REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED

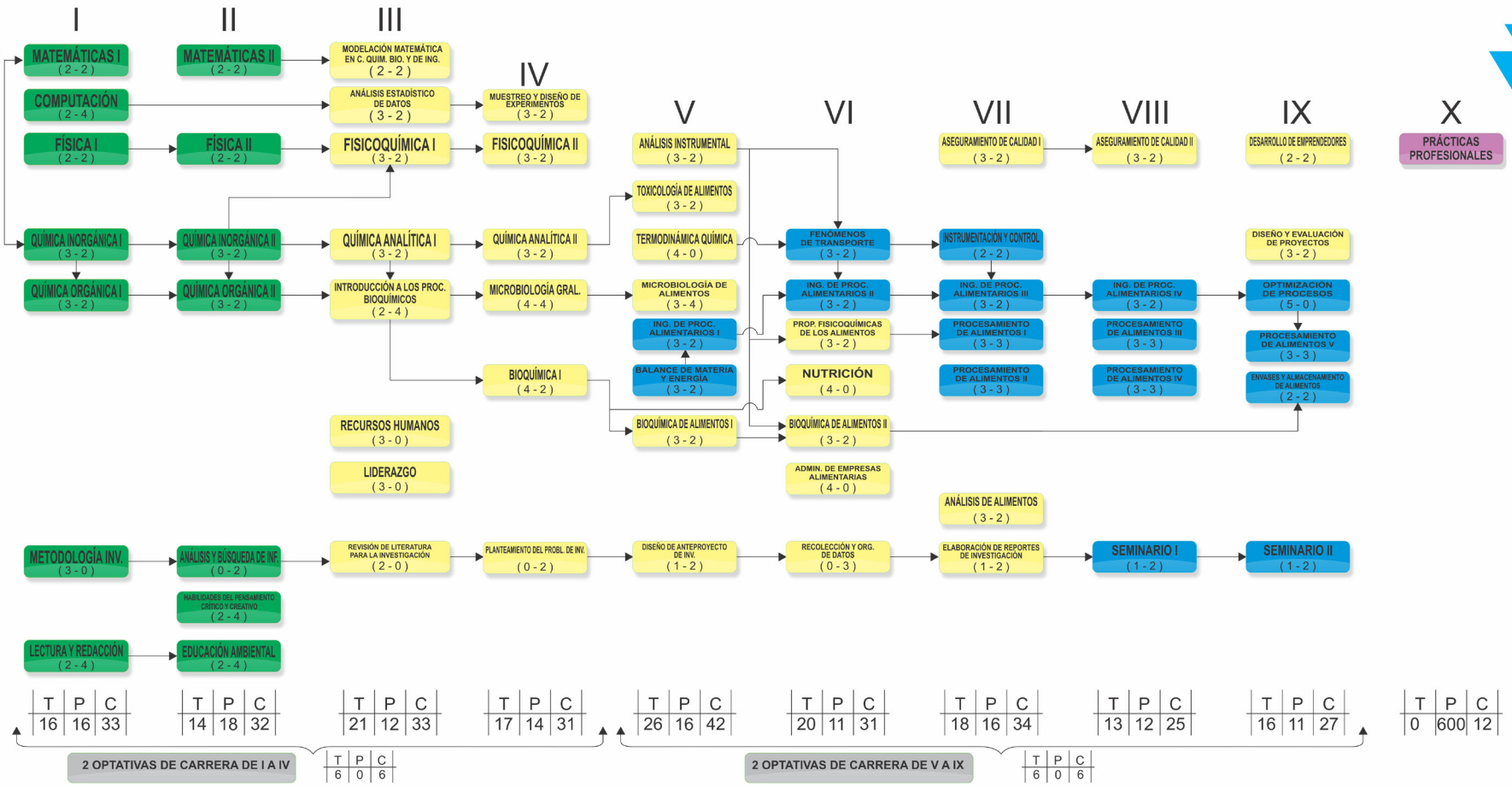
Volumen 2
Número 11
Mayo 2020
ISSN: 2594-1445

UJED
Universidad Juárez del Estado de Durango

INGENIERÍA QUÍMICA EN ALIMENTOS

MAPA CURRICULAR

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS UJED



FORMACIÓN INTEGRAL

ARTE CULTURA Y DEPORTE | FORMACIÓN INTELECTUAL | ACTIVIDADES DE VINCULACIÓN 8 CRÉDITOS. | SERVICIO SOCIAL 10 CRÉDITOS. | PRACTICAS PROF. 12 CRÉDITOS. EXP. RECEP. 4 CRÉDITOS.

ÁREA BÁSICA | ÁREA DISCIPLINAL | EJERCICIO PROFESIONAL | OPTATIVAS | EJE TRANSVERSAL

REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

CINTILLO LEGAL

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 6 No. 10 (Mayo-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, simposiumfcqujed@gmail.com.

Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana. Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN 2594-1445, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 31 de octubre de 2019.

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

Carlos Regalado González
Biotecnología de Alimentos; Universidad Autónoma de Querétaro

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
Juan José Martínez García

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**

Uso confuso de la ecuación de primer orden y sus unidades en la determinación de la actividad de la catalasa. 02

Valdez-Solana M.A., Martínez-Martínez A.L., Ocampo-López A., Téllez-Valencia A., Avitia-Domínguez C., *Sierra-Campos E.

Análisis in silico y filogenia de la proteína HSP20 del patógeno oral humano Centipeta periodontii 10

*Martínez Ignacio y Castro-Manrreza Marta Elena.

QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA **21**

Oligosacáridos con fines terapéuticos: Presente, usos y alcances 22

Therapeutic oligosaccharides: Present, uses and scope

Olicón-Hernández Dario Rafael, Guerra-Sánchez Guadalupe, *Pardo Juan Pablo

Efecto de la harina obtenida de la semilla de yaca (Artocarpus heterophyllus) sobre cáncer cervicouterino 34

Trejo-Rodríguez Ibna Suli, Alcántara-Quintana Luz Eugenia, Algara-Suárez Paola, Grajales-Lagunes Alicia

CIENCIAS BIOMÉDICAS **43**

Polimorfismos como biomarcadores de cáncer cervicouterino 44

Omar Medina-de la Cruz, Edgar Villegas-Hinojosa, *Verónica Gallegos García

MICROBIOLOGÍA **55**

Búsqueda intencionada de β-lactamasas de espectro extendido en cepas de Escherichia coli de muestras diarréicas 56

Díaz-González Yuritzi del Pilar, Orona-Martínez Diana Cristina, González-Yañez María Guadalupe Ernestina, Castro-Barraza Fernando, García-Luján Concepción

Editorial

Bioseguridad, ¿Estoy seguro?

En muchas actividades académicas, de investigación básica, médicas, industriales y alimentarias, se manejan muestras biológicas procedentes ya sea de pacientes, de animales, o de cultivos de agentes patógenos. El conocer las medidas adecuadas de prevención, contención y mitigación ayuda a establecer los procedimientos que se realizaran en cada una de estas actividades. Cuando hay de por medio el manejo de un agente biológico o patógeno peligroso, o un organismo genéticamente modificado este tema entra en el contexto de la Bioseguridad y la gestión de riesgos biológicos.

