos, virus), toxinas microbianas y/o metabolitos tóxicos, parásitos y priones. Los peligros químicos incluyen los residuos (pesticidas, bifenilos policlorinados [PCBs], metales pesados,

micotocinas) medicamentos veterinarios, promotores de crecimiento, químicos de limpieza y desinfección, solventes/lubricantes y cebos. Los límites críticos pueden diferir en su naturaleza y de la forma de ser medidos. El monitoreo debería incluir los parámetros establecidos como los métodos utilizados (por ejemplo, los planes de muestreo y las revisiones de registros de temperaturas son significativos), la frecuencia, la asignación de responsabilidades relacionadas y el registro. Aunque regular, el monitoreo no es siempre una actividad continua. Idealmente, el monitoreo de los CCP debería proveer un aviso temprano del peligro de perder el control, antes de que los límites críticos sean excedidos. Para ser efectivo, el plan de HACCP necesita seguirse en términos tanto de operaciones como de operadores, resultando en un control efectivo de los peligros identificados. La documentación debería de proveer información general, detalles del mismo plan HACCP y registros de acciones. Toda la documentación debe ser actualizada, completa e informativa, pero ser tan simple como sea posible y accesible (FAO, 2007).

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Se consideró como ETA aquella enfermedad que afectó a dos o más personas que ingirieron algún alimento o bebida supuestamente contaminada. Las ETA de origen microbiano y parasitario, son las causadas por el consumo de agua o comida contaminada por microorganismos patógenos, parásitos o sus toxinas. Aunque se pueden contraer una serie de enfermedades infecciosas diferentes a partir de los alimentos bajo ciertas circunstancias, hay aquellas que se contraen exclusiva o predominantemente del consumo de productos alimenticios. Dos ejemplos de los primeros son la colitis hemorrágica y la listeriosis y de los segundos son el botulismo y la intoxicación alimentaria estafilocócica. El ántrax y la brucelosis son dos enfermedades que en décadas pasadas se han contraído al comer animales enfermos, pero, con la prevalencia de estas enfermedades tan baja, rara vez se contraen a través de la ruta transmitida por los alimentos. Los patógenos reconocidos transmitidos por los alimentos incluyen parásitos, protozoos, hongos, bacterias, virus y priones. A continuación, se presenta una visión general de estos organismos en relación con sus hábitats generales, su entrada en los alimentos y los mecanismos generales de patogénesis, y cómo difieren de las especies / cepas no patógenas estrechamente relacionadas (Jay y col., 2005).

La Norma Oficial-194-SSA1-2004 es el único instrumento para verificar la inocuidad de la carne bovina en México, y se limita a inspeccionar *E. coli* como microorganismo indicador de contaminación fecal, con un límite permisible de 1000 UFC/g de carne refrigerada y 5000 UFC/g de carne molida, además específica la ausencia de *Salmonella* en 25 g de carne (Jiménez, E. M. y col., 2012).

ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

Son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se las considera un problema de salud pública en el nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (Hernández y col., 2011).

Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor. Las manifestaciones clínicas más destacadas de la gastroenteritis son: fiebre, vómito, dolor abdominal, y diarrea moderada o intensa. Existen diferentes tipos de diarreas que se pueden clasificar desde el punto de vista fisiopatológico y su clasificación en función del tiempo es: diarrea aguda (corta duración), y diarrea crónica (evolución prolongada). La clasificación de acuerdo con su manera de presentación aquella de etiología bacteriana o viral y, según el agente causal, puede ser diarrea líquida (acuosa o secretora), producida por bacterias secretoras de enterotoxinas, como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (EIEC) (Vila y col., 2009), diarrea con sangre (invasiva o disentería), causan disentería (*E. coli* diarreagénicas, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, Rotavirus, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*), pueden provocar cambios inflamatorios y destructivos en la mucosa del colon, por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas. (Ramos y col., 1987; Giono-Cerezo, 2003; Jure y col., 2005; Hernández y col., 2011) y diarrea del viajero, entre personas que viajan desde países desarrollados a otros en vías de desarrollo y pueden sufrir una gastroenteritis, pudiendo ser causada por *E. coli* diarreogénicas, presentándose en más de 50% de los casos. Principalmente *E. coli* enterotoxigénicas y las enteroagregativas. También se ha reportado

la presencia de cepas de *Bacteroides fragilis* enterotoxigénicas (ETBF, por sus siglas en inglés), *Arcobacter butzleri* y *Campylobacter* spp. (9%), *Shigella* spp (4%), *Aeromonas* spp y *Plesiomonas* spp (2%), *Vibrio* (1%), pero no se halló *Yersinia enterocolitica* (Vila y col., 2009; Zhi-Dong, y col., 2010).

A pesar de que su mayor incidencia se presenta en personas de 20 a 40 años, los niños y los ancianos son los que suelen sufrir sus efectos fulminantes, debido a la excesiva pérdida de electrolitos que aflige al cuerpo durante la enfermedad y que puede causar una deshidratación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año tienen lugar 1,500 millones episodios en países en vías de desarrollo, resultando de éstos en 1,5 millones de muertes. En México, un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales. En 2001, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos en el nivel nacional. (Hernández y col., 2011).

CONCLUSIONES

El impacto en la salud de la población que generan las enfermedades transmitidas por alimentos es aún preocupante y significativo en la actualidad. En especial, se debe de caracterizar la contaminación por *E. coli* en la carne bovina, ya que sigue siendo el principal alimento implicado y sirve de base para estimar la prevalencia de *E. coli* por el consumo de este producto. Los factores clave que intervienen en la contaminación de los alimentos son principalmente los procesos de producción, transporte, almacenamiento, manejo, manipulación, entre otros parámetros tanto intrínsecos como extrínsecos, ya que según Zhao y col., es común identificar *E. coli* en niveles bajos en las áreas de procesamiento de productos cárnicos y durante su distribución, debido a que esta bacteria es parte de la microflora entérica del ganado bovino. Por su parte Chapman y col., 2000; registraron una alta incidencia de *E. coli* O157H:7 durante primavera y verano ya que la temperatura del ambiente propicia las condiciones que favorecen el desarrollo microbiano.

Por lo anterior, aun estando dentro de los límites permisible por la norma, representa un problema de salud pública, por lo que es importante tomar medidas para controlar la prevalencia de *E. coli* con la implementación de BPM, desde el sacrificio hasta la

distribución y expendio, para ofrecer un alimento seguro a los consumidores y así mantener la inocuidad de los alimentos y reducir el peligro de padecimientos que podría significar el consumo de productos cárnicos. Por otra parte, hay que concientizar a la población para seguir con algunas prácticas que recomienda la Organización Mundial de la Salud que puede prevenir la transmisión de microorganismos patógenos como la *E.coli* productora de toxina shiga. Por lo tanto, es imprescindible que se sigan estudiando y desarrollando investigaciones para determinar la incidencia y prevalencia que este patógeno ha adquirido en los últimos años, así como continuar con futuras investigaciones de métodos de conservación de los alimentos con nuevas tecnologías y aplicaciones que aseguren su calidad.

REFERENCIAS

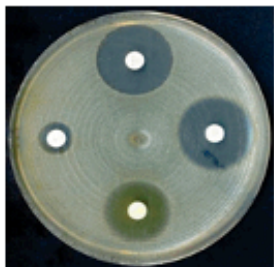
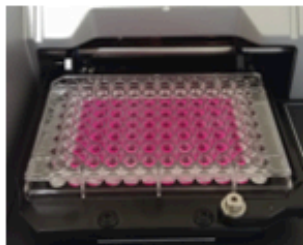
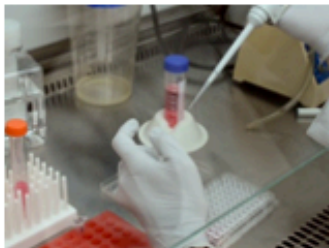
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. 1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial. Secretaria de Salud.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-109-SSA1-1994. 1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su
- Norma oficial mexicana NOM-194-SSA1-2004. 2004. Productos y servicios.
- Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. Alexandre, M. Prado, V. Ulloa, M. Arellano, C. & Rios, M. 2001. Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Meat Foods using DNA Probes, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Polymerase Chain Reaction. J. Vet. Med. Ser. B 48, 321–330.
- Bekele, T.; Zewde, G.; Tefera, G.; Feleke, A. and Zerom, K. 2014. *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Meat in Addis Ababa, Ethiopia: Prevalence at an Abattoir and Retailers and Antimicrobial Susceptibility. International Journal of Food Contamination. 1:4 <http://www.foodcontaminationjournal.com/content/1/1/4>.
- Brooks, J. et al. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J. Infect. Dis. 192, 1422–1429.
- Bugarel, M. Beutin, L. Martin, A. Gill, A. & Fach, P. 2010. Microarray for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. Int. J. Food Microbiol. 142, 318–329.
- Cano, S. 2006. Principales métodos de análisis microbiológico de alimentos. Métodos de análisis microbiológico. Normas ISO, UNE... 12-25.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2019. <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o103-04-19/index.html>
- Chapman, P. 2000. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. J. Appl. Microbiol. 88.
- Condori, M. 2014. “DETERIORO Y CONSERVACION DE ALIMENTOS”. Universidad Nacional de San Agustín. Perú.
- Dirección General de Epidemiología, 2020. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información, número 47 Vol. 37 p.20.
- Dsani, E.; Andrews, A. E.; Danso-Appiah, A.; Kenu, E.; Basil, B. and Egyir, B. 2020. Antimicrobial resistance and molecular detection of extended spectrum β lactamase producing *Escherichia coli* isolates from raw meat in Greater Accra region, Ghana. BMC Microbiology. 20:253 <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01935-z>.
- Di Pillo, S. F.; Sotomayor, D. G. 2018. *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga O157 y NoO157 en carne bovina, Chile. Área de soporte al análisis de riesgo. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria, ACHIPIA. Perfil de Riesgo/ACHIPIA N° 03.
- Downes, P & Ito, K. eds. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. APHA, Washington, p.159, 167, 187, 357.
- EFSA BIOHAZ Panel, EFSA FIP & EFSA Scientific Committee. 2011. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. EFSA J. 9, 35.
- EFSA. 2011. Statement summarising the Conclusions and Recommendations from the Opinions on the safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. EFSA J. 9, 155.

- EFSA. 2011. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. EFSA J. 9, 50.
- FAO. 2007. Buenas Prácticas para la industria de la carne. Producción y sanidad animal 2ª ed. Roma. (1) 1-22, (12) 1-8.
- FAO/OMS. 1999. Recommended international code of practice: general principles of food hygiene. CAC/RCP.1. Rome.
- Feldsine, P.; Abeyta, C.; Andrews, W. 2002. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J AOAC Int; 85: 1187-200.
- Feng, P. Jinneman, K. Scheutz, F. & Monday, S. 2011. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6699-6702.
- Garrity, G. et al. 2006. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. (Springer Science & Business Media).
- Giono-Cerezo S. 2003. "Diagnóstico de las enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal". En: Hernández-Méndez JT, García CRE, Giono CS, Aparicio OG. Bacteriología Médica diagnóstica. México: 79-81, 134.
- Hernández C. et al. 2011. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre.
- Jay, J. M.; Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology. 7th edition. Ed. Springer, New York, p 13. 42, 36.
- Jay, M. et al. 2007. *Escherichia coli* O157: H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. Emerg Infect Dis 13, 1908-1911.
- Jiménez, E. M.; Chaidez, Q. C.; León, F.J. 2012. Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. Vet. Méx., 434. Páginas, 273 - 284.
- Juska, A.; Gouveia, L.; Gabriel, J. and Stanley, K. P. 2003. Manufacturing bacteriological contamination outbreaks in industrialized meat production systems: The case of *E. coli* O157:H7. Agriculture and Human Values 20: 3-19. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Kaspar, C. Doyle, M. & Archer, J. 2009. Food Safety Review: non-O157: H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Res. Inst. UW-Madison Dispon. En Httpfrie Wisc EdudocspdfFRIBriefNonO157STEC410 Pdf Acceso 17-10-12.
- Leotta, Gerardo A. (2009). Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. Revista argentina de microbiología, 41(2), 63-64.
- Madigan, M. et al. 2004. Brock - Biology of Microorganisms. 10ª ed. Pearson - Prentice Hall, p 812.
- Martin, A. & Beutin, L. 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. Int. J. Food Microbiol. 146, 99-104.
- Mora, A. et al. 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). Int. J. Food Microbiol. 114, 204-210.
- Mora, A. et al. 2009. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. Int. Microbiol.
- Mossel, D. et al. 2003. Microbiología de los Alimentos. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, p 15, 599, 634, 637.
- National Digestive Diseases Information Clearinghouse. 2014. Intoxicaciones por alimentos, NIH Publication No. 14-4730S.
- Noris, M. & Remuzzi, G. 2009. Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. N. Engl. J. Med. 361, 1676-1687).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015. [FAO - División de Producción y Sanidad Animal](#)
- Organización Mundial de la Salud, 2020. [Inocuidad de los alimentos \(who.int\)](#)
- Organización Mundial de la Salud. 2018. [E. coli \(who.int\)](#).

- Polpakdee, A. and Angkititrakul, S. 2015. Prevalence of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Salmonella spp. isolated from meat and cooked meat at Khon Kaen Municipality Schools. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 4(Suppl 1):P114. <http://www.aricjournal.com/content/4/S1/P114>.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica Mex.; 44:464-475.
- Sharpe, M. 1981. En: The Prokaryotes. Vol II. Starr MP et al., eds. Springer-Verlag, Berlin, p 1653.
- United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. USDA/ FSIS (2008) United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat Products. MLG 5.04. Effective 1/28/08. Washington DC, EE.UU.
- Vila, J. Álvarez, MJ. Buesa, J. Castillo, J. 2009. “Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales”. Enferm Infecc Microbiol Clin; 27: 406-411.
- Wu, G. et al. 2008. Genetic diversity among Escherichia coli O157: H7 isolates and identification of genes linked to human infections. Infect. Immun. 76, 845-856.
- Zhang, S.; Zhu, X.; Wu, Q.; Zhang, J.; Xu, X. & Li, H. 2015. Prevalence and characterization of Escherichia coli O157 and O157:H7 in retail fresh raw meat in South China. Ann Microbiol. 65:1993-1999.
- Zhi-Dong, J. DuPont, HL. Brown, EL. Nandy, RK. Ramamurthy, T. Sinha, A. et al. 2010. “Microbial etiology of travelers’ diarrhea in Mexico, Guatemala and India. Importance of enterotoxigenic Bacteroides fragilis and Arcobacter species”. J Clin Microbiol 2010. En prensa.

Cuerpo Académico UJE-CA-131 Ciencias farmacoquímicas de Productos naturales

LGAC: Farmacoquímica de los Productos naturales

Nombre del proyecto	Investigador responsable	
Actividad biológica de extractos vegetales de especies del semidesierto	Dra. Concepción García Luján	
Patrones de resistencia a los antimicrobianos en cepas bacterianas y fúngicas de origen nosocomial		
Evaluación de la actividad cicatrizante y antioxidante del extracto etanólico de propóleo	Dr. Miguel Téllez López	
Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos vegetales en líneas celulares	Dr. Joaquín Avalos Soto	 

QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA

(Biotecnología, Toxicología, Farmacéutica, Clínica)



"No hay árbol que el viento no haya sacudido"
Proverbio indú.

Papel de la enzima Nitroreductasa tipo I de *Trypanosoma cruzi* en el metabolismo de fármacos anti-chagásicos

¹Cárdenas-Guerra Rosa E, ¹Martínez Ignacio, ¹Espinoza Bertha.

¹Laboratorio de Estudios sobre Tripanosomiasis. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico.

*Email: besgu@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el parásito causante de la enfermedad de Chagas es un protozoo de importancia médica que también causa impactos sociales. Por más de 50 años solo se han aprobado dos medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad: Nifurtimox y Benznidazol. Durante mucho tiempo, se desconoció el mecanismo de estos compuestos nitroheterocíclicos para ejercer su papel en la eliminación de los parásitos. La mayoría de los compuestos nitroheterocíclicos son tóxicos, mutagénicos y cancerígenos para los organismos vivos, pero algunos microorganismos han desarrollado vías para degradar o transformar estos compuestos. Las enzimas nitroreductasas son las encargadas de participar en la reducción de una variedad de nitrocompuestos. En los tripanosomátidos se han estudiado los dos tipos de nitroreductasas, tipo I y II. Las nitroreductasas tipo I (NTR I), son enzimas que no producen especies reactivas de oxígeno, son dependientes de NADH y se localizan en la mitocondria. Los tripanosomátidos son de los pocos eucariontes que cuentan con la NTR I y aunque la función de esta proteína en *T. cruzi* no ha sido entendida cabalmente, se ha propuesto que con base a su ubicación mitocondrial pudiera estar relacionada con la obtención de energía del parásito. La NTR I es la responsable de la activación del Nifurtimox y Benznidazol, pero se conoce que la pérdida de una copia del gen causa una reducción en el nivel de su actividad y confiere resistencia cruzada a los parásitos contra estos dos agentes tripanocidas sin afectar el crecimiento, ni cambiar el fenotipo de virulencia. Recientemente, nuestro grupo de trabajo secuenció la NTR I de la cepa mexicana Querétaro y mediante un análisis filogenético observó que comparte un alto grado de identidad con sus homólogos de otras cepas de *T. cruzi*, independientemente de la sensibilidad o no a los fármacos. En la actualidad se analiza la conveniencia de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por tripanosomátidos, pues al tener un modo de acción compartido mediado por la NTR I, implica el riesgo de que los parásitos resistentes

a un compuesto nitroheterocíclico puedan ser resistentes a un segundo.

Palabras clave: Chagas, *Trypanosoma cruzi*, fármacos y nitroreductasa I

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the parasite that causes Chagas disease, is a medically important protozoan that also causes social impacts. However, only two drugs have been approved for more than 50 years to treat this disease: Nifurtimox and Benznidazole. For a long time, the mechanism of these nitroheterocyclic compounds to exert their role in eliminating parasites was unknown. Most nitroheterocyclic compounds are toxic to living organisms, but some microorganisms have developed pathways to degrade or transform these compounds. Nitroreductase enzymes are responsible for participating in the reduction of a variety of nitro compounds. The two types of nitroreductases, type I and II, have been studied in trypanosomatids. Type I nitroreductases (NTR I) are enzymes that do not produce reactive oxygen species, are dependent on NADH, and are located in the mitochondria. Trypanosomatids are one of the few eukaryotes that have NTR I. Although the function of this protein in *T. cruzi* is not yet understood, it has been proposed that it could be related to obtaining energy from the parasite based on its mitochondrial location. Thus, NTR I is responsible for the activation of Nifurtimox and Benznidazole. Still, it is known that the loss of a copy of the gene causes a reduction in the level of its activity and confers cross-resistance to parasites against these two trypanocidal agents without affecting growth nor change the virulence phenotype. Recently, our working group sequenced the NTR I of the Mexican strain Queretaro and, through phylogenetic analysis, observed that it shares a high degree of identity with its homologs of other strains of *T. cruzi*, regardless of the sensitivity or not to the drugs. Currently, the convenience of developing new drugs is analyzed to treat diseases caused by trypanosomatids because having a sharing

mode of action mediated by the enzyme NTR I, implies the risk of resistant parasites to a nitroheterocyclic compound may be resistant to a second.

Key words: Chagas, *Trypanosoma cruzi*, drugs, and nitroreductase I

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi, el parásito causante de la enfermedad de Chagas es un protozooario de importancia médica que también causa impactos sociales. La enfermedad de Chagas (una enfermedad desatendida por los sistemas de salud públicos y privados) es una patología que se caracteriza por causar padecimientos de tipo cardíaco en aproximadamente una tercera parte de las personas infectadas, afectando su calidad de vida y limitando su capacidad laboral. Este padecimiento fue considerado por muchos años como endémico de Latinoamérica, aunque las migraciones de personas infectadas lo han llevado a países no endémicos de América (como EUA) y del Mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que hay más de 8 millones de personas infectadas con este parásito y más de 25 millones de personas en riesgo de infección. En México la mayor incidencia de esta enfermedad se da en los estados de Campeche, Guerrero, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Dirección General de Epidemiología, 2019, Tripanosomiasis).

Nitroreductasas y los nitrocompuestos

A pesar del impacto que este padecimiento tiene en términos sociales y de salud, por más de 50 años solo se han aprobado dos medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad: Nifurtimox y Benznidazol. Ambos son compuestos que tienen un grupo nitro (NO_2) unido a su anillo aromático, nitrofurano y nitroimidazol, respectivamente (Fig. 1). Durante mucho tiempo no se contó con información sobre el mecanismo por el cual ambos compuestos eran metabolizados para ejercer su papel en la eliminación de los parásitos. Actualmente se conoce que para que estos compuestos puedan tener un efecto tripanocida sobre *T. cruzi* tienen que ser metabolizados por la enzima nitroreductasa tipo I (NTR I) dentro del patógeno (Wilkinson y col., 2008).

La mayoría de los compuestos nitroheterocíclicos o nitroaromáticos son tóxicos, mutagénicos y cancerígenos para los organismos vivos, pero algunos microorganismos han desarrollado vías oxidativas o reductoras para

degradar o transformar estos compuestos. Las enzimas nitroreductasas son las encargadas de participar en la reducción de una variedad de nitrocompuestos (Boddu y col., 2021). Los genes que codifican proteínas similares a la nitroreductasa están presentes en la mayoría de los genomas bacterianos, en arqueas y algunos organismos eucariontes. En los sistemas de mamíferos la identificación y caracterización de estas enzimas aún no se ha revelado. Sin embargo, la actividad de nitroreductasas de mamíferos se ha considerado como un objetivo favorable en el desarrollo de agentes teranósticos para el cáncer y la hipoxia de tumores sólidos (Yoon y col., 2021). Para las bacterias, la actividad enzimática de la nitroreductasa se ha entendido bastante bien, aunque la función fisiológica de las nitroreductasas es aún desconocida, algunos estudios sugieren que participan en respuesta al estrés oxidativo o equilibrio redox y otros que estas proteínas están asociadas con vías metabólicas. Se sabe que en sistemas bacterianos las alteraciones funcionales de la proteína (mutaciones, disminución de la expresión, delecciones, etc.) se correlacionaron con resistencia a diversos fármacos (Roldan y col., 2008; Marques de Oliveira y col., 2010).

Tipos de nitroreductasas

Se han descrito dos tipos de nitroreductasas tipo I y II, por su respuesta al oxígeno: la nitroreductasas de tipo I son proteínas de unión no covalente a mononucleótido de flavina (FMN) dependientes de NAD(P)H que se encuentran comúnmente en bacterias, pero raras en eucariotas. Ellas median una reducción de dos electrones del grupo nitro para generar un intermedio nitroso que rápidamente se reduce a un derivado de hidroxilamina. Este derivado puede interactuar directamente con macromoléculas biológicas, lo que provoca daño celular, o puede someterse a un procesamiento adicional para generar agentes citotóxicos y mutagénicos. Debido a que la reducción por nitroreductasa tipo I no involucra oxígeno y no da como resultado la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), se dice que esta actividad es “insensible al oxígeno”.

Por el contrario, las ubicuas nitroreductasas de tipo II contienen FMN (flavina adenina dinucleótido) como cofactor, y su actividad es “sensible al oxígeno”. Catalizan la reducción de un electrón del grupo nitro, formando un radical anión nitro. En presencia de oxígeno, este radical sufre un ciclo fútil, lo que resulta en la producción de aniones superóxido y la regeneración del compuesto nitro original (Hall y col., 2011).

Nitroreductasas I y II en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son de los pocos eucariontes que cuentan con la NTR I y aunque la función de esta proteína en *T. cruzi* no ha sido entendida cabalmente, se ha propuesto que con base a su ubicación mitocondrial y preferencia por sustratos basados en quinonas pudiera estar relacionada con la obtención de energía mediante la catálisis de la transferencia de electrones de NADH a ubiquinona, para la producción de ubiquinol en la cadena respiratoria (Wilkinson y col., 2008; Hall y col., 2012). Además, se infiere que la NTR I del género *Trypanosoma* tiene una secuencia de señal de direccionamiento mitocondrial en la región N-terminal, pero aún no hay información disponible que indique si esta secuencia es importante para la bioactivación de Benznidazol. Solo para *T. brucei* se demostró experimentalmente que la secuencia del extremo 5' de TbNTR dirige las proteínas a la mitocondria (Petravicius y col., 2019, Wilkinson et al., 2008).

Se sabe que la presencia de NTR I es conservada en otros tripanosomátidos como *T. brucei*, *T. rangeli* y especies de *Leishmania*, lo cual sugiere que es un rasgo evolutivo, y que su función es importante para este grupo de parásitos (Montenegro y col., 2017, Petravicius y col., 2019). Esta idea ha sido reforzada por trabajos que demuestran que esta proteína es esencial en *T. brucei*, pues los mutantes nulos de la misma no sobreviven. Asimismo, la pérdida completa de la actividad de esta enzima afecta la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (fase infecciosa) de *T. cruzi*, lo cual subraya la importancia de esta enzima para los tripanosomátidos (Wilkinson y col., 2008).