La bioseguridad se define como las recomendaciones, procedimientos, normas, y buenas prácticas para trabajar con agentes biológicos peligrosos. El objetivo principal es salvaguardar la salud de las personas que trabajan directamente con agentes biológicos y de la población en general, así como minimizar los posibles daños al medio ambiente. Si estoy seguro yo, están seguros mis compañeros. La Bioseguridad involucra realizar adecuadamente los procedimientos, usar el equipo de protección, cuidar las instalaciones, disponer correctamente los residuos o desechos generados, etc. Además, en el área de investigación es importante el planteamiento adecuado de los proyectos, que requiere de elaborar un análisis de riesgo previo al inicio del protocolo, en el que se considere el agente que se va a trabajar, los diferentes pasos del protocolo, los posibles peligros inherentes y las condiciones de trabajo. Es muy importante elaborar manuales de procedimientos específicos para cada institución y para cada laboratorio, que se ajusten a las actividades y circunstancias locales, e incluir las hojas de seguridad (de agentes biológicos y químicos) para el mejor desempeño de las actividades, así como la respuesta ante incidencias y emergencias.

La aparición de infecciones por agentes epidémicos, hacen más evidente la importancia de que pequeños procedimientos como el lavado de manos o el estornudo de etiqueta, por ejemplo, son de gran ayuda para mitigar la dispersión, y nos hacen más conscientes de los procedimientos para nuestra propia protección y la de los demás. La misión de la bioseguridad es apoyar, guiar y fortalecer los protocolos de trabajo e investigación, de ayudar a proponer soluciones a los incidentes o procedimientos inadecuados, y sobre todo trabajar por hacer de la bioseguridad un estilo de vida que llegue a formar parte de la cultura laboral y social.

M. en C. Guillermo Perales Ortíz

Investigador en Ciencias Médicas, Instituto Nacional de Salud Pública

y miembro de la Asociación Mexicana de Bioseguridad

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

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PERFIL DE INGRESO

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

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

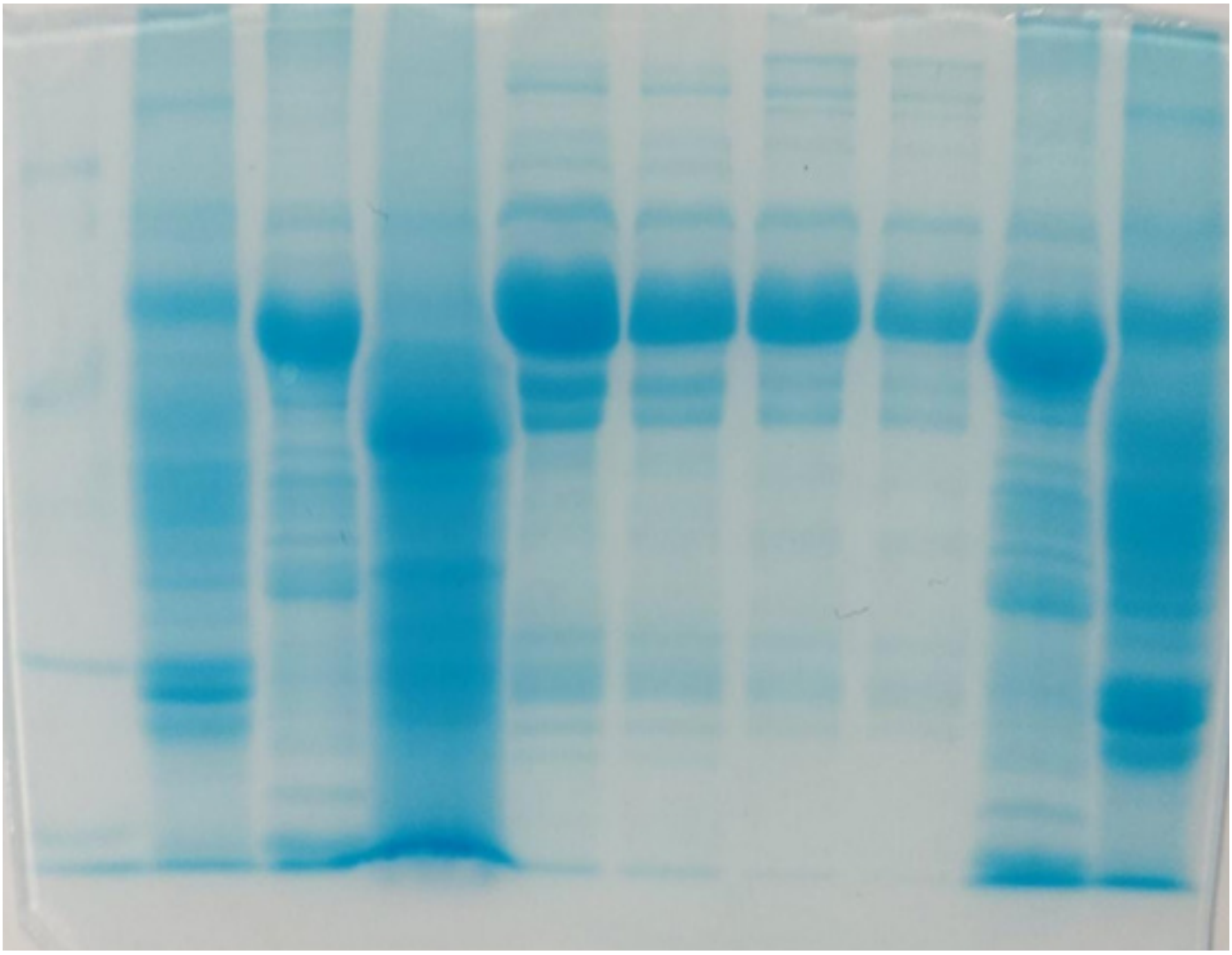
Ser responsable, perseverante, propositivo y tener interés por el mejoramiento sociocultural y económico.

PERFIL DE EGRESO

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

BIOQUÍMICA

(Bioenergética, proteínas, metabolismo, productos bioactivos)



"La violencia es el último recurso del incompetente"
Isaac Asimov (1920-1992): escritor estadounidense

Uso confuso de la ecuación de primer orden y sus unidades en la determinación de la actividad de la catalasa.

[1]Valdez-Solana M.A., [1]Martínez-Martínez A.L., [1]Ocampo-López A.,
[2]Téllez-Valencia A., [2]Avitia-Domínguez C., [1]*Sierra-Campos E.

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

2Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango Campus Durango, Avenida Universidad y Fanny Anitúa S/N, 34000 Durango, México.

*Email: ericksier@gmail.com

RESUMEN

La actividad de una enzima se realiza en función de la velocidad de la reacción. Posteriormente, los resultados deben ser transformados en actividad en base a transformar las absorbancias en unidades de concentración de desaparición de sustrato o aparición de producto con respecto al tiempo, y finalmente los resultados se pueden reportar en unidades de actividad. En este contexto, este estudio pretende explicar el uso correcto de una ecuación de primer orden para la determinación de la actividad de la catalasa. La metodología colorimétrica de cobalto-carbonato se empleó para realizar tanto análisis de curso temporal como ensayos de punto final. Mediante la función W de Lambert los parámetros cinéticos fueron Km (constante de afinidad) = 7.88 mM, una Velocidad máxima (Vmax) = 2.41 mM/min, y una constante K = 0.3 min^{-1}. Sin embargo, al emplear la ecuación de primer orden para la reacción de la catalasa fue k = 0.244 min^{-1} y la actividad fue de 32.39 mM/min y su Km calculada = 132.74 mM.