A este respecto, se han estudiado las dos clases de NTR tipo I y II en los tripanosomátidos. Estas últimas producen la generación de ERO tras una reducción de un electrón provocada por la actividad enzimática de NTR tipo II que, en condiciones aeróbicas induce la producción de aniones superóxido y provoca el reciclado del fármaco. Varios estudios iniciales sugirieron que los tripanosomas bioactivan el Nifurtimox mediante un mecanismo dependiente de nitroreductasa tipo II y que el estrés oxidativo resultante era responsable de la citotoxicidad observada. Sin embargo, no hay evidencia de que estos radicales libres contribuyan a la actividad tripanocida. Normalmente, los aniones superóxido son desintoxicados por las superóxido dismutasas (SOD), una familia de metaloenzimas antioxidantes. El único vínculo indirecto entre la formación de ERO inducidas

por fármacos y la actividad tripanocida proviene de estudios funcionales sobre la SODB1 de *T. brucei*, donde los parásitos que carecen de este gen son más sensibles al Nifurtimox y Benznidazol (Hall y col., 2011; Prathalingham y col., 2007).

Activación del Nifurtimox y Benznidazol por la NTR I

Por otra parte, las nitroreductasas tipo I, son enzimas que no producen ERO. Estas proteínas son dependientes de NADH y se localizan en la mitocondria. En *T. cruzi*, se han identificado dos nitroreductasas que muestran actividad tipo I. Una de ellas, la prostaglandina F2 α sintasa (OYE) (Kubata y col., 2002; Murta y col., 2006) tiene la capacidad de promover la reducción de Nifurtimox, pero no de Benznidazol, en condiciones anaeróbicas, por lo que no se le atribuye un papel significativo en la activación de compuestos, aunque aún se sigue estudiando su función en el parásito (Hall, y col., 2011).

La otra enzima, la NTR I identificada apenas en el 2008 por Wilkinson y col., ha sido descrita como la principal responsable de activar una variedad de compuestos nitroheterocíclicos, incluidos nitrofuranos y nitroimidazoles como Nifurtimox y Benznidazol. La NTR I presenta características mostradas por muchos de sus homólogos bacterianos; la actividad es insensible al oxígeno, lleva a cabo la función de acoplarse a la coenzima FMN y media la reducción de dos electrones del grupo nitro de los compuestos nitroheterocíclicos para generar una reacción óxido-reducción, generando metabolitos tóxicos que dañan al parásito. En el caso de la reducción de Nifurtimox por esta enzima genera un producto caracterizado como un nitrilo insaturado de cadena abierta, que es responsable del efecto tripanocida (Hall y col., 2011). En el caso del Benznidazol, el metabolismo del fármaco conduce a la formación del agente citotóxico y mutagénico glioxal, un metabolito con diversos efectos tóxicos y mutagénicos, como poder generar aductos de guanosina-glioxal que alteran la estabilidad del ADN y por tanto la viabilidad del parásito (Hall y Wilkinson, 2012) (Fig. 1).

Debido a que la NTR I de *T. cruzi* no tiene estructura cristalizada, se han estudiado algunos cambios conformacionales por modelos estructurales aceptables, inferidos por analogía con la nitroreductasa de *E. coli* nfsB (Parkinson y col., 2000; Soto-Ospina y Marin, 2017), observando que una mutación no sinónima en la región de unión con el cofactor FMN en la NTR I no permite el anclaje de FMN y como consecuencia la susceptibilidad

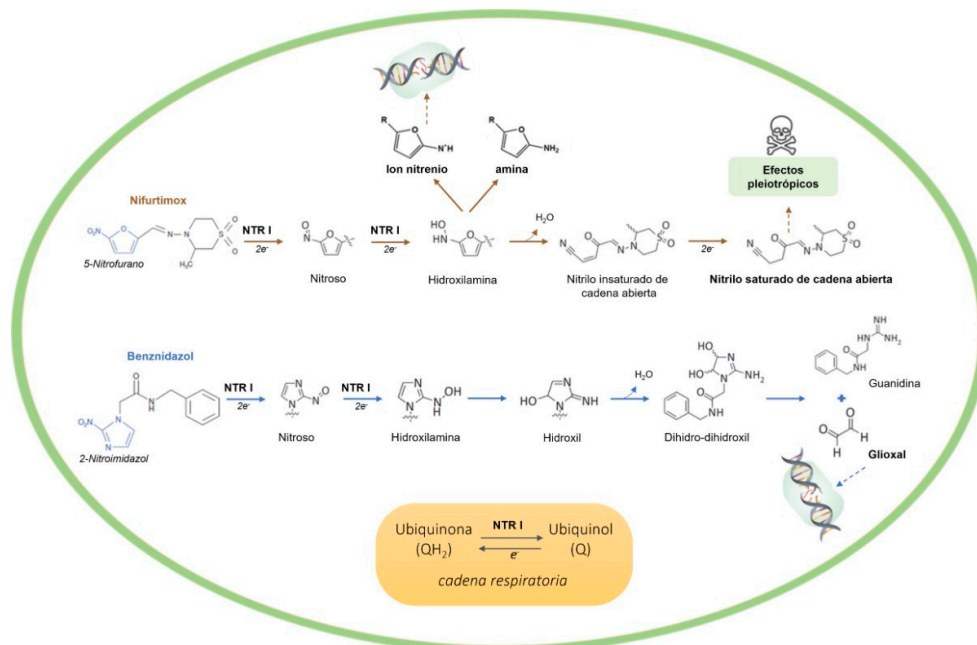


Figura 1. Metabolismo de Nifurtimox y Benznidazol mediante NTR I y su posible función endógena. La enzima reduce el grupo nitro, a través de un nitroso intermedio, a un derivado de hidroxilamina mediante una serie de transferencias de dos electrones usando NADH como fuente de equivalentes reductores. Para los Nitrofuranos (como Nifurtimox), la hidroxilamina puede ser metabolizada adicionalmente con varias rutas propuestas para generar metabolitos citotóxicos, estos incluyen formación de un ion nitrenio, reducción a la forma de amina, o escisión del anillo del furano formando nitrosos insaturados de cadena abierta y luego saturados. En el caso de los Nitroimidazoles (como Benznidazol), el metabolito de hidroxilamina, a pH fisiológico, forma un ion nitrenio que se descompone espontáneamente en un metabolito hidroxilado. Esto sufre hidratación en el derivado dihidro-dihidroxil que puede fragmentarse para liberar glioxal, un metabolito citotóxico. La NTR I se sugiere estar relacionada con la obtención de energía mediante la catálisis de la transferencia de electrones de NADH a ubiquinona, para la producción de ubiquinol en la cadena respiratoria.

del parásito al Benznidazol disminuye al no poder reducirse el fármaco (Marín y Soto-Ospina, 2018).

NTR I responsable de la resistencia a fármacos anti-chagásicos

Por su importancia en el metabolismo de los dos compuestos anti-chagásicos esta proteína ha sido mejor caracterizada en los tripanosomátidos. Se sabe que el gen de la NTR I tiene dos copias por genoma, pero la pérdida de una copia del gen causa una reducción en el nivel de su actividad y confiere resistencia cruzada a los parásitos contra estos dos agentes tripanocidas, sin afectar el crecimiento, ni cambiar el fenotipo de virulencia (Wilkinson y col., 2008; Mejía-Jaramillo y col., 2011; Mejía y col., 2012). Por el contrario, se ha observado en *T. brucei*, que al sobreexpresar esta proteína los parásitos son más sensibles a los compuestos nitroheterocíclicos. A partir de estas observaciones se ha propuesto que la pérdida de una copia del gen de la NTR I podría ser la causa de la adquisición y mantenimiento de la resistencia en *T. cruzi* a los compuestos heterocíclicos (Wilkinson y col., 2008).

Por otra parte, existe la posibilidad de que mutaciones específicas en la NTR I puedan generar versiones de la enzima que mantienen la función endógena, pero pierden la capacidad de activar los compuestos anti-chagásicos, lo que resultaría en resistencia al tratamiento. Además de la resistencia mediada por la NTR I, evidencia experimental indica que algunos mecanismos adicionales pueden afectar la eficacia del fármaco, estos datos sugieren que la variación natural en la sensibilidad no involucra mutaciones en NTR I y que la resistencia por este mecanismo puede ser un rasgo que surge solo después de la presión selectiva (Mejía y col., 2012).

En este sentido, se ha secuenciado la nitroreductasa tipo I de diversas cepas sudamericanas de *T. cruzi*, resistentes o susceptibles a los fármacos. Sin embargo, no se cuenta con información de esta proteína en cepas mexicanas del parásito y tampoco se ha comparado entre cepas pertenecientes a diferentes Unidades Discretas de Tipificación (DTUs, TcI-TcVI) y más recientemente TcBat (aunque sigue siendo poco estudiado), clasificación otorgada por la extraordinaria diversidad genética

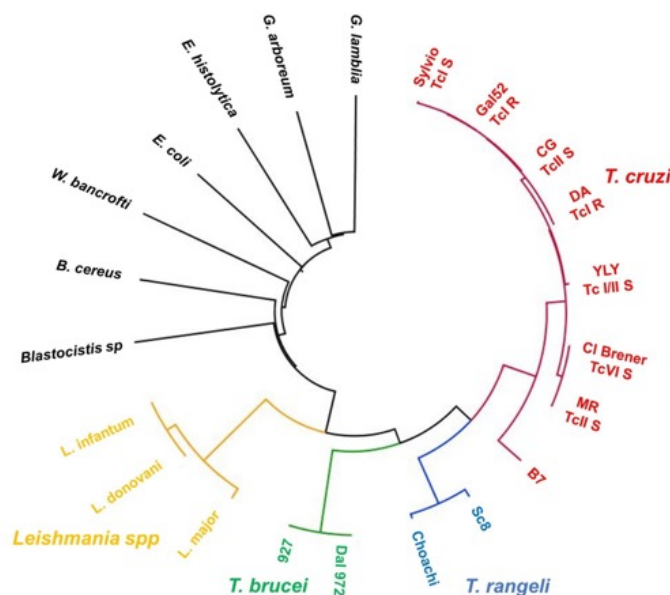


Figura 2. Filogenia de NTR I de *T. cruzi*. Las secuencias de NTR I de diversas cepas de *T. cruzi* fueron comparadas mediante un análisis de Neighbor joining. Sensibilidad a los fármacos (S: susceptible; R: resistente). Las secuencias de *T. cruzi* corresponden a las cepas Sylvio (EKG06918), Gal52 (AFJ52893), CG (AFJ52882), DA (AFJ52890), YLY (AFJ52881), CI Brener (XP810645), MR (AFJ52884) y B7 (EKF39034). También se incluyeron secuencias de *G. lamblia* (XP_001705312), *G. arboreum* (KHG07360.1), *E. histolytica* (ABE99820), *E. coli* (AFG39440), *W. bancrofti* (EJW84994), *B. cereus* (Q81BQ8), *Blastocystis sp* (OAO13284), *L. infantum* (XP_001463029), *L. donovani* (XP_003858253), *L. major* (XP_001687543), *T. brucei* 927 (XP_846343), *T. brucei* 972 (XP_011775280), *T. rangeli* Sc8 (ESL06666) y *T. rangeli* Choachi (AHL85556).

intraespecífica de *T. cruzi* (Zingales y col., 2009; 2012, Barnabé y col., 2016). Mediante un análisis filogenético se observó que la NTR I comparte un alto grado de identidad con sus homólogos de otras cepas de *T. cruzi*, independientemente del DTU al que pertenecen y de la sensibilidad o no a los fármacos. Recientemente, nuestro grupo de trabajo secuenció la NTR I de la cepa mexicana Querétaro (GenBank: MN562195. ID proteína: QKY59680) (Fig.2).

Actualmente se analiza la conveniencia de desarrollar nuevos compuestos nitroheterocíclicos para el tratamiento de enfermedades causadas por tripanosomátidos, pues al tener un modo de acción compartido mediado por la NTR I, implica el riesgo de que los parásitos resistentes a un compuesto nitroheterocíclico puedan ser resistentes a un segundo. En el caso particular de Nifurtimox y Benznidazol, ambos han demostrado tener limitaciones en su eficacia contra *T. cruzi*, asociadas a la etapa de la infección y a la susceptibilidad o resistencia de cada cepa del parásito, lo cual, aunado a los numerosos efectos adversos, ha llevado a buscar compuestos tripanocidas con una naturaleza química diferente, que sean más efectivos y seguros para el tratamiento de esta infección (Patterson y Wyllie, 2014).

CONCLUSIÓN

La enzima NTR I de *T. cruzi* es la responsable de la activación de los profármacos nitroheterocíclicos. A pesar de tener la ventaja de estar ausente en las células de los mamíferos, una característica importante para el desarrollo de moléculas terapéuticas aún falta por entender como la interacción de la genética del parásito y las características del huésped, así como las propiedades farmacocinéticas de los compuestos son importantes en el proceso de resistencia que otorga la NTR I. En resumen, todos estos parámetros merecen una investigación más profunda para la comprensión de nuevos compuestos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo del IIBO a través del programa Institucional NUATEI, PAPIIT-DGAPA IN206620 y de DGAPA-UNAM beca postdoctoral otorgada a RECG.

REFERENCIAS

- Boddu RS, Perumal O and K, D. Microbial nitroreductases: A versatile tool for biomedical and environmental applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2021;68: 1518-1530.
- Dirección General de Epidemiología. Anuarios de morbilidad, información de epidemiológica Secretaría de Salud 1984-2017. 2018. Disponible en <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13088-95.
- Hall BS, Meredith EL, Wilkinson SR. Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop antitrypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5821-30.
- Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):115-23.
- Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, Ohkubo K, et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 2002;196(9):1241-51.
- Marín PA, Ospina AS, editors. Structural Relationship of Flavin Mononucleotide (FMN) and Type I Nitroreductase (NTR) of *Trypanosoma cruzi* in Resistance Testing with Benznidazole and Nifurtimox. *Preprints* 2018, 2018060012.
- Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gomez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chavez O, et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis*. 2012;206(2):220-8.
- Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana-Chávez O. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors*. 2011;(4):169.
- Montenegro M, Cuervo C, Cardenas C, Duarte S, Diaz JR, Thomas MC, et al. Identification of a type I nitroreductase gene in non-virulent *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(7):504-9.
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;146(2):151-62.
- de Oliveira IM, Bonatto D, Antonio J, Henriques P, Vargas RFG. Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology 2010;2(1), 1008-1019.
- OMS 2021. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Ospina AS, Marín PA, editors. In Silico Prediction of the Structural Model of the Parasite *Trypanosoma cruzi* Nitroreductase Enzyme and Its Structural Validation. *J. Bioinform. Comput. Biol*. 2018; 2(2):7-14
- Parkinson GN, Skelly JV, Neidle S. Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: a prodrug-activating enzyme. *J Med Chem*. 2000;43(20):3624-31.
- Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol*. 2014;30(6):289-98.
- Petravicius PO, Costa-Martins AG, Silva MN, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Teixeira MMG, Zingales B. Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. *Acta Trop*. 2019 ;200:105161.
- Prathalingham SR, Wilkinson SR, Horn D, Kelly JM. Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodB1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(2):755-8.
- Roldan MD, Perez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivian C. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(3):474-500.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5022-7.

- Yoon SA, Chun J, Kang C, Lee MH. Self-calibrating bipartite fluorescent sensor for nitroreductase activity and its application to cancer and hypoxic cells. *ACS Appl Bio Mater.* 2021;15;4(3):2052-2057.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(7):1051-4.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240

Cuerpo académico UJE-CA-108 Fisiopatología en Salud Ambiental

LGAC: Bases Moleculares y Bioquímicas de la Salud Ambiental

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Identificación de biomarcadores pronóstico en pacientes diagnosticados con COVID-19, su asociación con el estado general de salud y su calidad de vida postinfección en población de la Comarca Lagunera de Durango	Dra. Rebeca Pérez Morales	Polimorfismo 
Alteración en la síntesis de hormonas tiroideas durante la intoxicación crónica por nitrato de sodio		
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.		
Anemia asociada a factores ambientales en el estudiante Universitario	Dra. Esperanza Yasmín Calleros Rincón	
Alteraciones de la glándula tiroides 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	Dr. Edgar Héctor Olivas Calderón	
Evaluación del daño oxidativo al ADN en niños con exposición prenatal al arsénico, flúor y compuestos organoclorados		

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

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



CIENCIAS BIOMÉDICAS

(Salud, Epidemiología, Nutrición)



*"Si exagerámos nuestras alegrías, como hacemos con nuestras penas,
nuestros problemas perderían importancia"*

Anatole France (1844-1924); novelista francés, premio Nobel de Literatura.

Estudio sobre la Secreción de la Citocina TGF- β por Células de Melanoma:

Metodologías útiles de fácil implementación y bajo costo

¹Anaya-Rubio Isabel A., ²Tecalco-Cruz Ángeles C., ³González-Espinosa Claudia, ¹Sosa-Garrocho Marcela,
¹Macías-Silva Marina, ^{1*}Pérez-Calixto Mitzi P.

¹Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, C.P.04510, México.

²Programa en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
Ciudad de México, C.P. 03100, México.

³Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav),
IPN, Unidad Sede Sur. Ciudad de México, C.P. 14330, México.

*E-mail: mcaxlxt@lfc.unam.mx

RESUMEN

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo que surge de la transformación maligna de los melanocitos. Las células de melanoma secretan diversas biomoléculas al medio extracelular en forma soluble o en vesículas extracelulares (EV), las cuales están involucradas en la comunicación intercelular a través del intercambio de proteínas, lípidos y material genético. La citocina TGF- β es una de las moléculas clave secretadas en la progresión del melanoma. El presente trabajo describe la implementación de métodos sencillos y accesibles para estudiar los mecanismos de secreción del TGF- β por las células de melanoma: 1) El uso de un gen reportero para realizar una determinación semi-cuantitativa del TGF- β activo en los medios condicionados de las células de melanoma cultivadas; y 2) La ultracentrifugación diferencial para el aislamiento y la caracterización de EV del tipo exosoma por microscopía electrónica de transmisión y por inmunoblots de los marcadores exosomales CD63, Alix y TSG-101.

Palabras clave: Citocina TGF- β ; melanoma; secreción; vesículas extracelulares.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer that emerges from the malignant transformation of melanocytes. The intercellular communication in the tumor microenvironment of melanoma is essential for cancer progression. Melanoma cells secrete diverse biomolecules either soluble or within extracellular vesicles (EV) that are involved in intercellular communication through the exchange of proteins, lipids, and genetic material. One of those biomolecules is the cytokine TGF- β , a key molecule for melanoma progression. The present work is focused on describing the implementation of simple and cost-effective methods to study TGF- β secretion by melanoma cells or by any cultured cell type: 1) The use of a gene reporter to determine the presence of active TGF- β in conditioned media from cultured melanoma cells; and 2) The use of differential ultracentrifugation adapted to isolate and characterize EV, such as exosomes, by transmission electron microscopy (TEM) and by immunoblots through the detection of exosomal markers as CD63, Alix and TSG-101.

Keywords: TGF- β cytokine; melanoma; secretion; extracellular vesicles.

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- β*) es una citocina pleiotrópica que controla diversas funciones celulares como la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la migración y la apoptosis. La superfamilia del TGF- β contiene más de 40 miembros identificados a la fecha, los cuales incluyen a las siguientes subfamilias: TGF- β s, activinas, proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y factores de desarrollo y crecimiento (GDFs), así como a la sustancia inhibitoria mulleriana (MIS) y a las proteínas nodal y miostatina. En la subfamilia del TGF- β existen tres isoformas (TGF- β 1, - β 2 y - β 3), cada una codificada por un gen distinto, con algunas funciones diferentes *in vivo* (Massagué, 2012; Tzavlaki & Moustakas, 2020). El TGF- β o los miembros de la superfamilia pueden ser sintetizados y secretados por la mayoría de las células. Asimismo, casi todas las células pueden responder a las señales de uno o más de estos ligandos. Estos mensajeros químicos tienen funciones importantes en los procesos que ocurren en el desarrollo embrionario y en la fisiología del organismo adulto, manteniendo la homeostasis o participando en procesos de reparación o regeneración tisular. Cualquier alteración en sus mecanismos de acción puede contribuir al desarrollo de patologías como las enfermedades autoinmunes, la fibrosis y el cáncer (Massagué, 2012).

En los diferentes tipos de cáncer, el TGF- β puede ejercer sus efectos supresores de tumores principalmente en las etapas tempranas, al ser capaz de inhibir la proliferación y la diferenciación, así como al promover la muerte celular (Massagué & Gomis, 2006; Lebrun, 2012). Sin embargo, en etapas avanzadas se han encontrado alteraciones genéticas y epigenéticas en el gen del TGF- β y en los genes de los componentes de su vía de señalización. Tales alteraciones inhiben su función de supresor tumoral y promueven su actividad como un promotor tumoral, favoreciendo la proliferación y la supervivencia celular, así como procesos como la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la evasión del sistema inmune (Massagué, 2008; Perrot et al., 2013).

El melanoma cutáneo es la principal causa de muerte dentro de los diferentes tipos de cáncer de piel, su incidencia mundial es de 15-25 casos por cada 100,000 individuos y, en México, su incidencia es de alrededor de 1.1 casos por cada 100,000 habitantes (Lino-Silva et al., 2016; Somasundaram & Herlyn, 2012). Esta neoplasia se origina cuando los melanocitos se transforman en

las células malignas que forman el melanoma. La transformación se lleva a cabo por etapas. Comienza con un cúmulo de melanocitos que forman un nevo (lunar), el cual va progresando hasta convertirse en melanoma *in situ* y, finalmente, en un melanoma invasivo (metástasis). Esta conversión secuencial se origina por diferentes factores, entre los que se encuentran, principalmente, la exposición a la luz solar y a la radiación UV (El Ghissassi et al., 2009) y, en menor medida, la predisposición genética, la inmunosupresión, una gran cantidad de lunares en el cuerpo y la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wong & Ribas, 2016).

Debido a que el melanoma es uno de los cánceres más mortales, se han desarrollado diversos tratamientos terapéuticos, que van desde terapias químicas o radiológicas hasta la cirugía. Una característica importante en la transformación de los melanocitos a melanoma es la producción de sus propios factores de crecimiento, entre los que destaca la secreción del TGF- β (Perrot et al., 2013; Polsky & Cordon-Cardo, 2003). Se sabe que en los melanocitos sanos la expresión del TGF- β es muy baja, en comparación con su elevada expresión en las células de melanoma. Además, la alteración de los componentes de la vía del TGF- β está asociada con la evolución tumoral y la progresión de los tumores malignos (Krasagakis et al., 1999).

La vía de señalización del TGF- β en el melanoma presenta características tales como un aumento de la producción de ligandos de la familia del TGF- β y una mayor liberación de los mismos hacia el microambiente tumoral, por lo que la activación de estos ligandos en el melanoma promueve el depósito de matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular matrix*) y, en consecuencia, un aumento de la angiogénesis, la supervivencia de las células cancerosas y su transición a fenotipos más agresivos. Las diferentes isoformas del TGF- β tienen distintas funciones en el desarrollo y en la progresión del melanoma. Las isoformas TGF- β 1 y - β 3 son expresadas por algunos melanocitos normales y en mayor cantidad en nevos y células de melanoma. La presencia del TGF- β 2 no se ha reportado en los melanocitos; no obstante, el TGF- β 2 se expresa heterogéneamente en melanomas primarios y metastásicos, por lo que se ha sugerido que la expresión del TGF- β 2 tiene una correlación positiva con la progresión de la enfermedad. La expresión más uniforme del TGF- β 3 en etapas avanzadas del cáncer sugiere que esta citocina podría participar en la conversión del nevo a melanoma. Por lo que se considera que las distintas isoformas del TGF- β

desarrollan funciones diferentes en la progresión del melanoma (Schadendorf et al., 2015). Sin embargo, no se ha dilucidado del todo la participación de las diferentes isoformas del TGF- β en el desarrollo de este tipo de neoplasia. Además, son pocos los estudios enfocados a investigar los distintos mecanismos de secreción de estos factores.

El TGF- β es secretado al espacio extracelular como una molécula precursora inactiva, contenida en el llamado complejo pequeño del TGF- β latente (del inglés, *small latent TGF- β complex*) que incluye a la proteína LAP (del inglés, *Latency-Associated Peptide*). LAP está asociada de forma no covalente con el TGF- β y se encuentra almacenado en la ECM en unión covalente con LTBP (del inglés, *Latent TGF- β Binding Protein*), formando al complejo grande del TGF- β latente (del inglés, *large latent TGF- β complex*). Cuando el TGF- β está unido a la proteína LAP, ésta evita que el TGF- β se una a sus receptores y los active. La activación del TGF- β , es decir, la escisión de la proteína LAP asociada al TGF- β , está controlada por diferentes mecanismos moleculares, como la proteólisis enzimática (furinas, plasminas, etc.) o por la proteólisis ácida, básica o térmica, que liberan al ligando activo (TGF- β maduro) de las proteínas asociadas a su latencia (LAP y LTBP) (Moses, 2016). La molécula del TGF- β activo, separada de LAP, es un homodímero que es estabilizado por un enlace disulfuro intercadena, cada monómero consta de un motivo conservado de residuos de cisteína que forman un anillo cerrado llamado nudo de cisteínas, conectado por 3 puentes disulfuro intracadena.

Los mecanismos de secreción de la citocina TGF- β dependen del tipo celular. Entre ellos se encuentra principalmente la secreción por la vía convencional; **además**, se ha descrito un mecanismo que implica el almacenamiento del TGF- β en las vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares (MVB), los cuales se pueden fusionar con la membrana plasmática para secretar al TGF- β a través de vesículas extracelulares (EV) del tipo exosoma (Koli et al., 2001; Duitman et al., 2011). La forma inactiva del TGF- β que está asociada a LAP (LAP-TGF β) puede estar unida a la ECM a través de glicoproteínas de heparán sulfato. También, la forma inactiva del TGF- β puede estar asociada con los exosomas mediante proteoglicanos de heparán sulfato (Shelke et al., 2019). Cuando el TGF- β se separa del exosoma, el TGF- β activo es capaz de unirse a sus receptores en la célula blanco o receptora.

Se sabe que el TGF- β latente puede ser secretado por diversos tipos de células de melanoma, como las líneas celulares humanas: WM 793, WM239-A, WM 852, WM 983-B y WM 164 (Rodeck et al., 1994); sin embargo, también se ha reportado que la línea murina de melanoma B16-F0 puede secretar al TGF- β en su forma activa (Penafuerte & Galipeau, 2008).

Los exosomas son pequeñas EV con un diámetro que varía entre 30 y 100 nm, que son secretadas por casi todos los tipos de células. La formación de estas vesículas procede del interior de los MVB, los cuales se pueden fusionar con la membrana plasmática y liberar su contenido (exosomas) al espacio extracelular. Los exosomas son elementos importantes en la comunicación celular, ya que pueden transportar y liberar distintas biomoléculas, con el fin de intercambiar lípidos, proteínas o ácidos nucleicos con otras células. Se dice que los exosomas son de origen endosomal si los MVB se originan de la vía endocítica y se caracterizan por la presencia de vesículas intraluminales (ILV), formadas por la gemación de la membrana de los MVB. Hasta ahora, se han descrito dos vías principales para la formación de ILV o exosomas, una vía dependiente del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) y la segunda vía es independiente de ESCRT (Kowal et al., 2014). Los exosomas son liberados de manera constitutiva o regulada al microambiente tumoral y a la circulación, participando activamente en la comunicación intercelular.

Los estudios sobre los exosomas han llevado a detectar diferentes proteínas comunes en su carga molecular, por lo que para su caracterización en la actualidad se utilizan ciertas proteínas como marcadores para exosomas, las cuales pertenecen a un subconjunto específico de proteínas, tales como: proteínas endosomales como las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas de membrana plasmática (Anexina II, flotilina, clatrina, Flotilina-1, ICAM-I, MHCI, MHCII y MFG.E8), proteínas del citosol (TSG101), o proteínas de choque térmico (Hsc70), entre otras (Théry et al., 2006); sin embargo, los marcadores más comunes presentes en los exosomas son Alix, CD63 y TSG101.

Existe evidencia clara de que diferentes tipos de células cancerosas secretan a la citocina TGF- β en exosomas. Por este medio ejercen un efecto sobre sus células blanco, promoviendo en ellas la activación de la vía de señalización del TGF- β (Gu et al., 2012; Szczepanski

et al., 2011). Distintos grupos han señalado que los exosomas pueden contener al TGF- β asociado a su membrana, ya sea en su estado activo o latente (Yamada et al., 2015; Shelke et al., 2019). Aunque también se ha reportado la presencia de los receptores para el TGF- β en exosomas, tales como el receptor tipo II T β RII o los receptores tipo III como el β -glicano o la endogлина. Cabe mencionar que el aumento en la expresión del TGF- β en exosomas se encuentra asociado a etapas avanzadas del cáncer (Steinbichler et al., 2017; Meurer et al., 2019). Sin embargo, el mecanismo molecular exacto, por el cual el TGF- β es dirigido como carga molecular hacia los exosomas, aún es poco claro. En años recientes, se han realizado estudios para detectar al TGF- β en las células o en las EV utilizando diversas técnicas y estrategias experimentales, para su cuantificación y su caracterización. Por lo que en este trabajo se describe la implementación de algunas metodologías bioquímicas, con el fin de poder realizar el aislamiento y la caracterización de las EV secretadas por las células de melanoma, basadas en protocolos simples y de bajo costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La mayoría de los reactivos utilizados fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich, mientras que aquellos empleados para cultivo fueron de GIBCO-Invitrogen. Los siguientes anticuerpos de ratón fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology: anti-Alix (sc-53540), anti-CD63 (sc-5275) y anti-TSG101 C-2 (sc-7964). El TGF- β 1 recombinante fue obtenido de PreproTech. La lipofectamina 2000 fue obtenida de Invitrogen, mientras que el kit para evaluar la actividad de luciferasa fue obtenido de Promega. El plásmido reportero p3TP-Lux fue una donación del Dr. Jeffrey L. Wrana del Mount Sinai Hospital (Toronto, Ontario, Canadá).

Cultivo de las células de melanoma B16-F1 y de las células epiteliales AD293

La línea celular de melanoma murino B16-F1 (CRL-6323) fue adquirida de ATCC® por la Dra. Claudia González Espinosa (Cinvestav-IPN). La línea celular AD293 fue una donación de la Dra. Diana Escalante Alcalde (IFC, UNAM). Las células B16-F1 fueron cultivadas en cajas Petri (100 mm de diámetro) para cultivo celular y en botellas con un área de 225 cm², en medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM, GIBCO™), alto en glucosa y suplementado con 10%

de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) de GIBCO™, que fue previamente inactivado a 56 °C durante 30 min; el medio de cultivo se complementó con 100 mM de piruvato de sodio y con los antibióticos penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100 μ g/mL). Las células AD293 fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10% de FBS y con los antibióticos penicilina (100U/mL) y estreptomicina (100 μ g/mL), mantenidas a 37 °C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂.

Transfección de las células AD293 por el método de lipofectamina

La línea celular AD293 es una clona derivada de la línea celular HEK293 de riñón de embrión humano, la cual se transfectó para expresar de forma estable al plásmido reportero p3TP-Lux, generando la línea celular reportera AD293-3TP-Lux. En resumen, las células AD293 se sembraron a una densidad del 60% en cajas Petri (10 cm de diámetro). Posteriormente se co-transfectaron de manera estable con los plásmidos 3TP-Lux (5 μ g) y pRSV (1 μ g) usando el método de lipofectamina (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células AD293-3TP-Lux fueron seleccionadas con 1 μ g/mL de puomicina a las 48 h después de la transfección, y, en este caso, la resistencia a la puomicina fue conferida por el plásmido pRSV.

Ensayo de actividad de luciferasa

Las células estables AD293-3TP-Lux fueron sembradas en una placa de 12 pozos a una densidad del 70% y 24 h después fueron ayunadas por 2 h. Las células fueron preincubadas por 30 min en ausencia (control) o presencia de 10 μ M del SB431542 (inhibidor del receptor T β R-I o ALK5) y, posteriormente, fueron estimuladas con TGF- β 1 recombinante (rTGF- β) exógeno a diferentes concentraciones (6.25, 12.5, 25 y 50 pM) durante toda la noche a 37 °C.

Obtención de los medios condicionados de las células de melanoma

Las células de melanoma B16-F1 fueron cultivadas hasta alcanzar una densidad del 90-100%, en medio DMEM con FBS al 10%. Después, el medio de cultivo fue reemplazado con medio de ayuno (DMEM sin FBS) por 24 h. Este último medio se colectó para los ensayos posteriores y se le denominó medio condicionado (MC), ya que contiene todo el material secretado por las células.

Aislamiento y purificación de EV a partir de MC

El protocolo empleado para el aislamiento y purificación de las EV del tipo exosoma, a partir de los MC de las células de melanoma B16-F1 cultivadas, consistió en una centrifugación diferencial secuencial, que se basó en un protocolo previamente publicado con algunas modificaciones (Théry et al., 2006). La descripción del protocolo se detalla en la sección de resultados.

Inmunoblots

Las EV secretadas por las células B16-F1 se resuspendieron en una solución de Laemmli 6x, las muestras se calentaron durante 5 min a 95 °C y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%, llevando a cabo una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés *SDS-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*). Enseguida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) que se utilizó para los inmunoblots. Después de bloquear la membrana por 1 h con una solución de leche descremada al 5% en solución de TBST (20 mM Tris base pH 7.4, 137 mM NaCl y 0.1% TweenTM20), la membrana se incubó durante toda la noche con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-Alix, anti-CD63 o anti-TSG101, en una dilución 1:1000; posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con TBST por 10 min cada vez y enseguida se incubó por 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón, acoplado a la enzima HRP (por sus siglas en inglés *horse-radish peroxidase*), en una dilución 1:10,000. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST por 10 min cada vez a temperatura ambiente y, finalmente, se visualizaron las bandas de las proteínas de interés usando un kit de quimioluminiscencia ECL (Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Para visualizar la morfología de las EV secretadas por las células B16-F1 se usó la microscopía electrónica de transmisión (TEM), con apoyo de la Unidad de Imagenología del IFC. En esta técnica se utilizó una rejilla de Cu recubierta con carbón, en donde se colocaron 40 µL de la solución con las EV obtenidas del MC de las células B16-F1 cultivadas y se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2% (medio de contraste). Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1200, con una aceleración de voltaje de 80 keV. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo usando una prueba t de *Student*, considerando un valor de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de la citocina TGF- β secretada por las células de melanoma B16-F1 se realizó con ensayos del gen reportero 3TP-Lux. Para este objetivo se generó una línea celular reportera (AD293-3TP-Lux) a partir de la línea celular AD293, la cual se transfectó de manera estable con el plásmido reportero p3TP-Lux (Figura 1A). El plásmido reportero 3TP-Lux contiene el gen (Lux) que codifica para la luciferasa, bajo el control de una región promotora conformada por tres elementos de respuesta al TPA (TREs) y un fragmento del promotor del gen PAI-1 (por sus siglas en inglés *Plasminogen-Activator Inhibitor 1*) (Wrana et al., 1992). La región promotora del gen reportero contiene, además, sitios de unión a las proteínas Smad. El estímulo del TGF- β promueve la formación de un complejo de Smads que se unen y activan al promotor y consecuentemente inducen la expresión de la luciferasa (Wrana et al., 1992; Yingling et al., 1997; Kim et al., 2008) (Figura 1A). De este modo, la actividad reportera del 3TP-Lux se ha utilizado como un ensayo molecular estándar para medir la señalización del TGF- β en células de mamíferos (Li et al., 2005; Guo et al., 2010).

En este trabajo se utilizó la línea celular reportera AD293-3TP-Lux para el desarrollo de una curva patrón de referencia con el fin de estimar de forma semi-cuantitativa la concentración del TGF- β presente en un medio condicionado. La Figura 1B muestra un ensayo dosis-respuesta de la actividad del gen reportero 3TP-Lux en respuesta a varias concentraciones de rTGF- β (6.25, 12.5, 25 y 50 pM), en las células AD293-3TP-Lux. Se observa que, a mayor concentración del rTGF- β , la actividad de la luciferasa aumentó (Figura 1B). Para determinar de forma semi-cuantitativa la concentración de TGF- β presente en los medios condicionados de las células de melanoma B16-F1, primero se ajustó la gráfica a una línea recta, para posteriormente interpolar los resultados obtenidos de los medios condicionados.

El TGF- β puede ser secretado por las células en su estado latente o en su estado activo. Por lo que se investigó el estado de activación de la citocina TGF- β secretada por las células de melanoma B16-F1 (B16). Se decidió utilizar

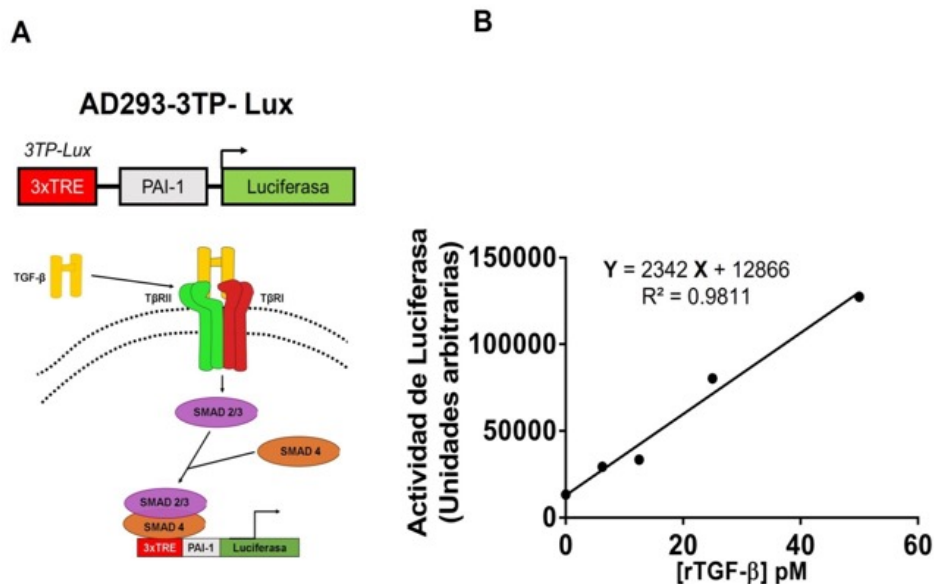


Figura 1. El TGF-β estimula la expresión del gen reportero 3TP en las células AD293. **A)** El plásmido reportero 3TP-Lux contiene tres elementos de respuesta al TGF-β/Smad2/3/4 que regulan la expresión del gen de luciferasa. **B)** Gráfica del ensayo dosis-respuesta en las células AD293-3TP-Lux estimuladas con el ligando recombinante rTGF-β. La gráfica fue ajustada a una línea recta.

esta línea porque es menos invasiva al compararla con otras líneas celulares derivadas de ratón, como las B16-F10 y las B16-BL6 (Nakamura, 2002). En este ensayo se incubó por 24 h a las células AD293-3TP-Lux con los siguientes estímulos: medio de ayuno (control), MC sin activar obtenido de las células de melanoma (MC/B16) o MC activado térmicamente durante 5 min a 80 °C (MC/B16(A)) (Figura 2A). Los datos muestran que tanto el MC sin activar como el activado con calor presentan la capacidad de inducir la expresión del reportero 3TP-Lux y, por lo tanto, la actividad de la luciferasa, siendo mayor el efecto del MC activado por calor (Figura 2A). Los datos que se muestran en la Figura 2B se obtuvieron a partir de los datos obtenidos de 3 experimentos independientes, al ser interpolados en la gráfica de la Figura 1B. Por medio de la ecuación de la recta se calculó la concentración aproximada del TGF-β ([TGF-β] pM) presente en los medios condicionados (MC/B16 y MC/B16(A)).

Comparando la concentración estimada de TGF-β en los MC, se observó que en la condición MC/B16(A) hay una concentración mayor de 49 ± 3.3 pM, en comparación con el MC/B16, en donde se encontró una concentración de 33 ± 3.3 pM, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones (Figura 2B). Es posible que esta diferencia se deba a que cuando el MC es sometido a un proceso térmico, la proteína LAP del complejo latente LAP-TGF-β se desnaturaliza y se separa del ligando maduro, por lo cual el TGF-β se libera en su forma activa. Cuando el TGF-β se encuentra unido a la proteína LAP, está en un estado latente y no es reconocido por sus receptores TβRII y TβRI; por consiguiente, la

vía de señalización no se activa y no hay inducción del plásmido reportero 3TP-Lux. No obstante, cuando el TGF-β es activado, éste es liberado de la proteína LAP y reconocido por los receptores del TGF-β de la línea celular reportera (AD293-3TP-Lux). Los datos obtenidos también sugieren que el TGF-β presente en los MC de las células de melanoma B16, pudo ser secretado en su forma activa, ya que se detectó actividad de TGF-β en el MC sin activación por calor; sin embargo, también podría ser posible que la célula receptora AD293-3TP-Lux tuviera la capacidad de activar al TGF-β latente que está presente en los medios condicionados, por lo cual sería conveniente diseñar experimentos para resolver estas cuestiones. Cabe mencionar que se ha cuantificado al TGF-β en su forma activa en la línea celular parental B16-F0 mediante citometría de flujo (*Calibur Cytimeter* (BD)) y se encontró una concentración de 200 pg/mL (8 pM) (Penafuerte & Galipeau, 2008). Por otra parte, Oh, E. y colaboradores encontraron que en la línea B16-F10, considerada altamente metastásica e invasiva, la concentración del TGF-β en el medio condicionado es de 800 pg/mL (32 pM) usando un kit de ELISA de R&D Systems (Oh, et al., 2019), cabe señalar que una cantidad equivalente de TGF-β activo fue detectada en las células B16-F1 mediante nuestro ensayo indirecto con un gen reportero.

Para confirmar que el TGF-β presente en los MC causa la activación del gen reportero y que está no ocurre por otro tipo de moléculas presentes en ese medio; se llevó a cabo un ensayo en la presencia del inhibidor SB431542 (SB), el cual inhibe la actividad del receptor tipo I (TβRI

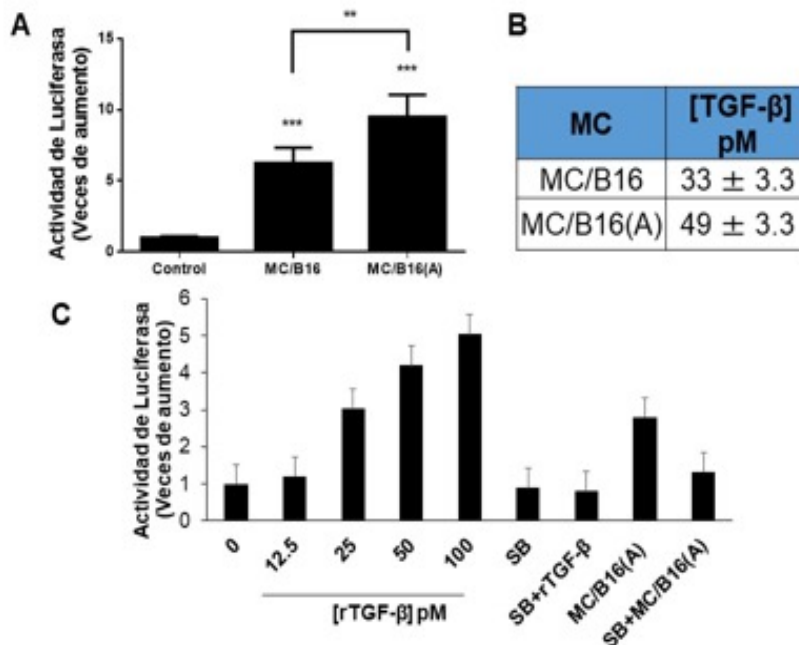


Figura 2. Medición semi-cuantitativa de la concentración y la actividad de la citocina TGF-β secretada por células de melanoma B16-F1. **A)** Medios condicionados (MC) de células de melanoma B16-F1: sin activar (MC/B16) y activado por calor (MC/B16(A)). Como control se usó medio de ayuno; las diferencias estadísticamente significativas con el control se muestran: (***) $p < 0.0001$ y (**) $p < 0.0025$. **B)** Determinación semi-cuantitativa de la concentración del TGF-β (pM) presente en los MC, por interpolación en la gráfica de la Figura 1B. **C)** Curva dosis-respuesta de la inducción del reportero 3TP-Lux por rTGF-β1 y la inducción en presencia del inhibidor SB431542 (SB) solo o con 50 pM de rTGF-β1 (SB+rTGF-β) o con MC-B16(A).

/ ALK5) al unirse a su dominio de cinasa y bloquear su actividad catalítica, impidiendo la transducción de las señales del TGF-β. Los resultados obtenidos muestran que en las células AD293-3TP-Lux, pre-tratadas por 30 min con 10 μM del inhibidor SB y luego estimuladas con 50 pM de rTGF-β1, el efecto del TGF-β fue bloqueado en su totalidad (Figura 2C). Además, el pre-tratamiento de las células reporteras AD293-3TP-Lux con el inhibidor SB bloqueó en aproximadamente un 70% el efecto del MC/B16(A), poniendo en evidencia que la actividad del gen reportero fue inducida principalmente por el TGF-β presente en el MC de las células de melanoma B16-F1 y que la actividad residual podría deberse a los efectos de otros mediadores no identificados, presentes en el MC (Figura 2C).

Existe evidencia de la secreción de la citocina TGF-β en EV por las células de melanoma (Pérez-Calixto et al., 2022). Por lo que una vez observada la presencia de la citocina TGF-β en el medio condicionado de las células de melanoma B16-F1, se procedió a adecuar un protocolo para aislar a los exosomas de estos medios condicionados, con el fin de investigar posteriormente si las células de melanoma pueden secretar al TGF-β como parte de la carga molecular de sus EV. El método de aislamiento de las EV se basó en la ultracentrifugación diferencial, la cual es la técnica estándar más recomendada para el aislamiento de EV. Algunas de las ventajas de esta técnica es que no se requieren reactivos químicos para

el aislamiento de los exosomas, además de ser altamente reproducible, y de que los exosomas obtenidos presentan alta pureza y funcionalidad para su uso en otros ensayos. El protocolo se describe en la Figura 3, el cual se adaptó y se estandarizó para aislar a los exosomas del MC de las células de melanoma B16-F1 cultivadas, basándose en un protocolo reportado previamente (Théry, C. et al, 2006).

En la técnica descrita en la Figura 3, el MC se somete a varios pasos de centrifugación a 4°C. Las primeras dos centrifugaciones realizadas a 300 x g y 2000 x g durante 10 y 30 min, respectivamente, son necesarias para eliminar a las células presentes en el MC; posteriormente, se eliminan los restos celulares (*debris*) con una centrifugación a 10,000 x g durante 30 min. Por último, las EV del sobrenadante se colectan con una velocidad de ultracentrifugación de 100,000 x g por 70 min. Las EV aisladas se caracterizaron después mediante técnicas físicas y bioquímicas, como la TEM y el inmunoblot.

Las EV transportan diversas moléculas, como el TGF-β, con el fin de comunicarse con otras células normales o cancerosas, presentes en el microambiente tumoral, provocando que las células receptoras experimenten cambios fenotípicos que promuevan la progresión del cáncer. Las EV son partículas secretadas por las células hacia el espacio extracelular; los principales subtipos de EV son dos: las microvesículas (MV) y los

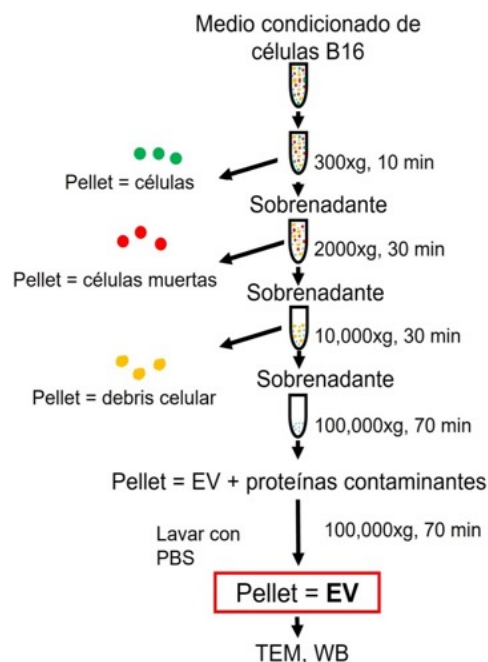


Figura 3. Descripción del método de ultracentrifugación diferencial para aislar EV. El protocolo fue adaptado para el aislamiento de las EV del medio condicionado de las células de melanoma B16-F1 cultivadas.

exosomas, los cuales se pueden diferenciar de acuerdo con su biogénesis, tamaño, contenido y función (El Andaloussi et al., 2013; Xavier et al., 2020). Por lo tanto, una vez que se aislaron a las EV de los MC de las células de melanoma B16-F1, se analizó su morfología por medio de TEM. La Figura 4A muestra que las EV aisladas presentan una morfología redondeada con los bordes bien definidos, con un diámetro de alrededor de 77 nm que corresponde con las características de los exosomas (50-150 nm) (Van Niel et al., 2017). Existe un conjunto de proteínas, que como ya se mencionó, son consideradas como marcadores típicos de las EV, las cuales se espera que se encuentren presentes en los exosomas, independientemente del tipo de célula que los origine. Para confirmar que las EV aisladas corresponden a exosomas, se realizaron inmunoblots para la detección de diversos marcadores. Como se muestra en la Figura 4B, los marcadores ALIX, CD63 y TSG101 se encontraron

presentes en los extractos de proteínas totales de las EV, mientras que en los lisados de las células de melanoma (B16) solo se detectaron bajos niveles de ALIX y de TSG101, pero no de CD63. Debido a que el FBS contiene exosomas, como un control se analizaron también a las EV aisladas de medios condicionados de células de melanoma cultivadas en presencia de FBS (Figura 4B, carril +) y, en este caso, se observó una mayor expresión de los marcadores ALIX, CD63 y TSG101, sugiriendo la presencia de exosomas en el FBS.