Palabras clave: Catalasa, actividad enzimática, cinética.

ABSTRACT

The activity of an enzyme is performed depending on the speed of the reaction. Subsequently, the results must be transformed into activity based on transforming the absorbance in concentration units of disappearance of substrate or appearance of product with respect to time, and finally the results can be reported in units of activity. In this context, this study aims to explain the correct use of a first order equation for the determination of catalase activity. The cobalt-carbonate colorimetric methodology was used to perform both time course analysis and end point tests. Using the Lambert W function, the kinetic parameters were Km (affinity constant) = 7.88 mM, a maximum velocity (Vmax) = 2.41 mM/min, and a constant K = 0.3 min^{-1}. However, when using the first order equation for the catalase reaction it was k = 0.244 min^{-1} and the activity was 32.39 mM/min and its calculated Km = 132.74 mM.

Keywords: Catalase, Enzymatic activity, Kinetic.

INTRODUCCIÓN

La cinética enzimática es el estudio de la velocidad de las reacciones químicas y es importante por dos razones principales. Primero, nos ayuda a explicar cómo las enzimas trabajan y segundo, ayuda a predecir como las enzimas se regulan dentro de las células. Además, permite conocer como los inhibidores (potenciales fármacos) pueden bloquear o disminuir la actividad enzimática de proteínas clave del metabolismo en bacterias, parásitos o células malignas.

Para estudiar la actividad de una enzima se debe medir los cambios en la concentración del sustrato o del producto con respecto al tiempo, los cuales permitirán calcular la velocidad de la reacción enzimática. Para cumplir este objetivo, los métodos espectrofotométricos son muy convenientes para determinar la velocidad de reacción de manera continua como una curva progreso (parcial o total) o para realizar ensayos de punto final después de un periodo de incubación y su comparación con su respectivo blanco. Sin embargo, ambos enfoques representan un reto para los estudiantes debido al análisis matemático posterior de los valores de absorbancia y el uso del coeficiente de extinción molar mediante la ecuación de Lambert y Beer. Además, la ecuación de Michaelis-Menten es la expresión matemática básica de la cinética enzimática para analizar la velocidad de la reacción y su eficiencia catalítica.

$$v = \frac{Vmax * [S]}{Km + [S]} \quad (ecuación\ 1)$$

Donde; *Km* es la contante de Michaelis y representa la afinidad de la enzima por su sustrato; *Vmax* es la velocidad máxima de formación de producto y *[S]* es la concentración molar de sustrato.

A bajas concentraciones de *[S]*, la *Km* >> *[S]* y el termino del *[S]* en el denominador de la ecuación anterior se transforma de la siguiente manera;

$$v = \frac{Vmax}{Km} * [S] = k * [S] \quad (ecuación\ 2)$$

Mientras que a altas concentraciones de *[S]*, la *Km* << *[S]* y el termino de *Km* en el denominador de la ecuación de Michaelis-Menten se transforma de la siguiente forma;

$$v = \frac{Vmax * [S]}{[S]} = Vmax \quad (ecuación\ 3)$$

Por tanto, las enzimas suelen medirse en condiciones saturantes de sustrato en los ensayos de punto final bajo una condición de *Vmax*. Sin embargo, existen algunas enzimas que tienen una cinética compleja en las cuales no se recomienda utilizar directamente la última ecuación debido a que estas enzimas no son saturables por sustrato, por ejemplo, la catalasa (Aebi H, 1984).

La catalasa es una enzima compleja que dismuta el peróxido de hidrógeno (H2O2) en oxígeno molecular (O2) y agua con múltiples aplicaciones biológicas, biomédicas y biotecnológicas. Por tal razón existen una gran variedad de métWodos para medir su actividad y es un buen ejemplo para enseñar a los estudiantes los conceptos de la cinética.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2a$$

El estudio de la catalasa ocurre de diversas formas, cualitativamente la detección de la presencia de la catalasa por la liberación de O_2 se utiliza en microbiología para diferenciar los cultivos entre los géneros de S*treptococcus* y S*taphylococcus*, principalmente. De forma cuantitativa, el método espectrofotométrico al medir la desaparición del peróxido a 240 nm es muy empleado por su simpleza. Sin embargo, moléculas tales como las proteínas o el material genético que se encuentran presentes en la muestra biológica pueden absorber a esta longitud de onda. Además, se requiere que el analista trabaje rápida y metódicamente ya que la forma en que se mezclan los reactivos de la reacción y el tiempo en el que se introduce la celda de cuarzo al equipo pueden generar errores sistemáticos muy importantes, debido a la alta velocidad de la reacción y a la acumulación de burbujas de oxígeno. Otro método menos utilizado es la detección de la formación de oxigeno con el electrodo tipo Clarck (Kroll, 1989). Métodos volumétricos como el permanganométrico (Garzón de la Mora, 2002), el iodométrico (Setlow, 1951); y métodos colorimétricos con 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Johansson y Borg, 1988). Recientemente, Hadwan MH y cols., reportaron diversos ensayos colorimétricos que se basan en la reacción del peróxido de hidrógeno residual no descompuesto por la muestra (catalasa) con molibdato de amonio (2015), con metavanadato de amonio (2018) y con cobalto-bicarbonato (2018a). Por tanto, este estudio pretende facilitar la comprensión de la cinética enzimática con el uso de la catalasa por el ensayo con cobalto-bicarbonato y como se debe realizar el análisis de los datos adecuadamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y estándares

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Solución A de cloruro de cobalto hexahidratado 156 mM; solución B de sales de Graham 16 mM; solución C de bicarbonato de sodio 2.14 M; regulador de fosfatos 50 mM pH 7.0 preparado con KH_2PO_4 y Na_2HPO_4; Solución de peróxido de hidrógeno 10 mM; Solución de trabajo: mezcla de la solución A, B y C en la proporción de 1:1:18.

Obtención de la muestra

El hígado fue homogenizado en 20 mM de Tris-HCl, 200 mM de manitol, 50 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 1mM de Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), 1 pastilla de cocktail inhibidor de proteasas (AEBSF at 104 mM, Aprotinin at 80 µM, Bestatin at 4 mM, E-64 at 1.4 mM, Leupeptin at 2 mM and Pepstatin A at 1.5 mM), 0.1% de BSA, pH 7.4. Los restos celulares y nucleares fueron removidos en el pellet al centrifugar a 3,500 rpm durante 10 min a 4ºC.

Cuantificación de H_2O_2 por el método de cobalto

El procedimiento fue realizado de acuerdo con Hadwan MH y cols., (2018) con ligeras modificaciones;

Reactivos:

A) La solución de cobalto (II) se preparó al disolver 2.03 g de $Co(Cl)_2 \cdot 6H_2O$ en 100 mL de agua destilada.

B) Se preparó una solución de hexametafosfato de sodio (sal de Graham) al disolver 1.0 g de $(NaPO_3)_6$ en 100 mL de agua destilada.

C) La solución de bicarbonato de sodio se preparó al disolver 9.0 g en 100 mL de agua doblemente destilada.