Los resultados mostrados en la Figura 4 permiten concluir que las células de melanoma B16-F1 son capaces de secretar EV del tipo exosomas. Estos resultados también indican que la técnica de ultracentrifugación diferencial es adecuada para el aislamiento de los exosomas a partir de MC. Sin embargo, en este trabajo queda pendiente investigar si las EV provenientes del MC de las células

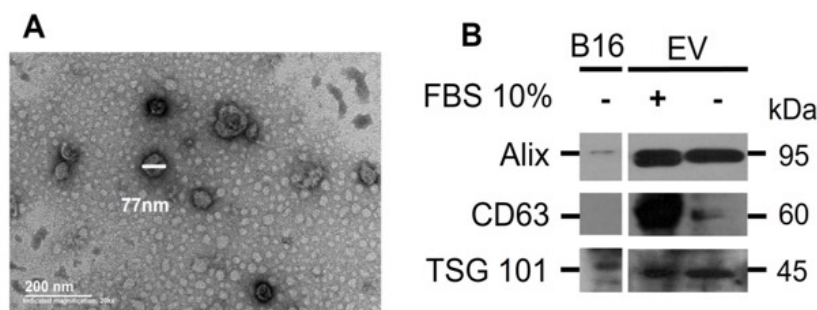


Figura 4. Caracterización de las EV provenientes de células de melanoma B16-F1. A) Imagen obtenida por TEM de las EV de células de melanoma de ratón B16-F1. B) Marcadores de exosomas: Alix, CD63 y TSG101 presentes en las células B16 o en las EV de células de melanoma cultivadas en ausencia (-) o presencia (+) de 10% de FBS.

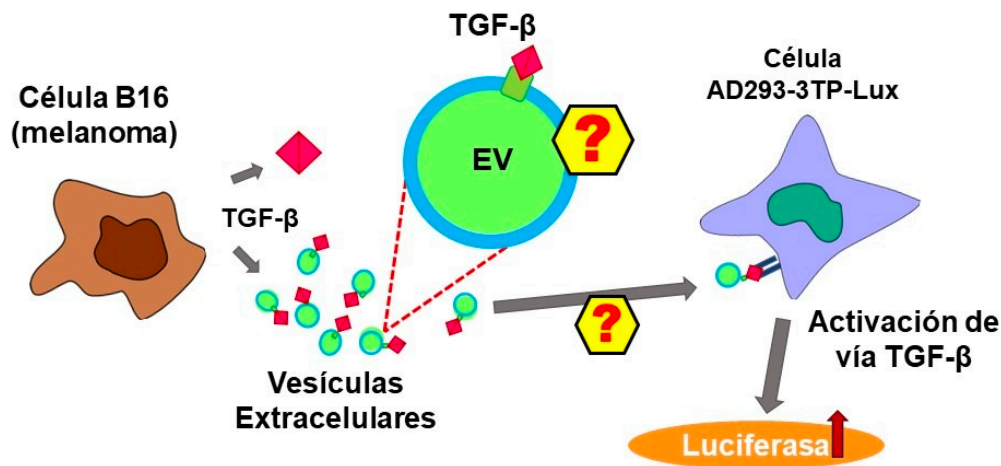


Figura 5. Modelo hipotético sobre la comunicación intercelular mediada por la citocina TGF- β secretada en EV por células de melanoma.

de melanoma están cargadas con la citocina TGF- β , para lo cual se planea posteriormente analizar la presencia de la citocina en las EV, por ensayos de inmunoblot o de citometría de flujo.

El TGF- β es conocido por sus funciones supresoras de tumores, al ser un potente inhibidor de la proliferación y un promotor de la apoptosis en las células normales, con el fin de mantener la homeostasis; sin embargo, en el cáncer, esta citocina ejerce una función dual al mantener sus funciones supresoras de tumores en las etapas iniciales de la carcinogénesis, mientras que en las etapas avanzadas del cáncer cambia sus acciones y se comporta como un potente promotor de las distintas etapas del desarrollo y la progresión tumoral. De acuerdo con varios estudios, se ha reportado que las EV provenientes de melanoma pueden transportar al TGF- β , adquiriendo así una participación relevante en procesos del desarrollo y la progresión del melanoma (Pérez-Calixto et al., 2022).

En la Figura 5 se ilustra un modelo propuesto para investigar los posibles mecanismos de secreción del TGF- β por las células de melanoma, para establecer una comunicación intercelular en el microambiente tumoral. En este modelo hipotético se propone que las células de melanoma podrían secretar a la citocina TGF- β al medio extracelular en sus dos formas: latente y activo. Además, la citocina secretada podría encontrarse asociada a EV o estar en forma soluble en el medio extracelular. Por lo tanto, la caracterización de las EV secretadas es relevante para detectar la presencia del TGF- β en su carga molecular e investigar su biogénesis, lo cual sería de gran utilidad en las investigaciones sobre el cáncer.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo describe algunas técnicas sencillas y de bajo costo, que pueden ser implementadas en los estudios enfocados en la secreción de la citocina TGF- β proveniente de células en cultivo, ya sean cancerosas o normales. La técnica para detectar al TGF- β usando al reportero 3TP-Lux tiene la ventaja de medir los niveles de ligando activo, capaz de activar a sus receptores y a la vía de las Smads; sin embargo, tiene la desventaja de no medir el nivel de ligando total, el cual en general es cuantificado con técnicas de ELISA. Las técnicas reportadas también pueden adaptarse, con algunas variaciones, al estudio de la secreción de otros mensajeros químicos, tanto en su forma soluble o empaquetados en EV. Además, las células reporteras AD293-3TP-Lux se proponen como una herramienta útil para detectar la presencia del TGF- β en los medios condicionados provenientes de cualquier cultivo celular y además pueden servir para determinar de manera semi-cuantitativa la concentración de esta citocina presente en los MC.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico de miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM. Nuestro trabajo ha estado apoyado con recursos del proyecto IV200220 del PAPIIT/DGAPA/UNAM (MMS) y de los proyectos de Conacyt: CF-2019-51488 (CGE) y ANR-Conacyt 188565 (CGE y MMS). Isabel A. Anaya Rubio recibió una beca del Conacyt para sus estudios de Maestría en el Programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM. La Dra. Mitzi P. Pérez Calixto es becaria posdoctoral de la DGAPA, UNAM.

REFERENCIAS

- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 85.
- Clayton, A. (2012). Cancer cells use exosomes as tools to manipulate immunity and the microenvironment. *Oncoimmunology*, 1(1), 78–80.
- Duitman, E. H., Orinska, Z. & Bulfone-Paus, S. (2011). Mechanisms of cytokine secretion: a portfolio of distinct pathways allows flexibility in cytokine activity. *European Journal of Cell Biology*, 90(6-7), 476–483.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(5), 347–357.
- El Ghissassi, F., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglian, V. & WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2009). A review of human carcinogens--part D: radiation. *The Lancet Oncology*, 10(8), 751–752.
- Gu, J., Qian, H., Shen, L., Zhang, X., Zhu, W., Huang, L., Yan, Y., Mao, F., Zhao, C., Shi, Y. & Xu, W. (2012). Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- β /Smad pathway. *PloS One*, 7(12), e52465.
- Guo, N., Li, X., Mann, M. M., Funderburgh, M. L., Du, Y. & Funderburgh, J. L. (2010). Hyaluronan synthesis mediates the fibrotic response of keratinocytes to transforming growth factor beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32012–32019.
- Johnson, D. B. & Puzanov, I. (2015). Treatment of NRAS-mutant melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 16(4), 15.
- Kim, S., Lee, Y., Seo, J. E., Cho, K. H. & Chung, J. H. (2008). Caveolin-1 increases basal and TGF- β 1-induced expression of type I procollagen through PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway in human dermal fibroblasts. *Cellular Signalling*, 20(7), 1313–1319.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C. & Keski-Oja, J. (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF- β In *Microscopy Research and Technique*, 52(4), 354–362. about:blank
- Kowal, J., Tkach, M. & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116–125.
- Krasagakis, K., Krüger-Krasagakes, S., Fimmel, S., Eberle, J., Thölke, D., von der Ohe, M., Mansmann, U. & Orfanos, C. E. (1999). Desensitization of melanoma cells to autocrine TGF- β isoforms. *Journal of Cellular Physiology*, 178(2), 179–187.
- Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*, 381428.
- Li, F., Cao, Y., Townsend, C. M., Jr. & Ko, T. C. (2005). TGF- β signaling in colon cancer cells. *World Journal of Surgery*, 29(3), 306–311.
- Lino-Silva, L. S., Domínguez-Rodríguez, J. A., Aguilar-Romero, J. M., Martínez-Said, H., Salcedo-Hernández, R. A., García-Pérez, L., Herrera-Gómez, Á. & Cuellar-Hubbe, M. (2016). Melanoma in Mexico: Clinicopathologic Features in a Population with Predominance of Acral Lentiginous Subtype. *Annals of Surgical Oncology*, 23(13), 4189–4194.
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630.
- Massagué, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. (2000). TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, 103(2), 295–309.
- Massagué, J. & Gomis, R. R. (2006). The logic of TGF β signaling. In *FEBS Letters*, 580(12), 2811–2820.
- Meurer, S., Wimmer, A. E., Leur, E. van de & Weiskirchen, R. (2019). Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation. *Cells*, 8(9), 997.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791–798.

- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891.
- Penafuerte, C. & Galipeau, J. (2008). TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 57(8), 1197–1206.
- Pérez-Calixto M, Anaya-Rubio I, Mota C. & Macias-Silva M. (2022). Secreción de la citocina TGF- β por células de melanoma. *Revista de Educación Bioquímica*, 41(1):18-27.
- Perrot, C. Y., Javelaud, D. & Mauviel, A. (2013). Insights into the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma. *Annals of Dermatology*, 25(2), 135–144.
- Polsky, D. & Cordon-Cardo, C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene*, 22(20), 3087–3091.
- Rodeck, U., Bossler, A., Graeven, U., Fox, F. E., Nowell, P. C., Knabbe, C. & Kari, C. (1994). Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Research*, 54(2), 575–581.
- Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A. & Hauschild, A. (2015). Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15003.
- Shelke, G. V., Yin, Y., Jang, S. C., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H. J., Li, L., Ghossein, Y. S., Nilsson, J. A. & Lötvall, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1) 1650458.
- Somasundaram, R. & Herlyn, M. (2012). Melanoma exosomes: messengers of metastasis. *Nature Medicine*, 18(6), 853–854.
- Steinbichler, T. B., Dudás, J., Riechelmann, H. & Skvortsova, I.I. (2017). The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 44, 170–181.
- Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Welsh, A., Whiteside, T. L. & Boyiadzis, M. (2011). Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-1. *Haematologica*, 96(9), 1302–1309.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology; Chapter 3*, Unit 3.22.
- Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3).
- van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F. & Massague, J. (1992). TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, 71(6), 1003–1014.
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z. & Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Research*, 70(23), 9621–9630.
- Wong, D. J. L. & Ribas, A. (2016). Targeted Therapy for Melanoma. *Cancer Treatment and Research*, 167, 251–262.
- Xavier, C. P. R., Caires, H. R., Barbosa, M. A. G., Bergantim, R., Guimarães, J. E. & Vasconcelos, M. H. (2020). The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance. *Cells*, 9(5).
- Yamada, N., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Shinohara, H., Taniguchi, K. & Akao, Y. (2016). Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- β 1-mediated suppression. *Oncotarget*, 7(19), 27033–27043.
- Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T. & Wang, X. F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12), 7019–7028.

Datos sociodemográficos y epidemiológicos de la COVID-19 en mexicanos.

Sociodemographic and epidemiological data of COVID-19 in mexicans.

¹Maravilla Domínguez María Aurora, ²Quintero Fabián María Saray, ³Arreola Rodrigo, ⁴Irecta Nájera Cesar Antonio, ⁵Pérez Chávez Verónica, ^{1,6}Zavala Romero Silvia Magdalena, ^{1*}Zavaleta Muñiz Soraya Amali

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango. Calzada Palmas 1, Revolución, 35050 Gómez Palacio, Durango, México.

² Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Lomas de Sotelo, Militar, Miguel Hidalgo, 11200 Ciudad de México, México.

³ Departamento de Genética Psiquiátrica, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente", Subdirección de Investigación Clínica, Calzada México-Xochimilco 101, Colonia San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 Ciudad de México, México.

⁴ El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa Tabasco, Departamento de Salud, Carretera a Reforma Km. 15.5 Ra, Guineo 2da. Sección, 86280 Villa Hermosa, Tabasco, México.

⁵ Departamento de Psicología, Universidad Iberoamericana Torreón. Calzada Iberoamericana 2255, Universidad Iberoamericana, 27420 Torreón, Coahuila, México.

⁶ Departamento de Inglés. Instituto de Educación Superior Didaxis, Av. Ocampo Ote. 225-pte, Primero de Cobián Centro, 27000 Torreón, Coahuila, México.

*Email: zams2109@yahoo.com.mx

RESUMEN

Introducción. La pandemia ha afectado el estilo de vida y la salud de millones de personas en el mundo. La información acerca de la enfermedad por coronavirus-19 (COVID-19), las manifestaciones clínicas y las medidas de prevención han sido establecidas por la Organización Mundial de la Salud y el Gobierno de cada país. Se sabe que el comportamiento de la enfermedad es altamente variable, entre individuos, países e incluso entre regiones de un mismo país. **Objetivo:** Describir las características epidemiológicas de la COVID-19, el conocimiento general sobre la enfermedad y los efectos de la pandemia en la salud y en el estilo de vida de los mexicanos. **Materiales y métodos:** Se incluyeron mexicanos de los diferentes estados de la República, mayores de 17 años, que aceptaron participar respondiendo a un cuestionario electrónico con variables sociodemográficas, preguntas sobre COVID-19 y de percepción de la afección del estilo de vida, enviado a través de Formularios de Google y utilizando como medios de difusión a las diferentes redes sociales. **Resultados:** Se recibieron 974 respuestas. El 95% de los sujetos declaró conocer la COVID-19, sus síntomas y medidas de prevención. El estilo de vida, las relaciones familiares, la vida social y laboral sufrieron afección en promedio en 90%, 77%, 87%, 75,7% respectivamente. 259

sujetos reportaron haber tenido síntomas relacionados con COVID-19. El 71,8% de este grupo había confirmado el diagnóstico mediante pruebas clínicas o de laboratorio. Los síntomas más frecuentes fueron cefalea, fatiga, fiebre y anosmia/disosmia. **Conclusión:** Los efectos de la pandemia a nivel individual y poblacional son diversos y variados, lo que dificulta el diagnóstico y control de la enfermedad. Es fundamental estudiar y atender los daños a la salud física, psicológica y también a nivel laboral y socio-económico.

Palabras clave: COVID-19, mexicanos, signos y síntomas, estilo de vida, relaciones familiares.

ABSTRACT.

The pandemic has been affected the lifestyle and health of millions of people in the world. The information about the disease due to coronavirus-19 (COVID-19), the clinical manifestations and the preventive measures has been established by the World Health Organization and by the Government of every country. Is know that the behavior of the disease is highly variable, between individual, countries, even between regions of the same country. **Objective.** To determine the epidemiological characteristics of COVID-19, the knowledge of the

preventive measures and the effects of the pandemic in health and lifestyle in Mexicans. **Materials and methods.** Subjects residing in Mexican territory older than 17 years old, which accepted participate responding an electronic survey about sociodemographic variables, COVID-19 and the impact on their lifestyle, sent through Google Forms and using the different social networks as means of dissemination were included. **Results.** We received 974 surveys, 95% of the subjects knows what is COVID-19, their symptoms and the preventive measures, the median percentage of the affectation perceived of their lifestyle was 90%, the social life in 87%, working life in 75.7% and family relations in 77%. The 259 of the responders had symptoms related with COVID-19 and the 71.8% of this group had confirmed diagnosis by clinical and/or laboratory test. The symptoms more frequent were headache, fatigue, fever and anosmia/dysosmia. **Conclusion.** The effects of the pandemic at the individual and population levels are many and varied. This, difficult makes the diagnosis and control of the disease. It is necessary to continue studying the effects of the COVID-19 pandemic on physical health, and to study the effects at other levels such as the mental health the sick individual and the general population.

Keywords. COVID-19, Mexicans, signs and symptoms, social life, working life, family relations.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus-19 (COVID-19), es una enfermedad infecciosa que se manifiesta por un síndrome respiratorio agudo severo asociado al coronavirus 2 (SARS-CoV-2), y el 11 de marzo de 2020 la pandemia por esta enfermedad fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Wiersinga WJ., 2019; WHO, 2020).

Al igual que el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), la COVID-19 se asocia a un coronavirus y los síntomas que pueden presentarse de mayor a menor probabilidad son: fiebre, mialgias, tos seca y diarrea (Ko JH., 2016). Hasta la fecha, la mayoría de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 han desarrollado síntomas leves como tos seca, odinofagia y fiebre. La mayoría de los casos se han resuelto espontáneamente, sin embargo, algunos desarrollan complicaciones fatales que incluyen insuficiencia orgánica, choque séptico, edema pulmonar, neumonía grave y síndrome de dificultad respiratoria aguda (Chen N., 2020).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades recomendó al comienzo de la pandemia evitar viajar a áreas de alto riesgo, el contacto con personas sintomáticas y el consumo de carne de regiones con un brote conocido de COVID-19, así como la toma de medidas básicas de higiene de manos y el uso de equipo de protección personal, como mascarillas faciales. Además, aconsejó a la sociedad conseguir atención médica ante la exposición al COVID-19 o ante la presencia de fiebre y tos (NCIRD, CDC, 2021). Sin embargo, estas medidas se han reconsiderado gradualmente. El CDC establece normas fundamentales para reducir la propagación de la infección como: la adquisición de la vacuna COVID-19, el uso de una máscara para protegerse y proteger a los demás, el distanciamiento físico entre personas que no viven en el mismo lugar, así como el evitar aglomeraciones y espacios mal ventilados (NCIRD, CDC, 2021). Un aspecto emergente a considerar en esta pandemia es el impacto psicológico y emocional que generan los cambios de hábitos y la distribución descontrolada de información poco confiable en las plataformas de redes sociales (Kim HK., 2020; Barua Z., 2020). La incertidumbre y la baja previsibilidad de la COVID-19 no solo han amenazado la salud física de las personas sino también han afectado su salud mental, especialmente en términos de emociones y cognición como indican muchas teorías, entre ellas la teoría del estrés y la teoría del riesgo percibido. Reacciones como el miedo y la vulnerabilidad influyen en el comportamiento y contribuyen a la aprensión de buscar atención médica (Slovic P., 1987; Li S., 2020; Norris FH., 2002).

Actualmente, el mundo atraviesa una situación de salud pública sin precedentes, y es de vital importancia tomar medidas preventivas contra la COVID-19 para controlar su propagación, salvaguardar a los ciudadanos y garantizar su bienestar (Al-Hanawi, MK., 2020). Para el 5 de abril de 2021 se contaban 131 millones de casos en todo el mundo y más de 2,85 millones de muertes. Para el 11 de julio de 2021 en México, los casos notificados eran 2.586.721, con 234.907 muertes (Johns Hopkins University, 2021).

México se cuenta dentro de los primeros 15 países con más casos afectados por COVID-19, y entre los primeros cuatro lugares de mortalidad (9%) en el mundo, y con un avance de más de 50 millones de dosis de vacuna administradas (Johns Hopkins University & Medicine, 2021).

Este dato es alarmante y muestra una alta propagación

del virus en la población que puede estar relacionado con el desconocimiento de la enfermedad y sus rutas de transmisión. La evidencia muestra que el conocimiento público es esencial para hacer frente a las pandemias (Chirwa GC., 2019; Chirwa GC., 2021) y puede influir en la adherencia a las medidas preventivas contra la COVID-19, incluido el asesoramiento a las personas. Sin embargo, existe poca información sobre las características epidemiológicas de la COVID-19 en nuestro país, sobre el conocimiento de los individuos acerca de las medidas de prevención y los efectos que la pandemia ha provocado en el aspecto económico y psicosocial. Por lo que, el objetivo de este estudio es describir las características epidemiológicas de la COVID-19, el conocimiento general sobre la enfermedad y los efectos de la pandemia en la salud y en el estilo de vida de los mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio transversal descriptivo. Se incluyeron mexicanos residentes de los diferentes estados de la República, que aceptaron participar a través de un cuestionario electrónico de formularios de Google que se distribuyó a través de las diferentes redes sociales durante un período de octubre 2020 a enero de 2021. Con un muestreo por conveniencia. Criterios de inclusión: tener al menos 17 años y aceptar participar en el estudio. El cuestionario incluyó 33 ítems relacionados con variables sociodemográficas como edad, sexo, ocupación, entre otras. Se indagó sobre el conocimiento sobre la COVID-19, su definición, medidas de prevención, transmisión, diseminación y características epidemiológicas como la prevalencia de síntomas relacionados con la enfermedad, percepción de su gravedad, así como el número de casos positivos a COVID-19 en familiares o amistades. El aspecto psicosocial se evaluó mediante preguntas sobre el porcentaje de afectación del estilo de vida y sus 3 esferas (vida social, relaciones familiares y vida laboral) utilizando una escala análoga del 0 al 100%. Los datos sociodemográficos fueron analizados por zonas del país según el Diario Oficial de la Federación del Gobierno Federal (DOF. 2021) distribuidos de la siguiente manera: *Noroeste*: estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora. *Noreste*: estados de Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Tamaulipas. *Oeste*: estados de Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Querétaro y Zacatecas. *Centro*: Ciudad de México, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Puebla y Tlaxcala. *Sureste*: estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán.

El estilo de vida se definió como el modo y la forma de vida de un individuo o grupo (APA, 1972). Las relaciones familiares se determinaron como el comportamiento, las relaciones psicológicas y sociales entre miembros de la familia nuclear y extendida (Medical Subject Headings, 2021). La vida social se definió por lo opuesto a la vida privada, e incluye las actividades del ámbito público o comunitario y la relación con amigos, miembros de su comunidad y desconocidos (Psychology Today Staff, 2021). Por último, la vida laboral u ocupacional incluyó el contenido del trabajo, las relaciones laborales, las condiciones de empleo y el entorno de trabajo (F Van de Looij, 1995).

Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas y cualitativas se utilizaron medias, desviaciones estándar (DE), medianas, cuartiles, frecuencias y porcentajes. Para la comparación de variables cualitativas entre los grupos se utilizaron la prueba de Chi-cuadrada o la prueba exacta de Fisher y para las variables numéricas la prueba *t* de Student. Los datos se analizaron usando el programa SPSS versión 23.0

Ética

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Juárez del Estado de Durango con el número de registro PI-2020-10-15. La investigación se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Y se encuentra dentro de la Categoría I de la Ley General de Salud en Materia de Investigación. En el cuestionario online se incluyó una leyenda donde se expuso el objetivo del estudio, se informó sobre la confidencialidad de los datos y que la información se utilizaría sólo con fines de investigación. Además, se detalló claramente que al responder y enviar sus respuestas de manera libre y voluntaria sería considerado como el consentimiento para participar en el estudio.

RESULTADOS

Se recabaron 974 formatos de respuesta; 56 fueron excluidos por no cumplir el criterio de inclusión en edad (≥ 17 años), dejando un total de 918 participantes, de los cuales 624 (68%) fueron mujeres y 294 (32%) hombres, con una edad media y desviación estándar del grupo de $33,07 \pm 13,75$ años.

Conocimientos sobre la COVID-19.

Más del 95% de los individuos entrevistados conocían que es la COVID-19, sus síntomas y las principales medidas de prevención. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos acerca del conocimiento de la enfermedad del total de la población dividida por grupos de sujetos que presentaron síntomas de COVID-19 en algún momento y aquellos que no presentaron síntomas. La comparación del conocimiento entre ellos reveló que, aquellos que habían presentado síntomas relacionados con la enfermedad tenían mayor conocimiento sobre síntomas de menor frecuencia como los gastrointestinales y dermatológicos.