Solución de trabajo: Se mezcló la solución de cobalto (A) con la solución de Graham (B) y con la solución de bicarbonato (C) en ese orden en una proporción de 1:1:18, (el orden en que se agregan estas sustancias es muy importante para obtener resultados precisos). Se ajustaron los volúmenes de la solución de trabajo de acuerdo con los requerimientos del experimento preparándola en fresco.

Solución de trabajo	5 mL	10 mL	20 mL
A (Cobalto)	250 µL	500 µL	1 mL
B (Sal de Graham)	250 µL	500 µL	1 mL
C (Bicarbonato de sodio)	4.5 mL	9 mL	18 mL

D) El buffer de fosfatos (pH 7,0, 50 mM) se preparó mezclando las siguientes soluciones (a & b) en una proporción de 1:1.5 [(a) Se disolvieron 6,81 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua doblemente destilada y (b) 8,90 g de Na_2HPO_4*$2H_2O$ se disolvieron en 1 L de agua doblemente destilada].

E) Se preparó peróxido de hidrógeno (10 mM) de un stock previamente preparado a 100 mM disolviendo en agua desionizada.

Se realizó la curva de calibración en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en el rango de 0-10 mM colocando primero los µl de agua correspondientes a cada tubo, posteriormente se agrega el H_2O_2 y se mezcla. Después de 2 minutos de incubación se midió la absorbencia a una longitud de onda de 440 nm en el espectrofotómetro. Se utilizaron dos blancos de reactivos, uno con 8 mM de peróxido y muestra (máxima absorbencia del cobalto) y el otro sin peróxido (mínima absorbencia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recientemente se reportó el uso de sales de cobalto o de vanadio para medir la actividad de la catalasa de una gran diversidad de muestras WWWWbiológicas mediante métodos espectrofotométricos en la región del visible (Hadwan MH y cols., 2018; 2018a). Esta es una ventaja para evitar las posibles interferencias que presentan diversos componentes biológicos o sustancias

Tabla1.- Valores de absorbencia para diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

$[H_2O_2]$ (mM)	Absorbancia 440 nm
0.5	0.030
1	0.052
3	0.135
5	0.229
8	0.336
10	0.402

Tabla 2.- Tabla de soluciones para preparar la curva estándar por el método de cobalto.

Tubo	Volumen de H_2O (µL)	Volumen de H_2O_2 (µL)	Volumen Solución de trabajo (µL)	Volumen de la muestra (µL)	Tiempo de incubación (min)	Absorbancia a 440 nm
Blanco 1	30	120	600	0	2-5	0.238
Blanco 2	148	0		2		0
1	28	120			1	0.185
2					1.5	0.142
3					3	0.121
4					4	0.101
5					5	0.061

de los medios de reacción en la región del ultravioleta. Por tanto, se decidió utilizar el método con cobalto para estandarizar el ensayo en microcelda.

Inicialmente se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y posteriormente se incubaron con la mezcla de trabajo por 5 minutos antes de realizar la lectura de la absorbancia a 440 nm (Tabla 1).

Posteriormente se graficaron los datos de la tabla anterior y se ajustaron a la ecuación de una línea recta (Figura 1). La R^2 fue 0.998 y la ecuación de la línea de tendencia fue y = 0.0395 * x + 0.0158, es importante mencionar que, al utilizar concentraciones mayores de 10 mM, la linealidad de la curva se pierde debido a que las lecturas de la absorbancia no mantienen la proporcionalidad debido a la saturación de la señal. Por lo cual, se decidió utilizar una concentración cerca a la concentración máxima (8-9 mM como concentración inicial, [S0]) para permitir que todas las lecturas del sustrato residual [Sr] quedaran dentro de la curva estándar. Además, el coeficiente de extinción molar del complejo con cobalto fue 0.0395 $mM^{-1} cm^{-1}$, el cual puede ser empleado para determinar la actividad enzimática.

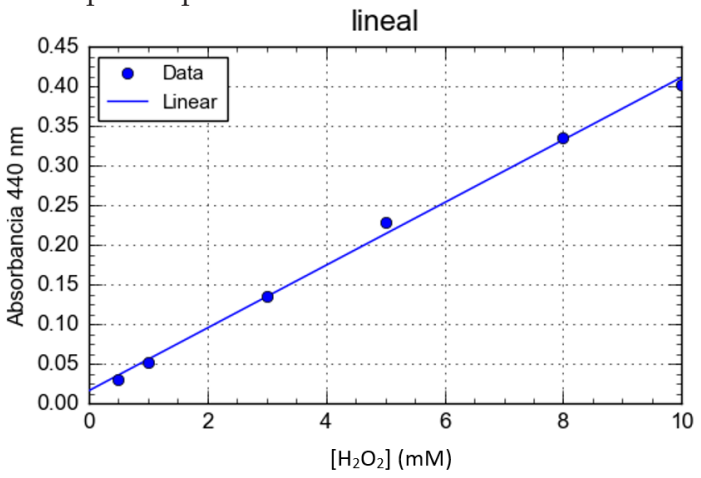


Figura 1. Curva de calibración que muestra la oxidación de Cobalto (II) a Cobalto (III) por la presencia de peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas, dando como producto final un complejo de coordinación colorido. La intensidad del color verde turquesa carbonato cobalto (III) se registró a 440 nm. La ecuación de la línea recta es y = 0.0391x + 0.0198 con una regresión lineal R^2 = 0.998

Otro aspecto importante que se considero fue emplear un pequeño volumen de la muestra (citosol de hígado de rata) de tal manera que nos permita realizar cursos temporales a diferentes tiempos de ensayo al comenzar la reacción de manera simultánea (Tabla 2).

Claramente se observa una correlación negativa entre los valores de absorbancia con respecto al aumento en el tiempo de incubación de la reacción enzimática y este patrón puede ser ajustado por un análisis de curva progreso y se ajustaron los datos a una ecuación de velocidad no linear al emplear la función W de Lambert con el programa CurveExpert profesional (Figura 2). Los parámetros cinéticos aparentes son *Km* (constante de afinidad) = 7.88 mM y una Velocidad máxima (*Vmax*) = 2.41 mM/min.

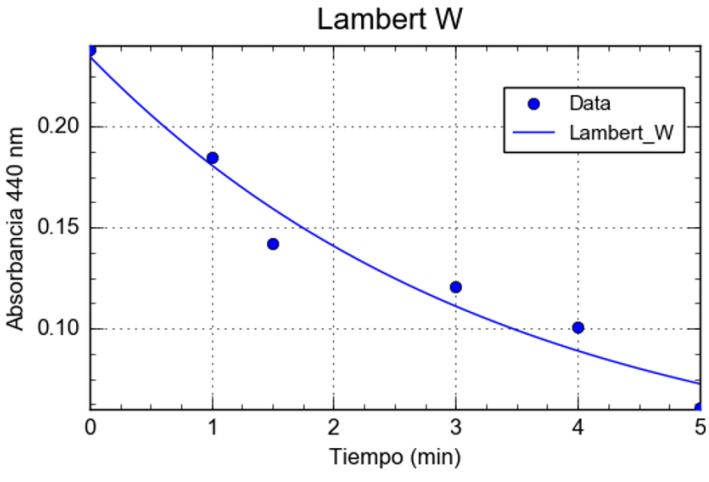


Figura 2. Gráfica de curso temporal donde se muestra la desaparición de sustrato (H_2O_2) por la catalasa con respecto al tiempo, dando un ajuste no lineal que fue analizado por la función W de Lambert.