El 79,1% de los participantes declaró haber tenido al menos un familiar o amigo afectado por la enfermedad (AFA- COVID-19), con una mediana de 3 sujetos afectados (valores de 1 y 7 para los percentiles 25% y 75%, respectivamente). Se realizó la suma de todos los casos de AFA-COVID-19 reportados por los participantes, obteniendo un total de 4203 casos con COVID-19, de los cuales 2329 eran hombres y 1874 mujeres, con una relación hombre/mujer de 1,24. El 82% del total de estos casos se recuperaron y el 15,4% había fallecido.

El 28,2% (n=186) de todos los participantes informaron haber presentado síntomas relacionados con COVID-19; sólo el 71,8% de ellos tenía el diagnóstico confirmado de la enfermedad mediante pruebas clínicas o de laboratorio.

En el grupo de COVID-19-confirmado, el método de diagnóstico primario fue el clínico mediante la identificación de síntomas relacionados con la enfermedad (50%), seguido del diagnóstico combinado de pruebas clínicas y de laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en 32,3%, detección de anticuerpos IgG/IgM en 5,9% y prueba diagnóstica de detección rápida en 4,3%. Sólo dos personas fueron diagnosticadas mediante radiografía de tórax (1,1%) y 10 (5,4%) mediante dos o más pruebas; el 1,1% restante no respondió la pregunta.

Estilo de vida.

El 100% de los participantes percibieron que su estilo de vida se había visto afectado durante la pandemia con un promedio de afectación de 90,4% según la escala análoga visual. Su vida social fue la más afectada con un promedio de 87,1% de afectación, mientras que las actividades laborales y relaciones familiares mostraron un 75,7% y un 71,3% respectivamente, lo que supone un impacto importante en el desarrollo de sus actividades habituales en todos estos aspectos.

Las características generales de los sujetos y la comparación entre géneros se describen en la tabla 2.

Sujetos con y sin síntomas relacionados con COVID-19

El total (100%) de los respondedores presenta afectación de estilo de vida en sus tres esferas. Al comparar el porcentaje medio de afectación entre los grupos con y

Tabla 1. Conocimiento general acerca de la COVID-19 de los sujetos encuestados.

Conocimientos	Población total n= 918		P	Población con síntomas n= 259		P
	Con síntomas	Sin síntomas		Diagnóstico confirmado	Diagnóstico no confirmado	
	n= 259 n (%)	n= 659 n (%)		n= 186 n (%)	n= 73 n (%)	
¿Qué es la COVID-19?	259 (100)	658 (99.8)	0.718	186 (100)	73 (100)	---
Síntomas comunes como fiebre, fatiga, tos seca, cefalea, mialgias y disnea.	259 (100)	655 (99.4)	0.565	186 (100)	72 (98.6)	0.282
Manifestaciones menos frecuentes (gastrointestinales y dermatológicas).	211 (81.5)	447 (72.5)	0.003	183 (82.3)	58 (79.5)	0.360
Trasmisión del SARS-CoV-2 de persona a persona a una distancia cercana entre sí (1-2 metros).	253 (97.7)	649 (98.5)	0.281	183 (98.4)	70 (95.9)	0.221
El SARS-CoV-2 se puede adquirir al tocar una superficie u objeto en el que está adherido el virus e inmediatamente después de tocarse la boca, la nariz o los ojos.	255 (98.5)	651 (98.8)	0.452	182 (97.8)	73(100)	0.264
Los adultos mayores con enfermedades crónicas graves, como enfermedades cardíacas o pulmonares y diabetes, tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones más graves por COVID-19.	259 (100)	658 (99.8)	0.718	186 (100)	73 (100)	---
El potencial de transmisión de COVID-19 con la presencia de casos pre / asintomáticos.	245 (94.6)	633 (96.1)	0.211	178 (95.7)	67 (91.8)	0.170
El virus se puede transmitir incluso con mascarillas cuando no se mantiene la distancia interpersonal de 2 metros.	225 (86.4)	581 (88.2)	0.331	161 (86.6)	64 (87.7)	0.495
Las personas deben lavarse las manos con agua y jabón durante al menos 20 segundos o aplicar un desinfectante de manos que contenga al menos un 60% de alcohol. Además, las personas deben evitar ir a lugares concurridos y evitar tomar el transporte público.	258 (99.6)	651 (98.8)	0.228	185 (99.5)	73 (100)	0.718
Se utilizó chi cuadrada para el análisis.						

Tabla 2. Comparación de las características generales de los sujetos encuestados por sexo.

Características generales	n= 918	Mujeres n= 624	Hombres n= 294
	n (%)	n (%)	n (%)
Rangos de edad			
17-24 años	327 (36)	237 (38.0)	90 (30.6)
25-59 años	546 (59)	365 (58.5)	181 (68.1)
≥ 60 años	45 (5)	22 (3.5)	23 (7.8)
Regiones de México			
Noroeste	442 (48.1)	322 (51.6)	120 (40.8)
Noreste	24 (2.6)	17 (2.7)	7 (2.4)
Occidente	123 (13.4)	80 (12.8)	43 (14.7)
Centro	193 (21.0)	119 (19.1)	74 (25.3)
Sureste	136 (14.8)	86 (13.8)	50 (17.1)
TS / ECS	404 (44.0)	277 (44.4)	127 (43.3)
Contacto COVID-19	111 (12.1)	42 (14.3)	69 (11.9)
Prevalencia de síntomas relacionados con COVID-19	259 (28.2)	172 (27.6)	87 (29.7)
Casos confirmados de COVID-19	186 (20.3)	120 (19.2)	66 (22.5)
Visita reciente a hospital	276 (30.1)	188 (30.1)	88 (30.0)
Familiares/amistades con antecedente de COVID-19.	726 (79.1)	506 (81.1)	220 (75.1)

TS: trabajador de la salud; ECS: estudiantes de ciencias de la salud. Contacto COVID-19: incluye solo los últimos 14 días. Se utilizó chi cuadrada o Prueba Exacta de Fisher para el análisis.

Tabla 3. Principales características de los individuos con síntomas relacionados con COVID-19 y afección del estilo de vida.

	Síntomas asociados con COVID-19 n= 259	Diagnóstico COVID-19 no confirmado n= 73	Diagnóstico COVID-19 confirmado n= 186	p*
Mujeres	172 (66.4)	52 (71.2)	120 (64.5)	0.303
Hombres	87 (33.6)	21 (28.8)	66 (35.5)	
Edad, años	32.97 ± 12.40	33.36 ± 12.23	31.96 ± 12.89	0.414
División Geográfica de México				
Noroeste	5 (1.9)	1 (1.4)	4 (2.2)	0.361
Noreste	123 (47.5)	31 (42.5)	92 (49.5)	
Oeste	30 (11.6)	13 (17.8)	17 (9.1)	
Centro	58 (22.4)	15 (20.5)	43 (23.1)	
Sureste	43 (16.6)	13 (17.8)	30 (16.1)	0.621
Afección del estilo de vida	90.42 ± 14.92	89.89 ± 16.27	90.96 ± 13.65	
Afección de la vida laboral	79.10 ± 26.47	75.07 ± 30.28	80.65 ± 24.72	
Afección de la vida social	86.95 ± 22.10	86.85 ± 22.22	86.99 ± 22.11	
Afección de las relaciones familiares	75.41 ± 27.02	74.52 ± 25.44	75.75 ± 27.68	0.742
TS/ECS	120 (46.3)	25 (34.2)	95 (51.1)	
Exposición directa a COVID-19	49 (18.9)	4 (5.5)	45 (24.2)	<0.001

TS/ECS: Trabajador de la Salud/Estudiante de Ciencias de la salud. Exposición directa se refiere a trabajadores o estudiantes de ciencias de la salud que brindaban atención a pacientes con COVID-19 confirmado. *Para la comparación entre los grupos de sujetos con diagnóstico confirmado y no confirmado de COVID 19 se realizó a través de la prueba de *Chi-cuadrada* para las variables categóricas y *t de Student* para las variables numéricas.

sin síntomas, se encontró mayor afectación en el primero, en las relaciones familiares (75.41% ± 27.02% vs 69.80% ± 28.94%, p= 0.007) y en la vida laboral (79.07% ± 26.47% vs 74.37% ± 28.74%, p= 0.018). La vida social y el estilo de vida en general no mostraron diferencias entre grupos (86.95% ± 22.10% vs 87.15% ± 19.58%, p=0.895 y 90.19% ± 15.56% vs 90.52% ± 14.68%, p= 0.768 para el grupo con y sin síntomas respectivamente).

Después, el grupo de sintomáticos, se subdividió en: aquellos con diagnóstico confirmado (DC) por cualquier prueba y aquellos no confirmados (DNC) y luego se realizó una comparación de las características generales y del nivel de afectación en los diferentes aspectos del estilo de vida. Todos los individuos con síntomas percibieron que la pandemia había afectado su estilo de vida en un porcentaje promedio de 90,42% (89,9% vs 90.9% en el grupo de DNC y en el DC, respectivamente).

Debido a que los trabajadores de la salud y los estudiantes de ciencias de la salud (TS/ECS) son un grupo de alto riesgo (n=120), se realizó una comparación entre aquellos con exposición directa (n=49) y aquellos sin exposición directa (n=71) a pacientes con COVID-19 y encontramos mayor proporción de sujetos TS/ECS con DC (24,2%) comparados con el grupo con DNC (5.5%) con diferencias significativas. Ver tabla 3.

Prevalencia de síntomas de COVID-19

Los síntomas más comunes de los 259 individuos fueron cefalea en 74,1%, seguidos de fatiga 56,4%, tos 48,3%, mialgia (46,3%), gripe (46,3%) y fiebre (42,9%). La severidad de la enfermedad fue percibida como leve por el 54% de los respondedores. Posteriormente se comparó la prevalencia de síntomas por sexo y solo se presentaron diferencias significativas en la fiebre (56,3% vs 36%, en hombres y mujeres respectivamente, $p = 0,002$).

En individuos con percepción de enfermedad leve o moderada, los síntomas más frecuentes fueron en orden de frecuencia cefalea, fatiga y gripe; por otro lado, en individuos con enfermedad severa, los síntomas más frecuentes fueron fatiga, cefalea y fiebre sin mostrar diferencias estadísticas. Cuando se comparó la prevalencia de síntomas entre los grupos DNC y DC, los síntomas más frecuentes en el primer grupo fueron cefalea, gripe y tos, mientras que en el grupo con DC fueron cefalea, fatiga, fiebre y mialgia. La percepción de severidad de la enfermedad moderada y severa fue más frecuente en el grupo con DC. Ver tabla 4.

Características geográficas del grupo con síntomas relacionados con COVID-19.

Para describir la sintomatología de acuerdo al área geográfica de México, las diferentes zonas estudiadas se agruparon en 2 grandes regiones: la región Norte (zonas noreste y noroeste) y la región Sur (occidente, centro y sureste del país).

Al comparar el conocimiento general sobre COVID-19 entre las 2 regiones Norte y Sur, no se encontraron diferencias significativas entre las características de la enfermedad, transmisión y medidas de protección.

Solo se encontraron diferencias entre Norte y Sur en la proporción de casos AFA-COVID-19, y en la prevalencia de fiebre y anosmia/disosmia. Los síntomas más frecuentes en el grupo DC en la región Norte fueron cefalea (74,7%), fatiga (55,1%), anosmia (44,3%) y mialgia (44,3%), mientras que en el Sur fueron cefalea (73,3%), fatiga (58,4%) y fiebre (54,5%).

Se compararon los grupos DC y DNC en

Región Norte

Se compararon los grupos DC y DNC de cada una de las regiones estudiadas (Norte y Sur) Datos mostrados en la tabla 5. Y finalmente, se realizó la comparación del grupo DC del Norte vs el grupo DC del Sur, y se encontraron diferencias en la frecuencia de AFA-COVID-19, la prevalencia de síntomas como anosmia /

Tabla 4. Características clínicas de sujetos con síntomas relacionados con COVID 19 con y sin diagnóstico confirmado.

Prevalencia de Síntomas	Síntomas de COVID-19 n= 259	Diagnóstico COVID-19 no confirmado	Diagnóstico COVID-19 confirmado	p*
		n= 73	n= 186	
Cefalea	192 (74.1)	47 (64.4)	145 (78)	0.025
Fatiga	146 (56.4)	26 (35.6)	120 (64.5)	<0.001
Tos	125 (48.3)	35 (47.9)	90 (48.4)	0.949
Mialgia	120 (46.3)	24 (32.9)	96 (51.6)	0.007
Gripe	120 (46.3)	39 (53.4)	81 (43.5)	0.152
Fiebre	111 (42.9)	16 (21.9)	95 (51.1)	<0.001
Anosmia/disosmia	106 (40.9)	14 (19.2)	92 (49.5)	<0.001
Ageusia/disgeusia	94 (36.3)	9 (12.3)	85 (45.7)	<0.001
Dolor Torácico	76 (29.3)	16 (21.9)	60 (32.3)	0.100
Disnea	58 (22.4)	9 (12.3)	49 (26.3)	0.005
Severidad de la sintomatología				
Leve	140 (54.1)	47 (64.4)	93 (50.0)	0.008
Moderada	93 (35.9)	19 (26.0)	74 (39.8)	
Severa	23 (8.9)	4 (5.5)	19 (10.2)	

*Comparación entre sujetos sintomáticos con y sin diagnóstico confirmado de COVID 19. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar, frecuencias y porcentajes. En tres sujetos la severidad de los síntomas no se documentó. Sólo 10 sujetos con diagnóstico confirmado de COVID-19, reportaron neumonía.

Tabla 5. Características de los individuos con síntomas relacionados con COVID 19 en relación con su área geográfica.

	Región norte			Región sur			
	n=158			n= 101			
	Diagnóstico COVID-19 confirmado	Diagnóstico COVID-19 no confirmado	p ₁	Diagnóstico COVID-19 confirmado	Diagnóstico COVID-19 no confirmado	p ₂	p ₃
	n= 113	n=45		n= 73	n= 28		
AFA-COVID-19	110 (97.3)	30 (80.0)	<0.001	62 (84.9)	20 (71.2)	0.128	0.003
Visita reciente a HCC	52 (46.0)	16 (35.6)	0.231	26 (35.6)	10 (35.7)	0.993	0.160
TS/ECS	57 (50.4)	14 (31.1)	0.027	37 (50.7)	15 (53.6)	0.795	0.324
Exposición directa COVID-19	26 (23.0)	2 (4.4)	0.006	19 (26.0)	2 (7.1)	0.036	0.639
Fiebre	48 (42.5)	9 (20.0)	0.008	47 (64.4)	7 (25.0)	<0.001	0.004
Cefalea	89 (78.8)	29 (64.4)	0.062	56 (76.7)	18 (64.3)	0.207	0.742
Tos	52 (46)	22 (48.9)	0.744	38 (52.1)	13 (46.4)	0.613	0.421
Disnea	30 (26.5)	6 (13.3)	0.064	19 (26.0)	3 (11.1)	0.11	0.937
Fatiga	68 (60.2)	19 (42.2)	0.041	52 (71.2)	7 (25.0)	<0.001	0.124
Anosmia disosmia	63 (55.8)	7 (15.6)	<0.001	29 (39.7)	7 (25.0)	0.167	0.033
Ageusia disgeusia	57 (50.4)	4 (8.9)	<0.001	28 (38.4)	5 (17.9)	0.049	0.106
Mialgia	56 (49.6)	14 (31.1)	0.035	40 (54.8)	10 (35.7)	0.086	0.485
Dolor Torácico	32 (28.3)	9 (20.0)	0.282	28 (38.4)	7 (25.0)	0.207	0.153
Síntomas MS	57 (50.4)	17 (40.5)	0.27	37 (50.7)	22 (78.6)	0.011	0.881

HCC: Hospital o Centro de Salud; TS/ECS: trabajador de salud/estudiante de Ciencias de la Salud; HCFF-COVID-19: Historia de contacto positivo con familiares o amigos con COVID-19; síntomas MS: percepción moderada a severa de la sintomatología. p₁ y p₂ Comparación de la sintomatología entre casos confirmados y no confirmados del Norte y Sur de México respectivamente. p₃ Comparación de la sintomatología de los casos confirmados entre el Norte y Sur de México.

disosmia, estos más frecuentes en la región Norte, por otro lado, la fiebre se presentó con mayor prevalencia en el Sur. Ver tabla 5.

DISCUSIÓN

SARS-CoV-2 ha infectado a millones de personas y ha causado cientos de miles de muertes en el mundo (Al-Hanawi, 2020). La pandemia provocada por este virus ha generado un estado de emergencia sanitaria con impacto psicosocial significativo en la población.

Este estudio muestra un panorama general sobre el conocimiento de la población mexicana acerca de la COVID-19 y las medidas preventivas, se presentan características epidemiológicas como prevalencia de casos con síntomas, casos confirmados, prevalencia de cada síntoma relacionado con COVID-19, así como grupos de riesgo. Se describe también la afectación al estilo de vida de la población mexicana. En países en desarrollo como el nuestro, los efectos de una pandemia pueden ser catastróficos y es esencial evaluar la situación desde diferentes ópticas.

La mayor parte de los respondedores en este estudio fueron mujeres lo que concuerda con lo observado por Smith WG., 2008, quien reportó tasas de respuesta mayores de mujeres para cuestionarios en línea, por lo

que, es poco probable un sesgo de selección diferencial.

El 59.5% de la población incluida en este estudio fueron adultos de entre 25 y 55 años, y más del 95% demostró tener conocimientos acerca de la COVID-19, las medidas de prevención y diseminación; lo anterior podría deberse a la gran cantidad de información general provista por el gobierno y las instituciones de salud durante el periodo en el que el estudio fue conducido. En cuanto a conocimiento de la sintomatología, el grupo de sujetos que presentó síntomas relacionados con COVID-19, tenía mayor conocimiento sobre los síntomas de menor frecuencia de la enfermedad (gastrointestinales y dermatológicos) que aquellos que no había presentado síntomas. Lo anterior puede deberse a que aquellos sujetos con síntomas poseen mayor interés por aumentar su conocimiento acerca de la enfermedad o por recibir más información durante la consulta médica.

En México, el número de pruebas diagnósticas realizadas fue mínimo, sumado a la vulnerabilidad de algunas regiones del país y al alto costo de las pruebas. Estos datos cobran relevancia debido a que, en nuestro país, solo una pequeña proporción de los sujetos con síntomas relacionados con COVID-19 acuden a recibir atención médica (Santana CG., 2020; Ritchie H., 2021).

Del total de sujetos, 28% tuvieron síntomas relacionados con COVID-19 y sólo 71.8% de estos confirmó su diagnóstico a través del examen clínico o de estudios de laboratorio. Esta cifra es muy alta comparada con el reporte del gobierno de México (34.4% de los casos confirmados) en mayo de 2021 (Dirección General de Epidemiología, 2021). Esta diferencia pudiera estar relacionada con la alta proporción de trabajadores de la salud, con acceso a información y a pruebas diagnósticas que fueron incluidos en este estudio.

Diferencias por género

Los resultados de este estudio muestran que las mujeres tenían mayor prevalencia de casos de AFA-COVID-19 que los hombres; cuando se calculó el índice de hombre/mujer del grupo con historia de COVID-19, los resultados concuerdan con lo reportado por la revisión de Rozemberg S., (2020) para otros países (índice 1,24 vs 1-3, respectivamente).

La prevalencia de síntomas relacionados con COVID-19 fue similar entre hombres y mujeres, sin embargo, el número de DC fue mayor en mujeres (64.5%) que en hombres (35.5%), lo que contrasta con la información divulgada por el Instituto Nacional de Salud Pública de México en mayo 2020, con casos con DC de 49.97% en mujeres y 50.03% en hombres (INSP., 2020). Estas diferencias en porcentajes podrían explicarse por la diferencia en el tiempo entre el reporte del INSP y el tiempo en que se realizó la encuesta.

Prevalencia de síntomas

Un estudio realizado en 12 hospitales europeos, mostró que de una población de 263 mujeres (63,1%) y 154 hombres (36.9%) leve y moderadamente afectados por COVID-19 (sin necesidad de cuidados intensivos), las mujeres presentaron significativamente mayor afección a nivel de olfato que los hombres (Lechien JR., 2020), similar a los resultados obtenidos en este estudio.

En este estudio los síntomas en orden de frecuencia de los sujetos con DC de COVID-19, fueron cefalea, fatiga, fiebre, mialgia, anosmia/disosmia y tos, resultados diferentes a los publicados por Fernández R., (2021) quien reportó cefalea, artralgia/mialgia y dolor faríngeo como los más frecuentes.

En lo que respecta a las diferencias por sexo, los resultados de este estudio son similares a los reportados

por Fernández, R., (2021) quien muestra 27.6% de mujeres y 29.7% de hombres con síntomas comparado con el 21.2% de mujeres y 21.9% de hombres de este estudio.

Cuando los casos fueron divididos en DC y DNC, se encontraron diferencias en la prevalencia de cefalea, fatiga, mialgias, fiebre, anosmia/disosmia, ageusia/disgeusia y disnea, más frecuentes y severos en el grupo con DC.

Diferencias por regiones de México

Los síntomas de la enfermedad son diversos debido probablemente a las características de los individuos, la genética, y el estilo de vida regional. Pensando en estas diferencias entre regiones de un mismo país, incluidas aquellas variables socioculturales, decidimos comparar la población de acuerdo a la región Norte o Sur. Encontramos diferencias en la prevalencia de casos AFA-COVID-19 con mayor proporción en la región norte (97.3% vs 84.9%) y en la prevalencia de fiebre, mayor en el Sur del país (42.5% vs 64.4%).

COVID-19 y estilo de vida.

La percepción de la afectación general en el estilo de vida fue de 90%; la vida laboral y social fueron las esferas más afectadas. El análisis por género no mostró diferencias, pero al realizar el análisis en sujetos con y sin síntomas, se encontraron diferencias en la afectación de la vida laboral y en las relaciones familiares. Estos resultados eran esperados debido al aislamiento y las visitas al médico ante la sospecha de enfermedad, la realización de pruebas diagnósticas y el aislamiento social e incluso del núcleo familiar por al menos 14 días de los casos sospechosos o confirmados afectando ambas esferas. En general el estilo de vida se afectó mayormente en las mujeres.

La afectación en el estilo de vida se relaciona directamente con el estado emocional de los individuos. En México, más de un cuarto de la población ha presentado síntomas de distrés psicológico y post-traumático en respuesta a COVID-19 (González R., 2020 y Giorgi G., 2020) y de acuerdo con otros autores, datos recientes de encuestas de opinión pública, muestran que COVID-19 tiene un impacto psicológico significativo (Giorgi G., 2020; Asmundson G., 2020). La afectación psicológica puede ser más severa en ciertos grupos de riesgo, como los TS/ECS. El 46.3% de nuestra población con síntomas

relacionados con COVID-19 pertenecían a este grupo, de los cuales el 34% era personal de primera línea y de ellos el 50.5% confirmó su diagnóstico, desconocemos si los no confirmados se realizaron las pruebas o si salieron negativos. Se sabe que al inicio de la pandemia este grupo en particular fue sujeto a discriminación e incluso a agresiones verbales y físicas. Lo que revela la necesidad de un manejo proactivo para el control de la salud física y mental en este grupo de alto riesgo.

En la esfera social las medidas aplicadas del distanciamiento social tienen como consecuencias el aislamiento, la soledad, los cambios en los hábitos diarios y la inseguridad económica. Más aún, son factores de riesgo ligados a la ocurrencia de desorden por estrés agudo y episodio depresivo, estrés post-traumático y sentimientos como miedo, ansiedad y angustia, con efectos potenciales a largo plazo en la función cerebral (Angus Reid Institute, 2020). Los sujetos en este estudio declararon una percepción de afectación de la vida social de alrededor de 87%, esto se vuelve muy relevante debido a los efectos que pueden esperarse a nivel de la salud mental en México.

Por otro lado, la percepción de que su vida laboral se afectó en alrededor del 75% es otro punto relevante debido a que diversos factores ocupacionales se han asociado con la exacerbación o moderación del impacto de COVID-19 en la salud mental de los trabajadores (Giorgi G., 2020).

Conforme el impacto de la enfermedad continúe, las consecuencias económicas y la respuesta a ella empezarán a incrementarse, tales como la pérdida de trabajos, cierre de negocios y desplome de la actividad financiera (Li, Y., 2020), conduciendo a una pérdida importante del ingreso para los trabajadores y a un aumento del número de personas que viven en la pobreza, especialmente en las economías en desarrollo como la de México (UNDESA, 2020).

La pandemia por COVID-19 puede, desafortunadamente, resultar en un incremento del nivel de la población con resultados desfavorables para la familia y los niños (Statistics Canada, 2020); se estima que un gran porcentaje de familias mexicanas han tenido ya un impacto sustancial a nivel socio-económico. El Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL, 2020) estimó un incremento entre 8.9 y 9.8 millones de mexicanos con un ingreso por debajo de la línea de la pobreza debido a la crisis por COVID-19.

Este estudio es el primero que proporciona una imagen global del conocimiento de la población acerca de COVID-19, la variabilidad de los síntomas entre las regiones del país y entre los individuos y otros datos de relevancia epidemiológica y socioeconómica. Sin embargo, nuestra investigación posee limitaciones inherentes al diseño del estudio y otras como la falta de verificación de la calidad del conocimiento que los sujetos poseen acerca de la COVID-19, de la transmisión, prevención y síntomas asociados, la falta de evaluación de la relación conocimiento/aplicación de las medidas preventivas y la falta de información acerca de las pruebas diagnósticas realizadas y pruebas positivas en sujetos con ausencia de síntomas. Además, se desconoce si la población de estudio tiene el conocimiento y la habilidad suficiente para medir con precisión algunos signos como la fiebre, aunado a los diversos factores que pueden influenciar la medición de la temperatura corporal. Otra limitación es la falta de información acerca de otros factores que influyen la presencia de otros síntomas generales como la cefalea y la fatiga. Así como la falta de variables específicas asociadas a la afectación del estilo de vida. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas investigaciones que amplíen el conocimiento acerca del estilo de vida en sus tres esferas y que evalúen el daño causado por la pandemia a la salud física, mental y emocional de la población general y principalmente de grupos de riesgo. Es esencial estudiar y atender la salud física de los individuos y considerar, los efectos y las consecuencias a nivel psicológico, laboral y económico.

CONCLUSIÓN

Los efectos de la pandemia a nivel individual y poblacional son diversos, la dificultad del diagnóstico y control de la enfermedad requieren el reconocimiento de patrones epidemiológicos, el comportamiento de la enfermedad, sus síntomas, complicaciones y secuelas en las diferentes etnias y regiones de los países más afectados por este problema. De esto dependen los programas de prevención primaria y de tratamiento oportuno aplicados por los expertos en la Salud Pública.

REFERENCIAS

- Al-Hanawi, M. K., Angawi, K., Alshareef, N., Qattan, A., Helmy, H. Z., Abudawood, Y., et al. (2020). Knowledge, Attitude and Practice Toward COVID-19 Among the Public in the Kingdom of Saudi Arabia: A Cross-Sectional Study.

- Frontiers in public health, 8, 217. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00217>
- American Psychological Association. Thesaurus of Psychological Index Terms, 8th ed; 1972.
- Angus Reid Institute [Internet]. Half of Canadians taking extra precautions as coronavirus continues to spread around the globe. 2020. [cited 2021 Jul 29]. Recuperado de: https://angusreid.org/wp-content/uploads/2020/02/2020.02.04_Coronavirus.pdf.
- Asmundson, G., & Taylor, S. (2020). Coronaphobia: Fear and the 2019-nCoV outbreak. *Journal of anxiety disorders*, 70, 102196. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2020.102196>.
- Barua, Z., Barua, S., Aktar, S., Kabir, N., & Li, M. (2020). Effects of misinformation on COVID-19 individual responses and recommendations for resilience of disastrous consequences of misinformation. *Progress in disaster science*, 8, 100119. <https://doi.org/10.1016/j.pdisas.2020.100119>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., et al. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*, 395 (10223), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chirwa GC. (2020). “Who knows more, and why?” Explaining socioeconomic-related inequality in knowledge about HIV in Malawi. *Sci. African* 7:e00213. doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00213
- Chirwa, G. C., Sithole, L., & Jamu, E. (2019). Socio-economic Inequality in Comprehensive Knowledge about HIV in Malawi. *Malawi medical journal: the journal of Medical Association of Malawi*, 31(2), 104–111. <https://doi.org/10.4314/mmj.v31i2.1>
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) [Internet]. Informe de evaluación de la política de desarrollo social 2020. *Coneval* 2020;322. [cited 2021 Jul 30]. Recuperado de: <https://www.coneval.org.mx/Evaluacion/IEPSM/IEPSM/Paginas/IEPDS-2020.aspx>
- Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Gobernación. [Internet] Agreements approved at the II Extraordinary Session of the National Public Security Council. [cited 2021 Apr 21]. Recuperado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284444&fecha=10/01/2013
- Dirección General de Epidemiología [Internet]. COVID-19 Mexico [cited 2021 Jul 05]. Recuperado de: <https://datos.covid-19.conacyt.mx/#COMNac>
- Fernández-Rojas, MA., Luna-Ruiz Esparza, MA., Campos-Romero, A., Calva-Espinosa, DY., Moreno-Camacho, JL., Langle-Martínez, AP., et al. (2021). Epidemiology of COVID-19 in Mexico: Symptomatic profiles and presymptomatic people. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 104, 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.086>
- Giorgi, G., Lecca, LI., Alessio, F., Finstad, GL., Bondanini, G., Lulli, LG., et al. (2020). COVID-19-Related Mental Health Effects in the Workplace: A Narrative Review. *International journal of environmental research and public health*, 17(21), 7857. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217857>
- González Ramírez, LP., Martínez Arriaga, RJ., Hernández-Gonzalez, MA., & De la Roca-Chiapas, JM. (2020). Psychological Distress and Signs of Post-Traumatic Stress in Response to the COVID-19 Health Emergency in a Mexican Sample. *Psychology research and behavior management*, 13, 589–597. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S259563>
- Instituto Nacional de Salud Pública. Palacio Mejía L. S., Hernandez Avila. JE. [Internet]. Exceso de Mortalidad en México. [cited 2021 Jul 12]. Recuperado de: <https://coronavirus.gob.mx/exceso-de-mortalidad-en-mexico/>
- Johns Hopkins University & Medicine [Internet]. Coronavirus resource center [cited 2021 Apr 05]. Recuperado de: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Kim, HK., Ahn, J., Atkinson, L., & Kahlor, LA. (2020). Effects of COVID-19 misinformation on information seeking, avoidance, and processing: A multicountry comparative study. *Science Communication*, 42(5), 586–615.
- Ko, JH., Park, GE., Lee, JY., Lee, JY., Cho, SY., Ha, YE., et al. (2016). Predictive factors for pneumonia development and progression to respiratory failure in MERS-CoV infected patients. *The Journal of infection*, 73(5), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.08.005>

- Lechien, JR., Chiesa-Estomba, CM., De Siati, DR., Horoi, M., Le Bon, SD., Rodriguez, A., et al. (2020). Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *European archives of otorhinolaryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 277(8), 2251–2261. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-05965-1>
- Li, S., Wang, Y., Xue, J., Zhao, N., & Zhu, T. (2020). The Impact of COVID-19 Epidemic Declaration on Psychological Consequences: A Study on Active Weibo Users. *International journal of environmental research and public health*, 17(6), 2032. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062032>
- Li, Y., & Mutchler, J. E. (2020). Older Adults and the Economic Impact of the COVID-19 Pandemic. *Journal of aging & social policy*, 32(4-5), 477–487. <https://doi.org/10.1080/08959420.2020.1773191>
- Medical Subject Headings [Internet]. Family Relations. [cited 2021 Jul 11]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005195>
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases., Centers for Diseases Control [Internet]. COVID-19. How to Protect Yourself and Others [cited 2021 April 05]. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html#print>
- Norris, FH., Friedman, MJ., & Watson, PJ. (2002). 60,000 disaster victims speak: Part II. Summary and implications of the disaster mental health research. *Psychiatry*, 65(3), 240–260. <https://doi.org/10.1521/psyc.65.3.240.20169>
- Psychology Today Staff [Internet]. Social life [cited 2021 Jul 11]. <https://www.psychologytoday.com/us/basics/social-life>
- Rozenberg, S., Vandromme, J., & Martin, C. (2020). Are we equal in adversity? Does Covid-19 affect women and men differently? *Maturitas*, 138, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.05.009>
- Santana CG (2020). Differential vulnerability of the Mexican States against COVID-19. *Posicion*. 3 (May):1–24. https://www.researchgate.net/publication/341771418_Vulnerabilidad_diferencial_de_los_Estados_mexicanos_frente_al_COVID-19
- Slovic P. (1987). Perception of risk. *Science (New York, N.Y.)*, 236(4799), 280–285. <https://doi.org/10.1126/science.3563507>
- Smith, G. (2008). Does gender influence online survey participation? A record-linkage analysis of university faculty online survey response behavior. ERIC Document Reproduction Service No. ED 501717. Ritchie H., Ortiz OE., Beltekian D., MathieuE., Hasell J., Macdonald B., et al. [Internet]. Mexico: Coronavirus Pandemic Country Profile [cited 2021 Jul 05]. Recuperado de: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
- Statistics Canada [Internet]. Canadian Perspectives Survey Series 1: Impacts of COVID-19. Stat. Canada 2020,9–14. [cited 2021 Jul 30]. Recuperado de: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/en/daily-quotidien/200408/dq200408c-eng.pdf?st=5TS-vRPu>
- United Nations Department of Economic and Social Affairs [Internet]. World Economic Situation and Prospects 2020. En Country classification; 2020;163–171. [cited 2021 Jul 29]. Recuperado de: <https://doi.org/10.18356/036ade46-en>
- van de Looij, F., & Benders, J. (1995). Not just money: quality of working life as employment strategy. *Health manpower management*, 21(3), 27–33. <https://doi.org/10.1108/09552069510791650>
- Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782–793. doi: 10.1001/jama.2020.12839. PMID: 32648899.
- World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. [cited 2021 Mar 11] Recuperado de: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

Nivel de Depresión y estrés en alumnos de pregrado colonizados por *Blastocystis*: Reporte Preliminar.

Level of depression and stress in undergraduate students colonized by *Blastocystis*. Preliminary report.

¹Olivas-Ruelas Guillermo, ¹Muñoz-Yáñez Claudia, ^{1*}Guangorena-Gómez Janeth Oliva.

¹Facultad de Ciencias de la Salud, UJED. Calz. Palmas 1, Revolución, 35050 Gómez Palacio, Durango.

*Email: janethguangorenagomez@gmail.com

RESUMEN

La depresión es un problema de salud pública a nivel mundial; en los últimos años tomo fuerza su relevancia por el aislamiento debido a la pandemia por COVID-19 y el obligado cambio en el sistema educativo, lo que provocó que se agravaran los síntomas de estrés y depresión en los jóvenes estudiantes; en este proceso interviene la microbiota intestinal debido a la comunicación a través de nervios simpáticos, parasimpáticos y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal (HHS), asimismo los factores estresores pueden modificar la microbiota intestinal, por lo cual clarificar el papel del protista comensal *Blastocystis* habitante del intestino de los humanos y su significancia clínica es crucial. Por lo que el objetivo fue analizar los niveles de depresión y estrés y su relación con *Blastocystis* en alumnos de pregrado. Está en proceso un estudio de ensayo de campo del cual se analizaron muestras de heces de 63 estudiantes de pregrado, se analizó la presencia de *Blastocystis* por microscopía, se aplicó el inventario de depresión de Beck II y el inventario SISCO SV-21 de estrés académico. La colonización por *Blastocystis* en los alumnos fue de 46.03 % y se relacionó con menor tendencia de estrés, además mostraron menores problemas de concentración y mayor capacidad para afrontar este síntoma (U-Mann-Whitney $p = 0.04$).

Palabras clave: Depresión, Estrés, *Blastocystis*, Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Depression is a public health problem worldwide; In recent years, its relevance has gained strength due to the isolation due to the COVID-19 pandemic and the forced change in the educational system, which has caused the symptoms of stress and depression to worsen in young students; the gut microbiota is involved in this process due to communication through sympathetic and parasympathetic nerves and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis; likewise, stressors can modify the intestinal microbiota, thus clarifying the role of the commensal protist *Blastocystis* in humans and its clinical significance is crucial. Therefore, the objective was to analyze the levels of depression and stress and their relationship with *Blastocystis* in undergraduate students. A field trial study was carried out in which stool samples from 63 undergraduate students were analyzed, the presence of *Blastocystis* was analyzed by microscopy, and the Beck II depression inventory and the SISCO SV-21 inventory of academic stress were applied. Colonization by *Blastocystis* in the students was 46.03% and was related to a lower tendency to stress and showed fewer concentration problems and a more remarkable ability to cope with this symptom (U-Mann-Whitney $p = 0.04$).

Key words: Depression, Stress, *Blastocystis*, Gut intestinal.

INTRODUCCIÓN

La depresión es una enfermedad frecuente que afecta alrededor de 280 millones de personas en el mundo (OMS, 2021). En México, se ha reportado que en los estudiantes universitarios alrededor del 90% ha presentado síntomas depresivos lo que afecta su desempeño académico (Martínez-Martínez et al., 2016). Otro dato importante relacionado con esta enfermedad son las carreras de la salud en las cuales se ha reportado que la sintomatología de depresión se presenta a lo largo del ciclo académico en más del 40% de los estudiantes (Puig Lagunes et al., 2020), en este grupo etario las mujeres tienen más riesgo de padecer depresión que los hombres, sin embargo los hombres corren mayor riesgo de suicidio ya que no frecuentan orientación profesional (Albert, 2015; Mirza et al., 2021). Las personas con depresión experimentan falta de placer e interés en las actividades cotidianas, pérdida o ganancia de peso, insomnio o hipersomnia (Malhi & Mann, 2018), dificultad para concentrarse, falta de energía, sentimientos de culpa y de castigo e incluso pensamientos suicidas (APA, 2014), estos síntomas se agravaron durante el aislamiento social en el año 2020 dado por la pandemia causada por el COVID-19 con el aumento de estrés en los jóvenes estudiantes (C. Liu et al., 2021).

Uno de los factores principales para el desarrollo de depresión es el estrés, el cual se puede definir como un sistema biológico de alerta y respuesta ante cualquier cambio o estímulo interno o externo (Torrades, 2007). Ante estos estímulos interviene el eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis HPA, por sus siglas en inglés) en la homeostasis (McEwen, 2017), primero secreta Hormona liberadora de corticotropina (Corticotropin-releasing hormone CRH, por sus siglas en inglés) en el núcleo paraventricular del hipotálamo, esta actúa en la hipófisis para liberar Hormona adrenocorticotrópica (Adrenocorticotrophic hormone ACTH, por sus siglas en inglés) (Joseph & Whirledge, 2017). En respuesta al estímulo de la ACTH la glándula suprarrenal libera glucocorticoides como el cortisol que es el de mayor actividad en el organismo (Lightman et al., 2020); a nivel cerebral, cuando se secreta por un estresor agudo, mejora la memoria de trabajo y procesos cognitivos, mientras que si es por un estresor crónico se asocia a déficit en la consolidación de la memoria. Puede regular la formación y eliminación de dendritas de las neuronas corticales siguiendo el patrón de ritmo circadiano, que tienen un rol importante en los

procesos de aprendizaje y memoria (Rao & Androulakis, 2019).

En este proceso del estrés también interviene la microbiota intestinal, ya que existe comunicación con el cerebro a través de los nervios simpáticos y parasimpáticos (Socala et al., 2021) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal (Cryan et al., 2019). La microbiota intestinal puede sintetizar varios neurotransmisores como ácido gamma aminobutírico, dopamina, norepinefrina y serotonina (Morais et al., 2021). A su vez, factores estresores pueden afectar la microbiota intestinal (Galley et al., 2014) por lo tanto, provocar una desregulación de neurotransmisores que intervienen en alteraciones del estado de ánimo (Martin & Mayer, 2017).

El intestino humano alberga un sistema complejo y diverso de microorganismos mutualistas, que consiste en bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoarios (Alam & Neish, 2018). Uno de los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia en el intestino humano es *Blastocystis*, un Eucariota *Stramenopile* o *Heterokonta*, superfilo principal de eucariotas que se compone de diversos organismos multicelulares y unicelulares, a su vez estos pueden ser autótrofos y heterótrofos, dentro de estos últimos se encuentra *Blastocystis* (Farré, 2020), coloniza una amplia variedad de especies alrededor del mundo como lo son humanos, primates no humanos, roedores, aves, reptiles, anfibios e invertebrados (C. Rune Stensvold & Clark, 2016). Se estima que coloniza alrededor de mil millones de individuos en el mundo (Scanlan & Stensvold, 2013). 22 subtipos de *Blastocystis* han sido identificados sin embargo sólo 17 son reconocidos de los cuales los subtipos 1 al subtipo 9 (ST1-ST9) son reportados en humanos (ST1-ST9), de estos últimos, son los subtipos 1 al 4 (ST1-ST4) los que son más frecuentes en los humanos (Alfellani, 2013; Skotarczak, 2018). La patogenicidad de *Blastocystis* es controverial ya que existen estudios donde su prevalencia es mayor en individuos sanos (Scanlan et al., 2014), estos sujetos albergan una mayor riqueza y diversidad de bacterias intestinales y una microbiota intestinal saludable (Lukeš et al., 2015) y se considera cada vez más como miembro de la microbiota intestinal sana (Christen Rune Stensvold et al., 2022) incluso se postula en investigaciones como un potencial agente probiótico (Andersen & Stensvold, 2016); otros estudios sugieren su asociación con el Síndrome de Intestino Irritable y disbiosis intestinal cuando los individuos están colonizados (Lepczyńska et al., 2016; Nourrisson et al., 2014). Cabe recalcar que la

disbiosis también se relaciona a enfermedades graves como diabetes, obesidad y por supuesto depresión (Foster *et al.*, 2017). Por esta razón la significancia clínica de *Blastocystis* aún no es clara (Andersen & Stensvold, 2016; Audebert *et al.*, 2016; Yakoob *et al.*, 2010). Se cree que toda esta disimilitud se debe a la gran variedad de subtipos que existen (Skotarczak, 2018). Por lo tanto es necesario dilucidar el papel de este protozooario miembro de la microbiota intestinal en personas portadoras.

Durante el aislamiento por la pandemia causada por el COVID-19, la población universitaria mostró mayor prevalencia de depresión (C. Liu *et al.*, 2021) y estrés, además de puntajes más altos en el Cuestionario sobre la salud del paciente-9 (Patient Health Questionnaire por sus siglas en inglés PHQ9) y en la Escala revisada del evento estresante (Impact of Event Scale-Revised por sus siglas en inglés IES-R), lo que significa que presentaron mayor niveles de depresión y estrés (Essadek & Rabeyron, 2020). Como parte de esta problemática la Organización Mundial de la Salud reportó que la prevalencia global de la depresión aumentó hasta un 25% durante el primer año de la pandemia por COVID-19 incluyendo un mayor riesgo de comportamientos suicidas en jóvenes (OMS, 2022). Debido a lo anterior el objetivo de este estudio es analizar los niveles de depresión y estrés y su relación con *Blastocystis* en alumnos de pregrado de las Licenciaturas de Medicina, Nutrición y Psicología.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina y Nutrición de la Universidad Juárez del Estado de Durango con el número de registro CEI-FAMEN-17). Los estudiantes fueron previamente informados acerca del estudio y todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Solo los participantes que completaron todas las mediciones de interés fueron incluidos dentro del análisis de datos. Este estudio es un ensayo de campo del cual se hizo un reporte transversal con muestreo probabilístico realizado entre noviembre y diciembre del 2021. El criterio de exclusión fue haber recibido tratamiento antibiótico durante los 3 meses previos al estudio. Los alumnos contestaron un cuestionario de síntomas gastrointestinales en formato digital, que consistía en preguntas de opción múltiple basadas en los criterios de diagnóstico de ROMA III (Bai *et al.*, 2017; Drossman, 2006).

Inventario de depresión de Beck

Se les aplicó el Inventario de Depresión de Beck II (BDI-II) adaptado a la población mexicana, es un instrumento de autoaplicación que consta de 21 ítems con cuatro opciones de respuesta (0 a 3 puntos) diseñado para evaluar la gravedad de los síntomas de depresión de acuerdo a la puntuación total que puede variar si tienen los siguientes puntos de corte: 0-13, depresión mínima; 14-19, depresión leve; 20-28 depresión moderada; y 29-63 depresión severa (González *et al.*, 2015).

Inventario SISCO SV-21 de estrés académico

Para la medición de estrés se realizó el inventario SISCO SV-21 (Inventario SISTémico Cognoscitivista segunda versión de 21 ítems) para el estrés académico, constituido por 21 ítems con un ítem de filtro, en término dicotómico (si-no), permite determinar si el encuestado es candidato o no a contestar el inventario. Un ítem escala tipo Likert con cinco valores numéricos (1-5 donde uno es poco y cinco mucho), permite identificar nivel de intensidad de estrés académico. El cuestionario está dividido en 3 secciones en una escala tipo Likert de seis variables categóricas (nunca, casi nunca, rara vez, algunas veces, casi siempre y siempre) que valoran los estímulos estresores, los síntomas ante un estímulo estresor y las estrategias de afrontamiento (Barraza, 2018).

Examen parasitológico

Las muestras de heces fueron colectadas en tubos con formaldehído al 10% para examen coproparasitoscópico por triplicado. La identificación microscópica de *Blastocystis* se llevó a cabo de tres días diferentes de deposición. Se realizó la técnica de Ritchie modificada (Anécimo *et al.*, 2012) en la preparación de las muestras para luego ser observadas bajo el microscopio. Se mezclaron 10 µL de cada muestra de heces con 20 µL de solución yodada de Lugol y se cubrieron con un cubreobjetos de 21 x 26 mm. El portaobjetos se examinó para *Blastocystis* a 300 campos ópticos con un aumento de 250 x (20 x objetivo y 12.5 x ocular) y, en caso de organismos sospechados, 500 x (40 x 12.5 x). La observación de cada lámina tuvo una duración promedio de 5 min. El criterio diagnóstico para positividad fue al menos 2 formas vacuolares del parásito en cualquiera de las tres muestras y solamente un microscopista entrenado realizó el diagnóstico (Bart *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables recopiladas en los inventarios de depresión y estrés, para todos los valores continuos, las hipótesis de normalidad se evaluaron utilizando la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se utilizaron pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney para comparación entre los grupos, no colonizados y colonizados por *Blastocystis*. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo a un estudio previo reportado por Guangorena-Gómez y cols de acuerdo a los síntomas de estrés (Dimensión de estresores del Inventario SISCO de estrés académico) y los no colonizados y colonizados por *Blastocystis* por diferencia de medias para muestras independientes (Guangorena-Gómez et al., 2022) the Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio dando un tamaño de muestra de 64 sujetos por grupo. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Stata versión 13.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se excluyeron 4 sujetos porque las muestras eran insuficientes y/o cuestionarios incompletos, se obtuvo como muestra final a 63 participantes. De los 63 participantes la mayoría fueron mujeres $n = 42$ (66.67%), y en menor proporción 21 hombres (33.33%). La media de edad fue de 20.66 ± 1.53 años. La frecuencia de colonizados fue de 46.03 % lo cual concuerda con la frecuencia reportada en 2020 a esta misma cohorte de alumnos universitarios (Pérez et al., 2020). En cuanto a los hallazgos más importantes de la presentación de los síntomas depresivos en los 63 estudiantes, se encontró diferencia entre “sentimiento de castigo”, siendo mayor en hombres a diferencia de las mujeres (0.52 ± 0.81 y 0.21 ± 0.60 , respectivamente, $p = 0.03$). Los sentimientos de “llanto” e “indecisión” tuvieron mayor presencia en mujeres en comparación con los hombres (0.19 ± 0.40 y 1.02 ± 0.94 , respectivamente, $p = 0.003$). El puntaje total del inventario obtenido de los ítems fue mayor en mujeres que en hombres (17.80 ± 10.08 y 14.20 ± 9.90 , respectivamente, $p = 0.17$) (Tabla 1).

En este estudio las mujeres presentaron una mayor intensidad de síntomas de depresión comparado con los hombres tal como se reportó en estudios previos (Z. Liu et al., 2021; Meda et al., 2021; Nakhostin-Ansari et al., 2020). En nuestro estudio, cambios en el apetito, cambios en el hábito de sueño y dificultad de concentración son los ítems con mayor puntuación, concordó la frecuencia

de estos últimos dos síntomas en comparación con un estudio transversal durante el confinamiento por COVID-19 donde se incluyeron a 323 estudiantes de medicina iraníes, se aplicaron en línea los Inventarios de Ansiedad de Beck y el Inventario de depresión de Beck II (Nakhostin-Ansari et al., 2020). De acuerdo a los resultados y la comparación entre género, los ítems que más impacto tuvieron en mujeres fueron “indecisión” y “llanto” (Tabla 1), donde este último es frecuentemente reportado como uno de los más prevalentes dentro del género femenino como lo reportó De Sá en su estudio donde se realizó un muestreo por conglomerados en dos etapas en Instituciones de Educación Superior en Brasil donde se reclutó a 12,677 estudiantes (5,692 hombres y 6,985 mujeres) y se aplicó el Inventario de Depresión de Beck II en donde el porcentaje de mujeres que reportó este síntoma fue de 31% a diferencia del 11% que se reportó en hombres (De Sá et al., 2019).