Con los valores de *Km* y *Vmax* del análisis anterior, es posible calcular la constante de velocidad "k" al emplear la ecuación 2,

k= Vmax/Km= (2.41 mM/min)/7.88 mM= 0.3 min^{-1}

Sin embargo, para realizar el análisis de curvas progreso con la función W de Lambert se requieren ecuaciones polinomiales de segundo y tercer grado para transformar de manera más precisa la absorbancia en actividad enzimática, lo cual limita su uso por los estudiantes.

Es importante mencionar que la catalasa no tiene un mecanismo de un solo sustrato ya que la enzima reacciona con una primera molécula de peróxido de hidrógeno, se oxida y luego se reduce con una segunda molécula de sustrato. Aunque está involucrado un solo sustrato, la existencia de una enzima modificada significa que el mecanismo de la catalasa es en realidad un mecanismo ping pong. Aebi H (1984) ha reportado que la cinética de la catalasa no obedece el patrón típico (Michaelis-Menten), ya que no es posible saturar la enzima con sustrato dentro de un rango de concentración fiable (aproximadamente 5 M de H_2O_2) y además hay una inactivación rápida de la catalasa a concentraciones mayores de 100 mM, cuando el complejo I (enzima-H_2O_2) se convierte a un complejo II o III inactivo. Por tanto, las mediciones de la actividad bajo saturación por sustrato o la determinación de la *Km* o Ks es imposible. En contraste, la reacción de descomposición de H_2O_2 que procede a concentraciones no saturantes de sustrato es una reacción de primer orden y la velocidad siempre será proporcional a la concentración de H_2O_2 presente en el ensayo.

Existen varias ecuaciones de primer orden para determinar la actividad de la catalasa, en este caso inicialmente se empleó la ecuación reportada en el estudio de Hadwan, (2018);

$$kU = {}^{2.303}/_{t} * log\, {}^{[S0]}/_{[Sr]} \quad (ecuación\ 4)$$

Donde; kU, es la actividad; t es el tiempo del ensayo; [S0] es la concentración inicial del sustrato o absorbancia del blanco 1; y [Sr] es la concentración inicial del sustrato o la absorbancia del cualquier tubo (1-5) en la tabla 2.

Al sustituir los valores de la absorbancia en la ecuación anterior (4) a los diferentes tiempos se obtienen los siguientes valores de actividad (Tabla 3); para ejemplificar los cálculos se muestra el despeje a los 5

$$kU = \frac{2.303}{5\ min} log \frac{0.238}{0.061}$$

$$kU = 0.46\ min^{-1} * 0.591 = 0.272\ min^{-1}$$

Tabla 3. Valores de actividad de acuerdo con la ecuación reportada por Hadwan a diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (min)	Actividad (kU, min^{-1})
1	0.251
2	0.258
3	0.225
4	0.214
5	0.272

Al revisar las unidades de la actividad enzimática se puede notar que solo tenemos min^{-1} y lo cual no corresponde con la definición general de actividad enzimática, la cual se define como cantidad de sustrato consumido o formación de producto con respecto al tiempo. Además, los valores son muy parecidos entre ellos y estos valores son muy parecidos al valor calculado que se obtuvo al utilizar los parámetros cinéticos de 0.3 min^{-1} y eso indica que hay un potencial error en la actividad. Por tanto, es necesario realizar una corrección a la ecuación anterior antes de poder realizar los cálculos.

La catalasa es una enzima que presenta una cinética compleja y algunos estudios reportan que la mejor manera de medir la actividad es mediante la constante de velocidad de primer orden;

$$kt = 2.303\ log\, {}^{[S0]}/_{[Sr]} \quad (ecuación\ 5)$$

Entonces es necesario despejar la constante k;

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{[S0]}{[Sr]} \quad (ecuación\ 6)$$

Al comparar las ecuaciones 4 y 6, se observa que falta el término "U". Aunque el autor no menciona nada sobre U es posible suponer que se refiere a unidades internacionales de actividad. Sin embargo, para que el termino de k tenga las unidades correctas ($M^{-1}\ seg^{-1}$) es necesario que la reacción sea de segundo orden. Por tanto, la ecuación 6, solo nos permite conocer el valor de la constante k de primer orden y este debe ser utilizado en la siguiente ecuación para medir la actividad;

v=k*Δ[S] (ecuación 7)

Por tanto,

Δ[S] = [S0]-[Sr]

Al sustituir los datos en la ecuación 6 para obtener el

REMDIS Vol. 2, No. 11, mayo 2020 ISSN: 2594-1445

valor de la constante K se obtiene 0.272 min^{-1} y el valor de Δ[S] fue 0.177 mM.

$v = 0.272\ min^{-1} * 0.177\ mM = 0.0481\ mM\ min^{-1}$

Por último, es importante no olvidar el volumen de reacción y de la muestra empleado. En este caso, el volumen total (Vt) fue 0.750 mL y el volumen de la muestra (Vm) fue 0.001 mL. Por lo cual, la velocidad debe ser multiplicado por 750 para conocer la actividad total.

$$v = 0.0481 \frac{mM}{min} * 750 = 36.07 \frac{mM}{min}$$

En base a todo lo anterior la ecuación general para determinar la actividad de la catalasa es;

$$Act\ enz\ (U) = k * \Delta[S] * {}^{Vt}/_{Vm} \quad (ecuación\ 8)$$

Donde k es;

$$k = \frac{2.303}{t} * log \frac{[S0]}{[Sr]}$$

Vt corresponde al volumen total; Vm es el volumen de la muestra. Además el valor de k es el promedio de todos los datos de la tabla 3. Es decir, k =0.244. Aplicando estos valores se obtienen las siguientes actividades (tabla 4) y la unidad se define como la cantidad de enzima que dismuta 1 mmol de H_2O_2 por un minuto.

Tabla 4. Valores de actividad de acuerdo con las correcciones en la ecuación 6 a diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (min)	Actividad (U)
1	9.70
2	17.56
3	21.41
4	25.07
5	32.39

La tabla 4 demuestra que la actividad aumenta de manera proporcional con el tiempo de incubación de la enzima (citosol de hígado de rata) con su sustrato (H_2O_2) y el coeficiente de correlación (R^2) fue 0.989. La ecuación de la línea de tendencia fue y = 5.288 * x + 5.359 (Figura 3).