En el presente estudio la relación de los niveles de depresión y la colonización por *Blastocystis*, los sujetos portadores de este protozooario mostraron un discreto aumento en el puntaje de Beck aunque no fue significativo (Tabla 1), los resultados se ven apoyados por un estudio experimental con ratas las cuales fueron oralmente infectadas por *Blastocystis* ST-4, posterior a eso se observó su comportamiento en un ciclo de luz-oscuridad 12h:12h, se sometieron a las prueba de laberinto en cruz elevado y de nado forzado, como resultado ratas infectadas estuvieron más propensas a presentar comportamientos similares a la depresión. (Defaye et al., 2020). Concordando con este estudio experimental, un estudio de casos y controles llevado a cabo por Kamal et al. en 2021 en la Clínica ambulatoria de psiquiatría y neurología de los Hospitales universitarios de Minia, Egipto, donde se categorizó a 983 pacientes de acuerdo con el desorden psiquiátrico diagnosticado, los pacientes con depresión presentaron alta prevalencia de parásitos intestinales; entre todos los parásitos encontrados el más prevalente dentro de los pacientes psiquiátricos fue *Blastocystis* con 16% y en los no psiquiátricos 5.1 % con un OR de 3.47 (I.C.95 2.5-4.83) (Kamal et al., 2021). En un estudio transversal retrospectivo se tomó una base de datos de la que se extrajeron 979 sujetos mayores de edad, se analizaron las muestras de heces mediante PCR tiempo real en busca de parásitos y se aplicó a cada sujeto el Cuestionario del paciente Bioscreen del que únicamente se analizaron los ítems relacionados a dominios psicológicos (depresivo, neurocognitivo, estrés y ansiedad, sueño), no hubo efecto en la severidad de síntomas relacionados con la presencia de *Blastocystis*,

Tabla 1. Presentación de síntomas depresivos en estudiantes de pregrado de acuerdo con sexo y colonización por *Blastocystis*.

Ítem	Total 63	Hombre 21 (33.33 %)	Mujer 42 (66.67 %)	No colonizados 34 (53.97 %)	Colonizados 29 (46.03 %)
1.Tristeza	0.36 ± 0.57	0.23 ± 0.43	0.42 ± 0.63	0.32 ± 0.58	0.41 ± 0.56
2.Pesimismo	0.55 ± 0.64	0.47 ± 0.51	0.59 ± 0.70	0.67 ± 0.72	0.42 ± 0.50
3.Fracaso	0.50 ± 0.64	0.61 ± 0.74	0.45 ± 0.59	0.52 ± 0.70	0.48 ± 0.57
4.Pérdida de placer	0.73 ± 0.70	0.66 ± 0.65	0.76 ± 0.72	0.64 ± 0.69	0.82 ± 0.71
5.Sentimiento de culpa	0.73 ± 0.72	0.57 ± 0.81	0.80 ± 0.67	0.64 ± 0.59	0.82 ± 0.84
6.Sentimiento de castigo	0.31 ± 0.69	0.52 ± 0.81	0.21 ± 0.60	0.29 ± 0.62	0.34 ± 0.76
7.Disconformidad con uno mismo	0.82 ± 0.90	0.80 ± 0.92	0.83 ± 0.90	0.74 ± 0.94	0.86 ± 0.87
8.Autocrítica	0.52 ± 0.96	0.57 ± 0.92	0.5 ± 0.99	0.70 ± 1.00	0.31 ± 0.80
9.Pensamientos y deseos suicidas	0.34 ± 0.59	0.28 ± 0.46	0.38 ± 0.66	0.44 ± 0.66	0.24 ± 0.51
10.Llanto	0.74 ± 0.89	0.19 ± 0.40	1.02 ± 0.94	0.70 ± 0.20	0.79 ± 0.90
11.Agitación	0.85 ± 0.85	0.71 ± 0.84	0.92 ± 0.86	0.79 ± 0.91	0.93 ± 0.79
12.Pérdida de interés	0.82 ± 0.68	1.04 ± 0.92	0.71 ± 0.50	0.79 ± 0.73	0.86 ± 0.58
13.Indecisión	0.74 ± 0.86	0.47 ± 0.81	0.88 ± 0.86	0.76 ± 0.88	0.72 ± 0.84
14.Desvalorización	0.53 ± 0.75	0.52 ± 0.87	0.54 ± 0.70	0.55 ± 0.82	0.51 ± 0.68
15.Pérdida de energía	0.88 ± 0.72	0.71 ± 0.78	0.97 ± 0.68	0.82 ± 0.79	0.96 ± 0.62
16.Cambio en hábitos de sueño	2.00 ± 1.96	1.76 ± 1.81	2.11 ± 2.00	1.58 ± 1.77	2.40 ± 2.00
17.Irritabilidad	0.69 ± 0.77	0.61 ± 0.66	0.73 ± 0.82	0.61 ± 0.73	0.79 ± 0.81
18.Cambios en el apetito	2.00 ± 1.90	1.52 ± 1.60	2.28 ± 2.08	2.02 ± 1.85	2.03 ± 2.11
19.Dificultad de concentración	1.20 ± 0.80	1.04 ± 0.92	1.28 ± 0.74	1.08 ± 0.83	1.34 ± 0.76
20.Cansancio o fatiga	0.92 ± 0.92	0.71 ± 0.90	1.02 ± 0.92	0.82 ± 0.93	1.03 ± 0.90
21.Pérdida de interés en el sexo	0.26 ± 0.54	0.19 ± 0.40	0.30 ± 0.60	0.29 ± 0.57	0.24 ± 0.51
Puntaje BDI-II	16.63 ± 10.08	14.20 ± 9.90	17.80 ± 10.08	15.94 ± 10.74	17.44 ± 9.37

BDI-II: Inventario de depresión de Beck-II; $\bar{x}$: Media; DE: Desviación estándar; Prueba estadística: U-Mann-Whitney; Significancia estadística en negritas: $p < 0.05$

sin embargo si se reportó diferencia en cuanto al género siendo las mujeres más afectadas (Ganci *et al.*, 2021), tal como se reportó en nuestros hallazgos con puntaje promedio de 14.20 ± 9.90 en hombres y 17.80 ± 10.08 en mujeres.

En cuanto al inventario de estrés académico SISCO SV-21, los estresores con más impacto en los alumnos fueron “la poca claridad de los profesores”, “la forma de evaluación de los profesores” y “la personalidad de los profesores”. Siendo entre estos tres el estresor de más impacto entre género “la forma de evaluación de los profesores” afectando en mayor medida a los hombres, que a las mujeres (4.00 ± 1.66 y 2.83 ± 1.80 , respectivamente, $p = 0.02$). En cuanto a los síntomas que más se presentan en los estudiantes a consecuencia de los estresores fueron los “problemas de concentración”, “tendencia a polemizar o discutir” y la “ansiedad, angustia o desesperación”, ninguno de los anteriores mostró diferencia entre género, en cambio el síntoma “desgano para realizar labores escolares” fue el que mostró mayor puntaje en mujeres a diferencia de los hombres (3.38 ± 1.73 y 2.38 ± 1.37 , respectivamente, $p = 0.03$) (Tabla 2).

Las estrategias de afrontamiento que más utilizaron los estudiantes fueron “Obtener lo positivo de la situación”, “Recordar situaciones similares anteriores” y “Establecer soluciones concretas”. De los hallazgos más importantes en este rubro se encuentra una mayor capacidad de los hombres para “Recordar soluciones

ocurridas anteriormente para afrontar los estresores” en comparación con las mujeres (4.00 ± 1.76 y 2.83 ± 1.73 , respectivamente, $p = 0.01$). Las mujeres mostraron mayor capacidad para la elaboración de un plan a diferencia de hombres (3.42 ± 1.76 y 2.00 ± 1.45 , respectivamente, $p = 0.0027$) (Tabla 2).

En nuestro estudio los hombres mostraron niveles mayores de estrés, lo cual difiere de la literatura reportada previamente en las que mujeres tenían mayor estrés (Avalos Latorre & Trujillo Martínez, 2021; Luna *et al.*, 2020). Además encontramos como último factor estresor “la sobrecarga de tareas”, el cual en otro estudio transversal realizado en 194 estudiantes universitarios en Perú, fue descrito como el estresor que más afectó a los alumnos en el contexto de la pandemia por COVID-19 (Luque Vilca *et al.*, 2021). La poca claridad de los profesores como estresor más importante, puede ser explicada en torno al poco entendimiento y conocimiento de la modalidad a distancia por ambas partes (CEPAL, 2020).

Otro de los hallazgos importantes fue que los alumnos colonizados por *Blastocystis*, mostraron menos problemas para concentrarse ante factores estresores ($p = 0.04$) (Tabla 2, Figura 1), esto podría explicarse debido a que un sujeto portador de *Blastocystis* preserva una mayor diversidad y riqueza de microbiota intestinal, tal como lo describe Tito *et al.* en una cohorte de 616 individuos sanos en Bélgica y otra cohorte de 107 pacientes con Enfermedad Intestinal Inflamatoria, donde se reportó

Tabla 2. Presentación de estresores, síntomas y estrategias de afrontamiento más comunes en estudiantes de pregrado de acuerdo con sexo y colonización por *Blastocystis*.

Ítem	Total 63	Hombre 21 (33.33 %)	Mujer 42 (46.03 %)	No colonizados 34 (53.97)	Colonizados 29 (46.03%)
Estresores					
1.Sobrecarga de tareas y trabajos escolares	1.98 ± 0.97	1.84 ± 1.01	2.04 ± 0.96	1.84 ± 0.83	2.13 ± 1.05
2.La personalidad y el carácter de los/as profesores	3.04 ± 1.65	3.42 ± 1.57	2.88 ± 1.68	3.18 ± 1.55	2.89 ± 1.77
3.La forma de evaluación de los profesores	3.19 ± 1.83	4.00 ± 1.66	2.83 ± 1.80	3.18 ± 1.72	3.20 ± 1.98
4.El nivel de exigencia de los profesores	2.68 ± 1.69	3.05 ± 1.80	2.52 ± 1.64	2.78 ± 1.69	2.58 ± 1.72
5.El tipo de trabajo que piden los profesores	2.67 ± 1.66	2.78 ± 1.68	2.61 ± 1.66	2.96 ± 1.71	2.34 ± 1.56
6.Tiempo limitado para hacer el trabajo que encargan los profesores	2.86 ± 1.58	3.15 ± 1.77	2.73 ± 1.49	2.84 ± 1.43	2.89 ± 1.75
7.La poca claridad sobre lo que quieren los profesores	3.49 ± 1.74	4.00 ± 1.73	3.26 ± 1.72	3.43 ± 1.72	3.55 ± 1.80
Síntomas					
1.Fatiga crónica (cansancio permanente)	3.03 ± 1.71	2.63 ± 1.73	3.21 ± 1.68	2.90 ± 1.55	3.17 ± 1.89
2.Sentimientos de depresión y tristeza (decaído)	2.68 ± 1.69	2.68 ± 1.41	2.69 ± 1.82	2.53 ± 1.62	2.86 ± 1.78
3.Ansiedad, angustia o desesperación	3.10 ± 1.64	2.83 ± 1.33	3.21 ± 1.76	3.22 ± 1.72	2.96 ± 1.56
4.Problemas de concentración	3.30 ± 1.78	3.83 ± 1.97	3.00 ± 1.67	3.74 ± 1.69	2.82 ± 1.79
5.Sentimiento de agresividad o aumento de irritabilidad	2.76 ± 1.47	2.72 ± 1.67	2.78 ± 1.40	2.58 ± 1.38	2.96 ± 1.56
6.Conflictos o tendencia a polemizar o discutir	3.26 ± 1.57	3.38 ± 1.68	3.21 ± 1.53	3.12 ± 1.52	3.41 ± 1.63
7.Desgano para realizar las labores escolares	3.08 ± 1.69	2.38 ± 1.37	3.38 ± 1.73	3.12 ± 1.47	3.03 ± 1.91
Estrategias de afrontamiento					
1.Concentrarse en resolver la situación que me preocupa	2.88 ± 1.49	2.84 ± 1.46	2.90 ± 1.52	2.81 ± 1.44	2.96 ± 1.56
2.Establecer soluciones concretas para resolver las situaciones	3.03 ± 1.77	2.57 ± 1.89	3.23 ± 1.70	3.15 ± 1.88	2.89 ± 1.67
3.Control sobre las emociones	2.27 ± 1.36	2.31 ± 1.45	2.26 ± 1.34	2.46 ± 1.50	2.06 ± 1.19
4.Recordar situaciones similares ocurridas anteriormente y pensar en cómo las soluciona	3.19 ± 1.81	4.00 ± 1.76	2.83 ± 1.73	3.50 ± 1.81	2.86 ± 1.78
5.Elaboración de un plan para enfrentar los estresores	2.98 ± 1.79	2.00 ± 1.45	3.42 ± 1.76	2.56 ± 1.70	3.44 ± 1.80
6.Fijarse o tratar de obtener lo positivo de la situación que preocupa	3.55 ± 1.75	3.84 ± 1.65	3.42 ± 1.79	3.50 ± 1.86	3.62 ± 1.65

X: Media; DE: Desviación estándar; Prueba estadística: U-Mann-Whitney; Significancia estadística: p<0.05

una elevada prevalencia de *Blastocystis* en la cohorte de individuos sanos, además se correlacionó el subtipo 4 de este protozoario con la bacteria *Akkermansia*, sugiriendo que *Blastocystis* es parte de una microbiota saludable (Tito *et al.*, 2019), esto sugiera que *Blastocystis* puede ser un organismo clave en el ecosistema intestinal, ya que cuando no hay diversidad y riqueza en la microbiota ocurre disbiosis y puede condicionar a un mayor estado depresivo (Fontana *et al.*, 2020), por otro lado en una cohorte de 202 estudiantes universitarios mexicanos a quienes se solicitó muestras fecales y de cabello, y se aplicaron los inventarios de “Escala de Estrés Percibido” e “Inventario de estrés académico SISCO” y se midió cortisol en cabello se encontró que los individuos que estaban colonizados por *Blastocystis* subtipo 4 presentaron menores niveles de cortisol en cabello y síntomas psicológicos de estrés de manera global medido a través de los inventarios (Guangorena-Gómez *et al.*, 2022)the Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio; concordando con esto, en otro estudio *in vitro* acerca las interacciones entre bacterias intestinales y *Blastocystis* subtipo 4, este último mostró un efecto protector en la barrera epitelial intestinal al ser co-cultivado junto con *Bacteroides vulgatus* un patógeno oportunista, mediante la mayor expresión de especies reactivas de oxígeno e incremento en los genes reguladores del estrés oxidativo hubo un decremento de unidades formadoras

de colonias *Bacteroides vulgatus* (Deng & Tan, 2022), que está relacionado con marcadores inflamatorios produciendo lipopolisacáridos (LPS), que a través de las células CD4 se producen interleucinas 6, 8 y TNF- α (Yan *et al.*, 2021). Se cree que el estrés provocado por la aplicación de lipopolisacáridos de la pared celular de bacterias Gram negativas o por otras causas, activa la respuesta inmunitaria innata y los receptores de tipo toll en la membrana de diversas clases de linfocitos. La activación de los receptores TLR4 induce la activación de la subunidad β del factor necrótico kappa que, a su vez, activa el inflammasoma NLPR3, lo que provoca la liberación de la caspasa 1 y la subsecuente liberación de IL-1 β e IL-6. Estas citocinas median la inflamación, los síntomas generales de una posible depresión (Miller *et al.*, 2010). Además se sabe que las especies de *Bacteroides* son abundantes en la microbiota intestinal de personas con Depresión (Naseribafrouei *et al.*, 2014) principalmente en el Trastorno Depresivo Mayor (Zhang *et al.*, 2022). Otro estudio realizado en una población de 72 adultos en un hospital universitario en Barcelona se observó el porcentaje de detección de *Blastocystis* en dos grupos, uno con sujetos asintomáticos y el otro grupo conformado por pacientes sintomáticos con el diagnóstico de Síndrome de Colon Irritable (SCI); en ambos grupos se reportó la presencia de *Blastocystis*, donde se reportó mayor proporción de colonizados

asintomáticos sin representar una diferencia significativa entre ambos grupos (Salvador *et al.*, 2021). Cabe recalcar que las alteraciones en la microbiota intestinal se han asociado con el SCI y la depresión, donde los pacientes con SCI y depresión y su microbiota intestinal tienen similitudes (Y. Liu *et al.*, 2018), por lo cual, es importante tener en consideración que *Blastocystis* en humanos se puede relacionar principalmente a una microbiota intestinal que interviene de manera favorable en la salud del hospedador (Beghini *et al.*, 2017; Kodio *et al.*, 2019). A partir de esto se puede sugerir que en los estudiantes colonizados por *Blastocystis* se mejoran las estrategias de afrontamiento ante el estrés generado durante el ciclo escolar. Otro estudio de Nieves-Ramírez *et al.*, estudió 156 sujetos en una comunidad rural en el estado de Morelos, México, la colonización por *Blastocystis* se determinó mediante microscopia y PCR cuantitativa, también determinó la composición de la microbiota intestinal mediante amplificación y secuenciación de los genes 16S rRNA y 18S rRNA para procariotas y eucariotas, respectivamente. Como resultado correlacionó positivamente a *Blastocystis* subtipo 3 con *Ruminococcus bromii* y negativamente con *Prevotella copri.*, de igual forma describió una interesante disminución de calprotectina fecal en individuos colonizados por *Blastocystis* (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018), la cual pertenece a la familia de proteínas leucocitarias S100 que se unen al calcio, se expresa en el citosol de neutrófilos, además considerada como biomarcador en procesos inflamatorios intestinales (Jukic *et al.*, 2021). Estos podrían ser considerados mecanismos indirectos de *Blastocystis* en la regulación de moduladores del sistema nervioso central a través de modificar las especies bacterianas dominantes en la microbiota intestinal.

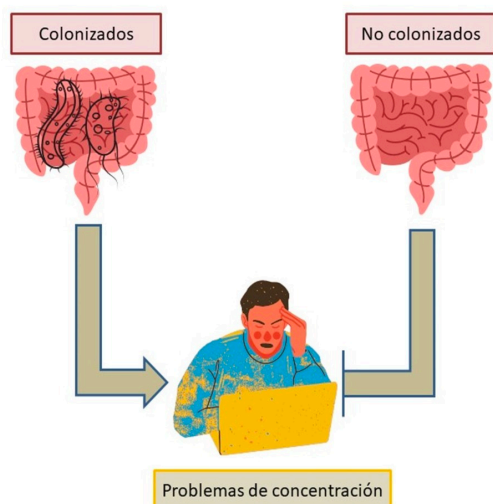


Figura 1. Problemas de concentración en estudiantes de pregrado colonizados por *Blastocystis*. La flecha muestra que hubo menores problemas de concentración en estudiantes colonizados a diferencia de aquellos no colonizados. Significancia estadística $p < 0.05$

En contraparte, en un estudio realizado en Irán, colectaron muestras de heces en sujetos aparentemente sanos y pacientes con problemas gastrointestinales, observaron mayor actividad de proteasas en *Blastocystis* subtipo 6 el cual se atribuyó a que este tiene como hospedero las aves, por lo que en organismos diferentes causaría mayor respuesta celular inmune provocando sintomatología en sujetos colonizados (Karamati *et al.*, 2021).

Una de las limitaciones de este estudio es que es un reporte preliminar de un ensayo de campo aún no concluido, y es de tipo transversal el cual no explica causalidad y el tamaño de la muestra que aún no se completa, sin embargo cabe recalcar que es importante considerar los posibles confusores como es el sexo y el papel clave de *Blastocystis* como regulador del equilibrio de la microbiota intestinal, además consideramos completar el tamaño de muestra estimado que fue 64 sujetos por grupo (no colonizados y colonizados), por otro lado la determinación de *Blastocystis* solo se realizó por microscopía, debido a la factibilidad financiera y de tiempo, sin embargo, la determinación de *Blastocystis* y sus subtipos se realizará por PCR tiempo real. Y en cuanto al inventario de depresión se realizará el análisis factorial para identificar variables subyacentes o factores que expliquen mejor las correlaciones dentro del conjunto de las variables estudiadas con respecto a los portadores y no portadores de *Blastocystis*.

CONCLUSIONES

Aún no está clara la significancia clínica de la colonización por *Blastocystis*, en nuestro estudio se observó una menor tendencia de estrés en alumnos colonizados quienes mostraron menores problemas de concentración y una mayor capacidad para afrontar este síntoma de estrés, lo cual esto corrobora el resultado de un estudio previo de nuestro grupo de investigación donde se observó de manera global una mejoría en la dimensión de síntomas de estrés del inventario SISCO de estrés académico, por esta razón decidimos analizar de manera individual los ítems de los síntomas de estrés.

REFERENCIAS

- Alam A & Neish A. Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function. *Tissue Barriers*. 2018; 6(3): 1–22. <https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1539595>

- Albert PR. Why is depression more prevalent in women? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2015; 40(4): 219–221. <https://doi.org/10.1503/jpn.150205>
- Alfellani MA. Genetic Diversity of Blastocystis in Livestock and Zoo Animals. *Protist*. 2013; 164(4): 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>
- Andersen LO & Stensvold CR. Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? In *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 2016; 54(3): 524–528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02520-15>
- Anécimo RS, Tonani KAA, Fregonesi BM, Mariano AP, Ferrassino MDB, Trevilato TMB, *et al.* Adaptation of Ritchie's method for parasites diagnosing with minimization of chemical products. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012; 2012: 1–5 <https://doi.org/10.1155/2012/409757>
- APA. Guía de consulta de los criterios diagnosticos del DSM-5. In *Archives of Neurology And Psychiatry*. American Psychiatric Publishing. 2014; 9(5): 104–108. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1923.02190230091015>
- Audebert C, Even G, Cian A, Loywick A, Merlin S, Viscogliosi E, *et al.* Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*. 2016; 6(5): 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep25255>
- Avalos Latorre ML & Trujillo Martínez F. Variables involucradas con el estrés académico y el afrontamiento en universitarios durante el confinamiento por covid-19. *Psicología Iberoamericana*. 2021; 29(3): 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.48102/pi.v29i3.331>
- Bai T, Xia J, Jiang Y, Cao H, Zhao Y, Zhang L, *et al.* Comparison of the Rome IV and Rome III criteria for IBS diagnosis: A cross-sectional survey. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2017; 32(5): 1018–1025. <https://doi.org/10.1111/jgh.13642>
- Barraza A. (2018). *Inventario SISCO SV-21, Inventario SIsTémico COgnoscitivista para el estudio del estrés académico. Segunda versión de 21 Ítems*. http://www.ecorfan.org/libros/Inventario_SISCO_SV-21/Inventario_sistémico_cognoscitivista_para_el_estudio_del_estrés.pdf
- Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, *et al.* Diagnosis and subtype analysis of Blastocystis sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*. 2013; 13(1): 2–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-389>
- Beghini F, Pasolli E, Truong TD, Putignani L, Cacciò SM, & Segata N. Large-scale comparative metagenomics of Blastocystis, a common member of the human gut microbiome. *ISME Journal*. 2017; 11(12): 2848–2863. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.139>
- CEPAL NU. (2020). La educación en tiempos de la pandemia de COVID-19. In *Informe COVID-19*. <https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000004003>
- Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*. 2019; 99(4): 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- De Sá AR, Liebel G, De Andrade AG, Andrade LH, Gorenstein C & Wang YP. Can gender and age impact on response pattern of depressive symptoms among college students? A differential item functioning analysis. *Frontiers in Psychiatry*. 2019; 10(2): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00050>
- Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, Lashermes A, Meynier M, Meleine M, *et al.* Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66156-w>
- Deng L & Tan KSW. Interactions between Blastocystis subtype ST4 and gut microbiota in vitro. *Parasites & Vectors*. 2022; 15(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05194-x>
- Drossman DA The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. *Gastroenterology*. 2006; 130(5): 1377–1390. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.008>
- Essadek A & Rabeyron T. Mental health of French students during the Covid-19 pandemic. *Journal of Affective Disorders*. 2020; 277(8): 392–393. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.08.042>
- Farré EM. The brown clock: circadian rhythms in stramenopiles. *Physiologia Plantarum*. 2020; 169(3): 430–441. <https://doi.org/10.1111/ppl.13104>