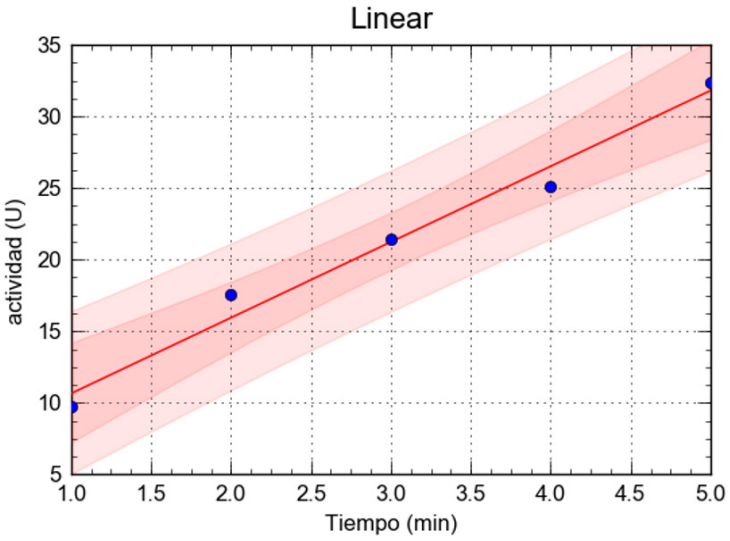


Figura 3. Gráfica que representa la proporcionalidad directa de actividad enzimática de la catalasa con respecto al tiempo de incubación.

Para realizar la medición de manera eficiente en un gran número de muestras se debe emplear el ensayo de punto final de cada muestra por duplicado o triplicado al considerar un tiempo único de 5 min de ensayo.

Por último, es importante mencionar que una gran confusión al utilizar la ecuación de Hadwan, (2018) fue el término kU, ya que en primera instancia no hay una definición por parte del autor en ninguna de sus publicaciones. Sin embargo, existen otros trabajos que definen la actividad en una manera semejante, pero utilizan una ecuación ligeramente diferente y solo algunos definen una unidad de actividad como la cantidad de catalasa que descompone 1 µmol o un mol de peróxido de hidrógeno/ 1 min bajo sus condiciones experimentales (Góth L, 1990; De Magalháes CS y cols., 2016; Moretti y cols., 2017). Además, existen otras definiciones de la unidad, por ejemplo,

La unidad Keilin (KU) es la cantidad de enzima de hígado necesario para descomponer 1 g de 100% de peróxido de hidrógeno en 10 min a 25 °C y pH 7 en una atmosfera inerte de CO_2 o N_2 (Keilin y Hartree, 1945; Scott y Hammer, 1960).

La unidad Baker (BU) es la cantidad de catalasa de hongo que debe descomponer 264 mg de peróxido de hidrogeno bajo las condiciones de reacción definido por Scott y Hammer (1960).

La unidad de catalasa (CaU) es la cantidad de catalasa que descompone 1 mmol de peróxido de hidrogeno en 1 min a 30 °C (Stellmach, 1988).

Por tanto, la Subcomisión Internacional de Unidades Enzimáticas Clínicas recomienda que todas las actividades deben ser calculadas en términos de micromoles de sustrato transformado por minuto y las concentraciones expresadas en litros o mililitros (King EJ y Campbell DM, 1961). Por lo cual, las unidades de este estudio fueron mM/min o (mmol/min L). Sin embargo, De Magalháes C y cols., 2016 mencionan que no existen unidades internacionales para la actividad de la catalasa y que solo es necesario utilizar la constante de velocidad (k). Consecuentemente para evitar el uso confuso de las ecuaciones en la determinación de la actividad enzimática es importante fomentar el estudio de las bases de la cinética enzimática.

En conclusión, el método colorimétrico en microensayo con cobalto-bicarbonato es adecuado para determinar la actividad de la catalasa de hígado de rata tanto por el análisis de curvas progreso y por punto final. Además, se aclaró la confusión de cómo se debe ser cuantificada la actividad de la enzima con las ecuaciones de primer orden y de velocidad inicial para cumplir con la definición de unidad de acuerdo con la Subcomisión Internacional.

REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121-126.
- De Magalhães CS, Takarada JE, Carvalho NC, do Carvalho DC, De Andrade FL, Ferreira EB, Luccas PO and Azevedo L (2016). The Coffee Protective Effect on Catalase System in the Preneoplastic Induced Rat Liver. J Chem. 85703212016.
- Garzón de la Mora, P. (2002). Manual Prácticas de Laboratorio de Bioquímica. Proyecto VI, Condiciones óptimas para medir una actividad enzimática, 111-125.
- Góth, L. (1990). *A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range*. *196*, 143–151.
- Hadwan, M. H., Abed H. N. (2015). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. Data Brief. 6: 194-9.
- Hadwan, M. H. (2018a). Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochemistry*. https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5
- Hadwan MH, Ali S. K. (2018). New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. Anal Biochem. 542: 29-33.
- Johansson, L.H. and Borg, L.A.H. (1988) A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Sample. Analytical Biochemistry, 174, 331-336. http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4Keilin D., Hartree E. F. (1945). Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. Biochem J. 39: 293-301.
- King, E. J., & Campbell, D. M. (1961). International enzyme units an attempt at international agreement. *Clinica Chimica Acta*. https://doi.org/10.1016/0009-8981(61)90054-7
- Kroll, R. G., Frears, E. R., & Bayliss, A. (1989). An oxygen electrode-based assay of catalase activity as a rapid method for estimating the bacterial content of foods. *Journal of Applied Bacteriology*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02471.x
- Moretti D. B., Nordi W.M., y cols. (2017). Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and oxygen radical absorbance capacity in the gut of juvenile pacu Piaractus mesopotamicus and dourado Salminus brasiliensis fed bovine first milk secretion. Lat Am J Aquat Res. 45: 717-723.
- Scott, D. and Hammer, F. (1960) Enzymología 22, 229-237.
- Setlow, R. B. (1951). The inactivation of catalase by deuterons and heat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90018-5
- Stellmach, B., Gottschick, W. et ál. (1988) Best immungsmethod en Enzyme: für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin (German Edition)

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

LGAC: Desarrollo e innovación de Alimentos

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

Análisis in silico y filogenia de la proteína HSP20 del patógeno oral humano Centipeta periodontii

[1]*Martínez Ignacio y [2]Castro-Manrreza Marta Elena.

[1]Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

[2]Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza.
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

*E mail de Correspondencia: imm@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

Centipeta periodontii es un patógeno oral que ha sido asociado a periodontitis. Se sabe poco sobre su fisiología y las proteínas que le ayudan a sobreponerse a las condiciones adversas en la cavidad oral como el estrés térmico y oxidativo. Las proteínas de choque térmico (HSP) de bajo peso son chaperonas que evitan la degradación de otras proteínas y permiten la sobrevivencia de diversos organismos a condiciones adversas. La secuencia de la proteína HSP20 de C. *periodontii* (CpHSP20) ha sido depositada en la base de datos GenBank, pero no se han reportado sus características y propiedades *in silico, in vitro* o *in vivo*. Por ello en el presente trabajo se utilizaron herramientas de bioinformática para analizar las características estructurales de esta proteína y presentar un modelo tridimensional de la misma. La secuencia reportada y el modelo 3D muestran que CpHSP20 cuenta con los dominios N-terminal, α-cristalino y C-terminal, así como con las láminas β, características de esta familia. También se identificaron diversos aminoácidos que podrían participar en la formación de oligómeros de la molécula y en la unión a las proteínas blanco. CpHSP20 tiene una secuencia similar a la proteína homóloga de *Selenomonas sputigena* y *Selenomonas massiliensis*, ésta última de reciente descripción como patógeno oral.

Palabras clave: Proteínas de choque térmico, *Centipeta periodontii*, filogenia

ABSTRACT

Centipeta periodontii is an oral pathogen that has been associated with periodontitis. Little is known about his physiology and the proteins that help him to overcome adverse conditions in the oral cavity such as thermal and oxidative stress. Small Heat Shock Proteins are chaperones that prevent the degradation of other proteins and allow the survival of several organisms under adverse conditions. The sequence of the C. *periodontii* HSP20 protein (CpHSP20) has been load in the GenBank database, but its characteristics and properties have not been reported *in silico, in vitro* or *in vivo*. Therefore, in this work, bioinformatics tools were used to analyze the structural characteristics of this protein and present a 3D model of it. The reported sequence and the 3D model show that CpHSP20 has the N-terminal, alpha-crystalline and C-terminal regions, as well as the characteristic β sheets of this family. Several amino acids that could participate in the oligomerization of the molecule and binding to the target proteins were also identified. CpHSP20 has a similar sequence of the homologous protein from *Selenomonas sputigena* and *Selenomonas massiliensis*, the latter of recent description as an oral pathogen.

Keywords: Heat Shock Protein, *Centipeta periodontii*, Phylogeny

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es un padecimiento crónico asociado a la inflamación de los tejidos de soporte dental, que conduce al debilitamiento de los mismos y puede concluir con la pérdida de los dientes (Gao *et al*., 2020). Es la enfermedad oral más prevalente en el mundo y es causada por biopelículas formadas en las bolsas periodontales, así como la respuesta inmune inducida por estas (Bouziane *et al*., 2020). Hasta el momento no se ha demostrado que una sola especie bacteriana sea la única causante de la periodontitis, por lo que se ha propuesto que diversos microorganismos odontopáticos presentes en la cavidad oral están asociados con el progreso de la enfermedad. Los cambios en dichas poblaciones (disbiosis) podrían desencadenar el padecimiento, por ello muchos de los esfuerzos actuales están encaminados a establecer con certeza las especies bacterianas presentes en la cavidad oral y el papel que cada una desempeña en el establecimiento y progresión de la periodontitis (Hiranmayi *et al*., 2017; Nozawa *et al*., 2020).

Algunas de las especies bacterianas que colonizan la cavidad oral como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia* han sido objeto de amplios estudios, por lo que la literatura sobre ellas es abundante. Sin embargo, aún hay muchas especies que tienen importancia como patógenos orales y de las cuales se sabe poco. *Centipeda periodontii* es un bacilo anaeróbico gram-negativo flagelado, que forma parte de la flora microbiana de la cavidad oral humana, particularmente de la lengua, tejido periodontal y surco gingival (Tamura et al., 2013b; Tyrrell *et al*., 2003). Esta bacteria se ha encontrado, junto con otras especies, en lesiones periodontales (Chan and Chien, 1994; Rams *et al*., 2015; Shenker *et al*., 1987; Siqueira and Rocas, 2004). Se ha demostrado que este microorganismo tiene la capacidad de afectar la viabilidad de linfocitos humanos (tanto T como B) y monocitos, lo cual podría iniciar un fenómeno de inmunosupresión, que facilitaría la acción patógena de este y otros componentes de la microflora bucal (Shenker *et al*., 1987). Sin embargo, hacen falta estudios más detallados sobre su papel en el establecimiento y progresión de la periodontitis.

Se han publicado trabajos que describen la estructura flagelar de *C. periodontii* mediante microscopia electrónica y algunas características del lipopolisacárido de su pared bacteriana (Berthold *et al*., 1988; Kokeguchi *et al*., 1990). Sin embargo, no hay literatura sobre su fisiología o sobre los componentes que le permiten soportar el ambiente adverso de la cavidad oral y establecerse exitosamente en la misma, como podrían ser las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés Heat Shock Proteins).

Las HSP son una gran familia, cuyos miembros tienen diferentes actividades como chaperonas y ayudan a mantener la integridad de sus proteínas blanco frente a diversas condiciones de estrés (térmico, oxidante, osmótico, nutricional, etc). Tres de los miembros más conocidos son las HSP60, HSP70 y HSP90 (cuyos pesos moleculares son de 60, 70 y 90 KDa, respectivamente). Sin embargo, hay una subfamilia conocida como HSPs de bajo peso molecular, cuyos miembros se encuentran entre los 14 y los 40 KDa. Estas proteínas tienen funciones similares a las HSPs antes mencionadas e incluso pueden tener funciones adicionales como metaloproteasas o enzimas degradantes (Fakruddin et al., 2000; Tundo *et al*., 2013). Por ello, recientemente han recibido especial atención y en algunos casos incluso se les considera factores de virulencia (Mayer *et al*., 2012; Stewart *et al*., 2005).

Se sabe que estas HSP de bajo peso se encuentran distribuidas a todo lo largo de la escala evolutiva, desde procariontes (arqueas y bacterias) hasta eucariontes multicelulares como el humano (Haslbeck et al., 2019). Hasta el momento no han sido descritas las características de ninguna de las HSP de bajo peso molecular de C. *periodontii*, por lo que en el presente trabajo se hace un análisis estructural *in silico* de una proteína de choque térmico de 20 KDa (CpHSP20), se establecen sus características y se discute su relación filogenética con otras bacterias orales, así como su posible papel en la patogenicidad de este microrganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuencias de HSP20

Las secuencias de HSP20 de *Centipeda periodontii* (WP006307775.1, EGK56698.1) fueron obtenidas de GenBank donde se encuentran publicadas desde 2013 y 2017, respectivamente. Para los análisis realizados también se incluyeron secuencias de otros patógenos orales como P*orphyromonas uenonis* (WP039865826.1), *Prevotella intermedia* (PDP82714.1), *Treponema denticola* (AAS11518.1), S*elenomonas massiliensis* (WP106627973.1) y *Selenomonas sputigena* (WP013741073.1). También se incluyeron secuencias de proteínas homologas de

bacterias no relacionadas, protozoarios y eucariontes: *Acetobacter pasteurianus* (BAU37705.1), *Gluconobacter frateurii* (GAP24968.1), *Escherichia coli* (KAA1346709.1), *Mycobacterium tuberculosis* (KDA15745.1,), *Trypanosoma cruzi* strain Qro (AAY78951.2), *Trypanosoma cruzi* CL Brener (XP810967.1), *Trypanosoma rangeli* (ESL07623.1), *Bodo saltans* (AXL08066.1), *Leishmania braziliensis* (SYZ67774.1), *Mus musculus* (AAA37861.1) y *Homo sapiens* (NP653218.1).

Análisis estructural de CpHSP20

Para establecer las características estructurales de la proteína se utilizó el software BLASTp el cual se encuentra disponible en línea (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins). Se realizaron alineamientos individuales de la HSP20 con otras HSPs de bajo peso molecular bien caracterizadas, para establecer las similitudes y diferencias en la posición de los aminoácidos e identificar la longitud de las regiones N-terminal, dominio α-cristalino y C-terminal, así como los aminoácidos relevantes para la unión al sustrato. La secuencia de las láminas β2-10 fue corroborada con el análisis de I-TASSER que se menciona más adelante. Adicionalmente se usó el software PrankWeb (http://prankweb.cz) para predecir nuevos sitios de unión a ligando, a partir de la comparación con la secuencia de la proteína HSP16 (GenBank NP_596091.1) de *Schizosaccharomyces pombe* (Jendele et al., 2019). Para ello se identificaron los aminoácidos de unión a ligando en la secuencia de S. *pombe* mediante PrankWeb y luego esta fue alineada con la secuencia de CpHSP20 mediante el software MUSCLE. De esta forma por homología se dedujeron los aminoácidos de unión a ligando comunes entre ambas secuencias.