- Fontana A, Manchia M, Panebianco C, Paribello P, Arzedi C, Cossu E, *et al.* Exploring the Role of Gut Microbiota in Major Depressive Disorder and in Treatment Resistance to Antidepressants. *Biomedicines*. 2020; 311(8): 1–12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090311>
- Foster JA, Rinaman L & Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of Stress*. 2017; 7: 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.001>
- Galley JD, Nelson MC, Yu Z, Dowd SE, Walter J, Kumar PS, *et al.* Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC Microbiology*. 2014; 14(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-189>
- Ganci M, Butt H, Tyrrell J, Suleyman E & Ball M. The effect of Blastocystis sp. and Dientamoeba fragilis on psychological symptom severity in a sample of clinically diverse males and females. *Current Psychology*. 2021 <https://doi.org/10.1007/s12144-021-01700-z>
- González DA, Rodríguez AR & Reyes-Lagunes I. Adaptation of the BDI-II in Mexico. *Salud Mental*. 2015; 38(4): 237–244. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2015.033>
- Guangorena-Gómez JO, Lozano-Ochoa II, Rivera-Medina IL, Méndez-Hernández A, Espinosa-Fematt JA, & Muñoz-Yáñez C. Relationship Among Blastocystis, the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio and Chronic Stress in Mexican University Students. *Current Microbiology*. 2022; 79(3): 72. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02756-7>
- Joseph DN, & Whirledge S. Stress and the HPA axis: Balancing homeostasis and fertility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(10): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>
- Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, Tilg H & Adolph TE. Calprotectin: From biomarker to biological function. *Gut*. 2021; 70(6): 1978–1988. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324855>
- Kamal AM, Kamal AM & Hassan EE. Some intestinal parasites and psychiatric diseases: Is there a possible link? *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2021; 51(2): 227–232. <https://doi.org/10.21608/jesp.2021.192718>
- Karamati SA, Mirjalali H, Niyyati M, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Haghighi A, *et al.* Association of Blastocystis ST6 with higher protease activity among symptomatic subjects. *BMC Microbiology*. 2021; 21(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02341-9>
- Kodio A, Coulibaly D, Koné AK, Konaté S, Doumbo S, Guindo A, *et al.* Blastocystis colonization is associated with increased diversity and altered gut bacterial communities in healthy malian children. *Microorganisms*. 2019; 7(12): 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120649>
- Lepczyńska M, Dzika E, Kubiak K, & Korycińska J. The role of Blastocystis sp. as an etiology of irritable bowel syndrome. *Polish Annals of Medicine*. 2016; 23(1): 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.poamed.2015.04.001>
- Lightman SL, Birnie MT & Conway-Campbell BL. Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. *Endocrine Reviews*. 2020; 41(3): 1–23. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa002>
- Liu C, McCabe M, Kellett-Renzella S, Shankar S, Gerges N, & Cornish K. Addressing depression symptoms among university students under covid-19 restrictions – the mediating role of stress and the moderating role of resilience. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18(23): 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312752>
- Liu Y, Zhang L, Wang X, Wang Z, Zhang J, Jiang R, *et al.* Similar Fecal Microbiota Signatures in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and Patients With Depression. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*. 2018; 14(11): 1602–1611. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.033>. This
- Liu Z, Liu R, Zhang Y, Zhang R, Liang L, Wang Y, *et al.* Latent class analysis of depression and anxiety among medical students during COVID-19 epidemic. *BMC Psychiatry*. 2021; 21(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12888-021-03459-w>
- Lukeš J, Stensvold CR, Jirků-Pomajbíková K & Wegener Parfrey L. Are Human Intestinal Eukaryotes Beneficial or Commensals? *PLOS Pathogens*. 2015; 11(8): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005039>

- Luna D, García-Reyes S, Soria-González EA, Avila-Rojas M, Ramírez-Molina V, García-Hernández B, *et al.* Estrés académico en estudiantes de odontología: asociación con apoyo social, pensamiento positivo y bienestar psicológico. *Investigación En Educación Médica.* 2020; 9(35): 8–17. <https://doi.org/10.22201/FACMED.20075057E.2020.35.20205>
- Luque Vilca OM, Bolivar Espinoza N, Achahui Ugarte VE, & Gallegos Ramos JR. Estrés académico en estudiantes universitarios frente a la educación virtual asociada al COVID-19. *Puriq.* 2021; 4(1): 56–65. <https://doi.org/10.37073/puriq.4.1.200>
- Malhi GS, & Mann JJ. Depression. In *The Lancet.* 2018; 392(10161): 2299–2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
- Martin CR & Mayer EA. Gut-Brain Axis and Behavior. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series.* 2017; 88: 45–53. <https://doi.org/10.1159/000461732>
- Martínez-Martínez M del C, Muñoz-Zurita G, Rojas-Valderrama K & Sánchez-Hernández JA. Prevalencia de síntomas depresivos en estudiantes de la licenciatura en Medicina de Puebla, México. *Atención Familiar.* 2016; 23(4): 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.af.2016.10.004>
- McEwen BS. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress.* 2017; 1: 1–11. <https://doi.org/10.1177/2470547017692328>
- Meda N, Pardini S, Slongo I, Bodini L, Zordan MA, Rigobello P, *et al.* Students' mental health problems before, during, and after COVID-19 lockdown in Italy. *Journal of Psychiatric Research.* 2021; 134(12): 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.12.045>
- Miller AH, Maletic V & Raison CL. La inflamación y sus desencantos: papel de las citocinas en la fisiopatología de la depresión mayor. *Psiquiatría Biológica.* 2010; 17(2): 71–80. <https://doi.org/10.1016/J.PSIQ.2010.04.001>
- Mirza AA, Baig M, Beyari GM, Halawani MA & Mirza AA Depression and anxiety among medical students: A brief overview. In *Advances in Medical Education and Practice.* 2021; 12: 393–398. <https://doi.org/10.2147/AMEP.S302897>
- Morais LH, Schreiber HL & Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology.* 2021; 19(4): 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Nakhostin-Ansari A, Sherafati A, Aghajani F, Khonji MS, Aghajani R & Shahmansouri N. Depression and anxiety among iranian medical students during COVID-19 pandemic. *Iranian Journal of Psychiatry.* 2020; 15(3): 228–235. <https://doi.org/10.18502/ijps.v15i3.3815>
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, *et al.* Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology and Motility.* 2014; 26(8): 1155–1162. <https://doi.org/10.1111/nmo.12378>
- Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Laforest-Lapointe I, Reynolds LA, Brown EM, Valdez-Salazar A, *et al.* Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist Blastocystis Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *MSystems.* 2018; 3(3): 1–18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00007-18>
- Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, *et al.* Blastocystis Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. *PLoS ONE.* 2014; 9(11): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111868>
- OMS. *Depresión.* 2021. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- OMS. *COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide.* 2022. <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide>
- Pérez MR, Yáñez CM, Hernández AM, Sustaita JJD, Jiménez EG, Andrade MR, *et al.* Blastocystis infection frequency and subtype distribution in university students. *Heliyon.* 2020; 6(12): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05729>
- Puig Lagunes ÁA, Vargas Álvarez JE, Salinas Méndez LE, Ricaño Santos KA & Puig Nolasco Á. Prevalencia de depresión, ansiedad y estrés académico entre estudiantes de medicina, durante distintos periodos de estrés. *Atención Familiar.* 2020 27(4): 165–171. <https://doi.org/10.22201/fm.14058871p.2020.4.76891>

- Rao R, & Androulakis IP. The physiological significance of the circadian dynamics of the HPA axis: interplay between circadian rhythms, allostasis and stress resilience. *Hormones and Behavior*. 2019; 110: 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.018>
- Salvador F, Lobo B, Goterris L, Alonso-Cotoner C, Santos J, Sulleir E, *et al.* Blastocystis sp. Carriage and irritable bowel syndrome: Is the association already established? *Biology*. 2021; 10(4): 1–8. <https://doi.org/10.3390/biology10040340>
- Scanlan PD & Stensvold CR. Blastocystis: getting to grips with our guileful guest. *Trends in Parasitology*. 2013; 29(11): 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.08.006>
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 326–330. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>
- Skotarczak B. Genetic diversity and pathogenicity of Blastocystis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2018; 25(3): 411–416. <https://doi.org/10.26444/aaem/81315>
- Socała K, Doboszevska U, Szopa A, Serefko A, Włodarczyk M, Zielińska A, *et al.* The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*. 2021; 172(5): 1–38. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105840>
- Stensvold CR & Clark CG. Current status of Blastocystis: A personal view. *Parasitology International*. 2016; 65(6): 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold CR, Sørland BA, Berg RPKD, Andersen LO, van der Giezen M, Bowtell JL, *et al.* Stool Microbiota Diversity Analysis of Blastocystis-Positive and Blastocystis-Negative Individuals. *Microorganisms*. 2022; 10(2): 1–6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020326>
- Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, Lima-Mendez G, Wang J, Vieira-Silva S, *et al.* Population-level analysis of Blastocystis subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*. 2019; 68(7): 1180–1189. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>
- Torrades S. Estrés y burn out. *Offarm: Farmacia y Sociedad*. 2007; 26(10): 104–107.
- Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, *et al.* Blastocystis hominis and Dientamoeba fragilis in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitology Research*. 2010; 107(3): 679–684. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1918-7>
- Yan S, Ma Z, Jiao M, Wang Y, Li A, & Ding S. Effects of Smoking on Inflammatory Markers in a Healthy Population as Analyzed via the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11(7): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.633242>
- Zhang Y, Fan Q, Hou Y, Zhang X, Yin Z, Cai X, *et al.* Bacteroides species differentially modulate depression-like behavior via gut-brain metabolic signaling. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2022; 102: 11–22.

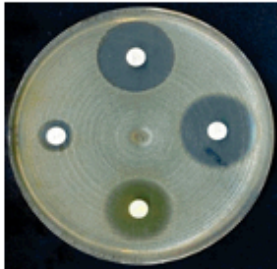
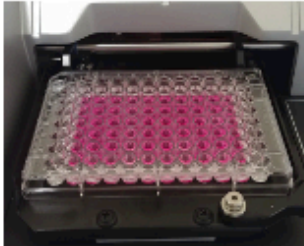
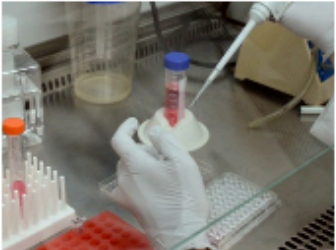
Cuerpo académico UJE- CA- 134 Química y Tecnología de Productos Alimenticios

LGAC: Tecnología de Alimentos y subproductos

Nombre proyecto	Investigador responsable
Contenido de licopeno en tomate orgánico y con fertilización química.	Guadalupe Candelas Cadillo 
Propiedades funcionales y reológicas de sábila (<i>Aloe vera barbadensis</i> Miller) fresca y deshidratada.	
Evaluación del impacto de las condiciones agroclimáticas de la región sobre los compuestos bioactivos de Aloe vera y su funcionalidad	María de Los Ángeles Sáenz Esqueda 
Aplicación de la tecnología de ultrasonido de potencia al procesamiento y desarrollo de productos alimenticios y farmacéuticos	
Revalorización de subproductos agroindustriales para la recuperación de compuestos con interés para la industria farmacéutica y de alimentos	
Efecto de la temperatura y la velocidad de alimentación del secado por aspersión 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  
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	

Cuerpo Académico UJE-CA-125 Bacteriología médica diagnóstica y salud pública

LGAC: Factores de virulencia y drogasensibilidad de las enfermedades infecciosas y salud pública

Nombre del proyecto	Investigador responsable	
Brucelosis	Dra. Aurora Martínez Romero	
Tuberculosis		
Leucemia		
Encapsulamiento de fármacos	Dra. Sandra Hernández Hernández	
Análisis de los mecanismos de patogenicidad, tratamiento y diagnóstico de COVID-19 por SARS-COV-2		
Análisis de los factores de crecimiento obtenido de plasma rico en plaquetas y fibrina rica en plaquetas con leucocitos	Dr. José de Jesús Alba Romero	
Mecanismos de regeneración celular y mecanismos bactericidas en bacterias de importancia clínica		
		

Problema de Nomenclatura de Reactivos Químicos

¹Sierra 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

Completa la siguiente tabla utilizando la nomenclatura IUPAC y Stock según se requiera.

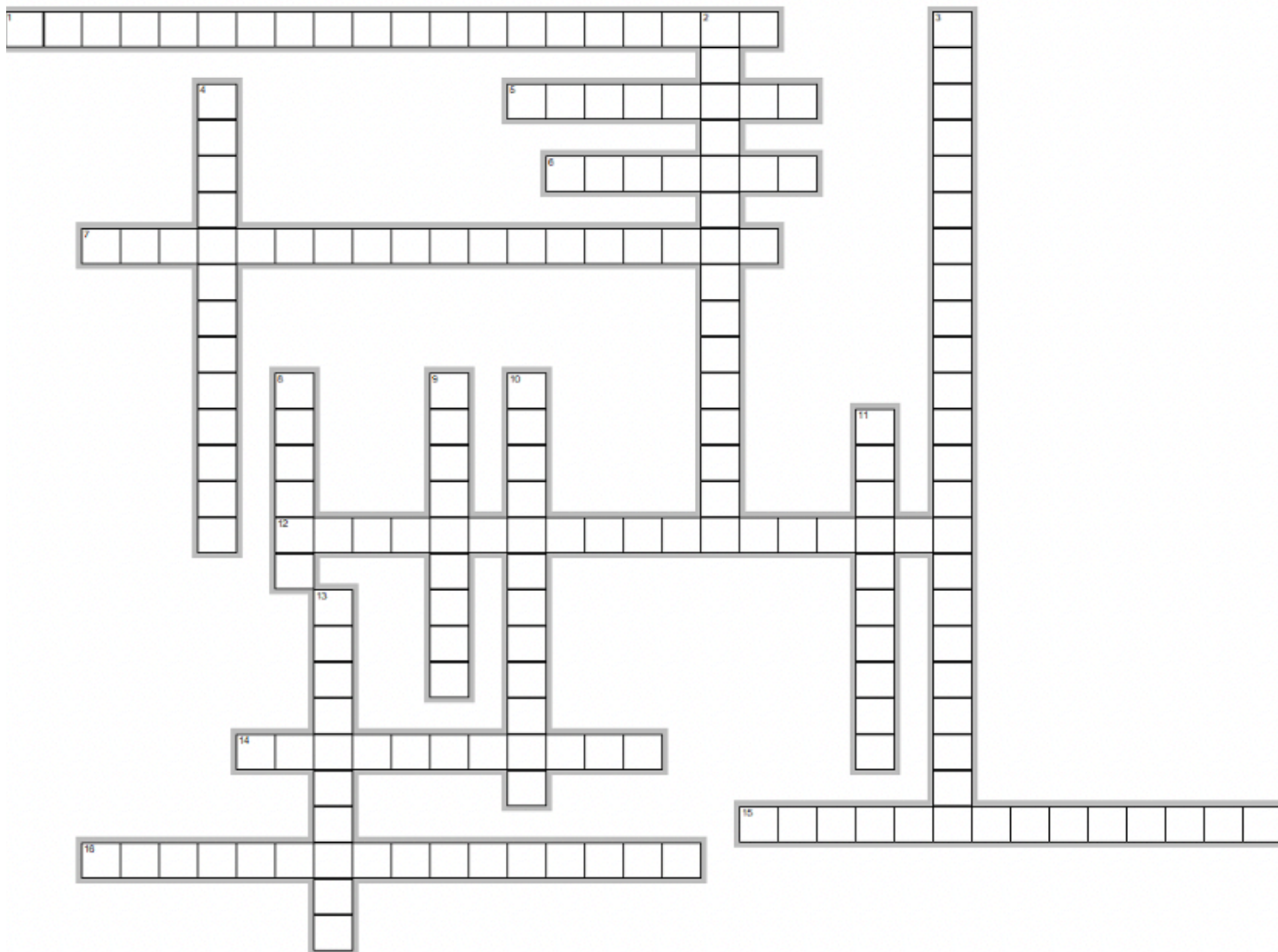
COMPUESTO	CLASIFICACIÓN	NOMENCLATURA IUPAC	NOMENCLATURA STOCK
			Óxido de Hierro (III)
Al(OH) ₃	Hidróxido		
		Óxido estáñico	
Br ₂ O ₅			
			Cloruro de Niquel (III)
		Anhídrido hipocloroso	
HBrO ₃			
		Clorato de sodio	
			Sulfato de plomo (IV)
Fe SO ₄			
	Óxido no metálico	Anhídrido perbrómico	
			Hipoyodito de cromo (III)
KIO ₄			
		Selenuro de calcio	
		Fosfito de aluminio	
K ₂ O	Óxido metálico		
			Óxido de oro (III)
Co ₂ O ₃			
		Ácido selenhídrico	
		Anhídrido hipoyodoso	
H ₂ SO ₃			
			Cloruro de oro (I)
HgCrO ₄			

Crucigrama de Diseño de Fármacos

¹Sierra 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



dispaCrossword.com

Vertical

0. Permite filtrar series de compuestos, para seleccionar un subconjunto de moléculas que se sometan a ensayos biológicos
1. Moléculas orgánicas que aceleran la velocidad de reacción sin afectar el equilibrio de la misma
2. Sustancia inorgánica u orgánica que no participa en la reacción química, pero aumenta la velocidad de una reacción
4. Herramienta computacional que modela, imita y predice el comportamiento de moléculas y su interacción con otras.
5. optimiza la actividad biológica de compuestos activos, analiza series de compuestos, identifica estructura similar pero con actividades diferentes
6. Detección automatizada que involucro el arreglo tridimensional, impedimento estérico y electrónico, para asegurar interacciones con un blanco farmacológico

Horizontal

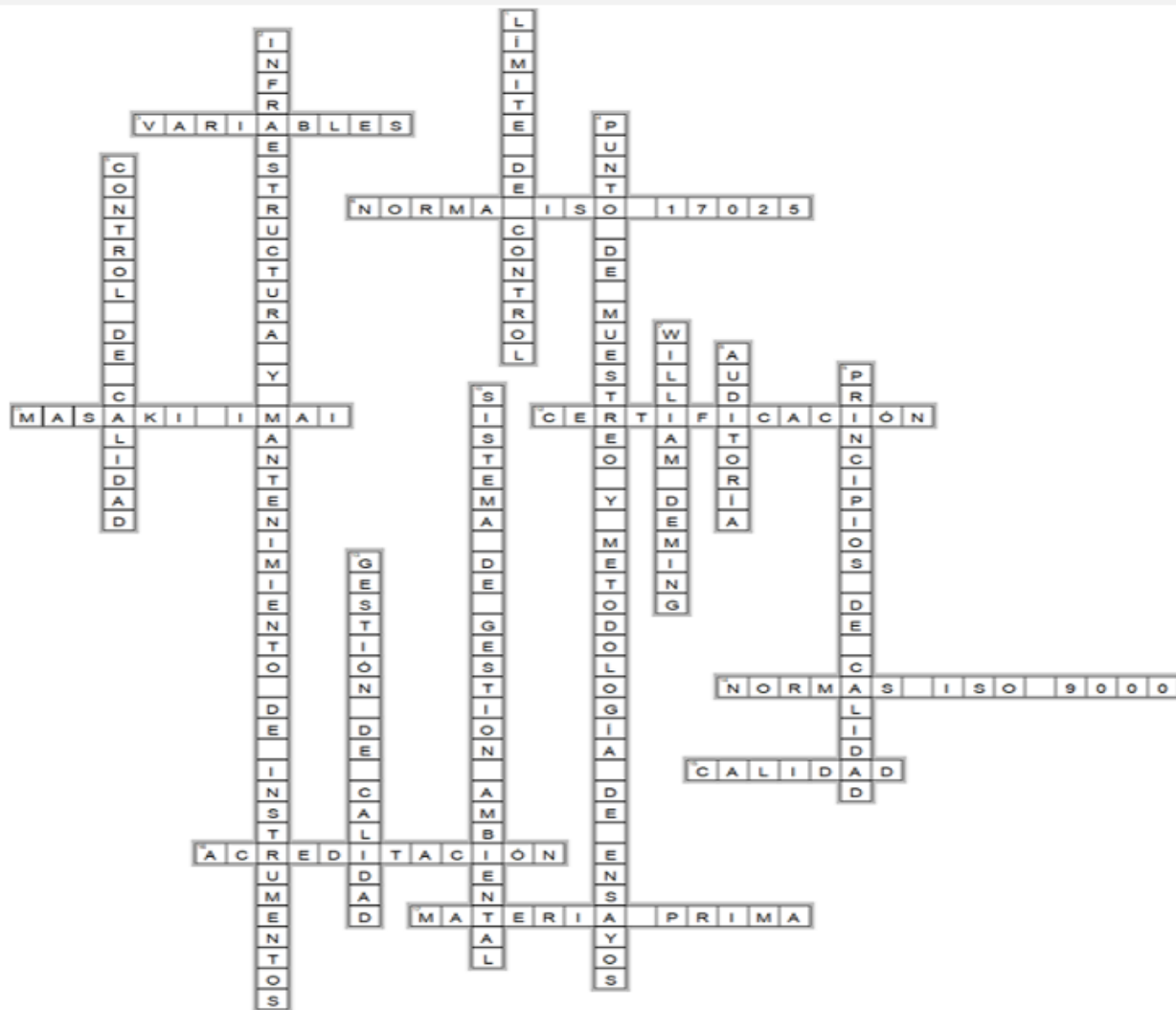
1. Disposición en el espacio de las moléculas de proteína que provienen de la secuencia de aminoácidos que la conforman
2. Uno de los métodos de obtención de fármacos
3. Permite el hallazgo de moléculas mediante técnicas de ingeniería genética
4. Principio activo proveniente de planta que es efectivo para el tratamiento del corazón
5. molécula proveniente de plantas que ayuda contra la migraña
6. principio activo procedente del árbol *Taxus brevifolia*, cuya función es antitumoral
7. Identifica compuestos activos en bases de datos moleculares, encuentra blancos moleculares y propone usos terapéuticos alternos para fármacos aprobados
8. Compuesto obtenido de plantas, microorganismos u hongos que tiene efecto sobre una biomolécula.
9. Metodología para encontrar compuestos con acción biológica sobre una biomolécula, vía metabólica o patología.
13. Proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción mediante el uso de un catalizador

Respuesta al Crucigrama de virología 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



Horizontales

2. Proceso por el cual un externo autorizado verifica un proceso o servicio de acuerdo a requisitos especificados
6. Conformado por la planeación, el hacer, la verificación y la mejora continua
7. Se desarrollan en conjunto con el área de producción y se encuentran en el plan de inspección
8. Enfoque al cliente, liderazgo, compromiso con las personas, enfoque en los procesos, mejora continua, toma de decisiones basadas en evidencias, gestión de las relaciones.
11. Valores guía usados para controlar una etapa del proceso a fin de lograr una mayor eficiencia y eficacia
12. La normativa ISO 140001 ayuda a identificar, prevenir y controlar los impactos al medio ambiente que generan las actividades, servicios y productos que elaboran las organizaciones mediante un Estadístico estadounidense asociado con el desarrollo y crecimiento de Japón después de la segunda guerra mundial y autor de Out of crisis
16. Se maneja conforme primeras entradas primeras salidas (PEPS)
17. Grado en el que un producto o servicio cumple con las especificaciones de diseño o expectativas del cliente.

Verticales

1. Las actividades se plasman en procedimientos e instructivos
3. Proceso de revisión y/o validación del cumplimiento de una actividad según lo planeado y las directrices establecidas
4. Padre y fundador del método Kaizen conocido como la mejora continua
5. Procedimiento por el cual un organismo autorizado otorga un reconocimiento formal de que un organismo, máquina o persona es competente para cumplir una tarea específica
9. Conjunto de mecanismos, acciones y herramientas utilizadas para detectar errores en el proceso de elaboración de un producto o en la prestación de un servicio
10. Proporciona los requisitos necesarios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para armonizar los criterios de calidad.
14. Conjunto de normas que establecen estándares internacionales en la gestión de calidad.
15. Parámetros a evaluar en cada etapa a fin de medir su desempeño

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 acuosa de un soluto no volátil tiene un punto de ebullición igual a 100.204°C. Determinar la molalidad de la solución.

El punto de ebullición es una propiedad coligativa de las disoluciones. Para conocer la concentración molal de una disolución se requiere de una constante ebulloscópica (K_e). Para resolver la pregunta anterior se tienen las siguientes fórmulas:

$$P_e = T_e \text{ solvente puro} + \Delta T_c$$

Dónde:

P_e = Punto de ebullición

T_e = Temperatura de ebullición del solvente puro

ΔT_c = Cambio o variación de temperatura

Con esta fórmula, despejamos la variación de temperatura:

$$\Delta T_c = P_e - T \text{ solvente puro; y sustituyendo tenemos:}$$

$$\Delta T_c = 100.204^\circ\text{C} - 100^\circ\text{C} = 0.204^\circ\text{C}$$

Con este valor se sustituye en la siguiente fórmula para obtener la concentración molal.

$$\Delta T_c = K_e * C_m$$

Dónde:

ΔT_c = Cambio o variación de temperatura

K_e = Constante de ebulloscópica ($^\circ\text{C}/m$)

C_m = Concentración molal

Al despejar C_m y sustituir los valores en la fórmula, obtenemos:

$$C_m = \Delta T_c / K_e$$

$$C_m = 0.204^\circ\text{C} / (0.512^\circ\text{C}/m) = \underline{\underline{0.3984 \text{ molal}}}$$





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