Inmunogenicidad de CpHSP20

Para establecer las propiedades inmunogénicas de la proteína se determinó qué secuencias de péptidos presentes en la misma podían unirse al MHC-II (HLA-DR) alelo DRB1 y cuáles podrían ser inductores de anticuerpos por células B. Para ello se utilizó la herramienta de análisis y predicción Immune Epitope Database (IEDB) (https://www.iedb.org). Se seleccionaron los péptidos con mayor score y estos fueron confirmados con el método de predicción Consensus 2.22 contenido en el mismo software (Wang *et al*., 2008).

Modelaje molecular por I-TASSER

La estructura terciaria de la proteína, así como la confirmación de las secuencias de láminas β2-10 y el modelaje tridimensional, fueron establecidos desde la plataforma en línea I-TASER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Para el análisis se empleó la secuencia de aminoácidos completa de la proteína CpHSP20 (GenBank, EGK56698.1). La estructura tridimensional predicha fue visualizada mediante el software libre de manipulación de imágenes GNU GIMP 2.8 (https://www.gimp.org/). Para el modelado tridimensional mediante I-TASSER se compararon plantillas de la biblioteca PDB (Protein Data Base, https://www.rcsb.org/structure/3rhw), seleccionando aquellas de mayor probabilidad. La estructura tridimensional predicha fue comparada con otras ya descritas mediante TM-align y se estableció la identidad de aquellas con las que comparte más similitud (Yang et al., 2015).

Filogenia de CpHSP20

Las secuencias de HSP de bajo peso fueron compiladas mediante el Software BioEdit y el alineamiento de las mismas se realizó mediante el software MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004). Se estableció la filogenia de CpHSP20 mediante los análisis de Neighbor joining y UPGMA, por el método estadístico de Bootstrap (2000 réplicas), empleando el Software Mega6 (Tamura et al., 2013a). En ambos casos se analizó solo el dominio α-cristalino que es el más conservado, entre las láminas β3-7. Para el análisis solo se consideraron aquellas posiciones con una cobertura del 95%. Los cladogramas resultantes fueron visualizados mediante el Software FigTree Ver 1.4.3 (Rambaut, 2006) .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de HSP20

El análisis estructural de la proteína HSP20 mostró que el extremo N-terminal tiene una longitud de 43 aminoácidos, de los cuales más del 60% son hidrofóbicos. La región correspondiente al dominio α-cristalino tiene una longitud de 90 aminoácidos y posee las láminas β2-8 características de esta familia (Figura 1). Finalmente la secuencia de la región C-terminal tiene una extensión de 19 aminoácidos y se caracteriza por el dominio IxI (IEI) que ha sido implicado en la formación de oligómeros

de estas proteínas (Delbecq *et al*., 2012).

Previamente se ha planteado que la secuencia N-terminal de las HSPs de bajo peso se caracteriza por estar enriquecida en aminoácidos hidrofóbicos, de los cuales los más abundantes son Fenilalanina (F) y triptófano (W). CpHSP20 cumple la primera característica, pues el 63% del dominio N-terminal está compuesto de aminoácidos hidrofóbicos. Pero solo F es el más abundante, ya que W está escasamente representado. Tales variaciones en la estructura de este dominio no son del todo raras, ya que trabajos previos han planteado que esta secuencia ha evolucionado de forma independiente a la evolución estructural del dominio α-cristalino. Esto ha resultado en una mayor variabilidad en partes específicas de la proteína y en una diversificación de probables blancos de unión (Kriehuber *et al*., 2010).

En otras HSP de bajo peso se ha descrito que la secuencia IxI puede estar presente también en el extremo N-terminal, permitiendo cierta interacción entre éste y los dominios α-cristalino de otras HSPs. Sin embargo, en el caso de CpHSP20 no se encuentra (Stamler *et al*., 2005). La región N-terminal de esta proteína también cuenta con varias fenilalaninas, que en otras HPS de bajo peso se han propuesto como importantes para la unión a las proteínas blanco y también para la formación de oligómeros. La presencia de una o varias de estas fenilalaninas confiere a la proteína la capacidad de formar oligómeros de diferente tamaño y estabilidad, que sin perder sus propiedades de chaperona pueden interactuar de forma distinta con diversos sustratos. Asimismo, se ha propuesto que estas fenilalaninas pueden estar involucradas en el reconocimiento de proteínas desnaturalizadas. Por ello, la presencia de varias F en el dominio N-terminal podría darle a la CpHSP20 mayor flexibilidad para interactuar con diversas proteínas, que además pueden tener diferentes estados de desnaturalización o agregación (Figura 1) (Jaya *et al*., 2009).

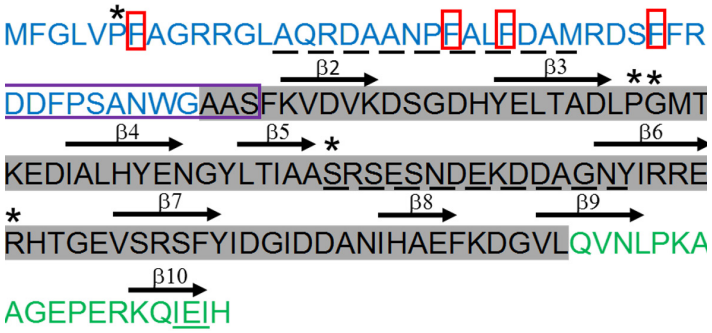


Figura 1. Análisis estructural de CpHSP20 (EGK56698.1). Se identificaron los dominios N-terminal (azul), alfa cristalina (sombreado gris) y C-terminal (verde). Las láminas β características de esta familia se señalan con flechas. El motivo IxI (subrayado) en la región C-terminal es importante para la oligomerización de la molécula. Las fenilalaninas relevantes para la unión al sustrato se enmarcan en rojo. Los asteriscos indican los aminoácidos relevantes para unión al sustrato determinados por PrankWeb. Las líneas punteadas señalan los péptidos identificados como inmunogénicos que pueden ser presentados por MHCII y la caja morada señala un péptido con capacidad de inducir la producción de anticuerpos por células B.

Por otro lado, el domino α-cristalino se ha reportado previamente con una extensión de 90-100 aminoácidos. En CpHSP20 la longitud es de 90 aminoácidos y cuenta con todas las láminas β necesarias para interaccionar con otras unidades de la misma proteína durante la oligomerización, como ha sido propuesto previamente para otras HSP (Hochberg and Benesch, 2014). El proceso de oligomerización es un paso crucial, previo a la actividad de chaperona de estas proteínas, pues ha sido descrito que la incorporación y desincorporación de monómeros a las estructuras de mayor tamaño (oligómeros) es un sistema dinámico, que se ajusta a los requerimientos fisiológicos de la célula y que permite a las HSPs de bajo peso el rápido reconocimiento de sus proteínas blanco frente a un evento adverso (Basha et al., 2012). Adicionalmente, CpHSP20 cuenta con una secuencia (RSES), junto a la lámina β5 del motivo α-cristalino, cuya última serina es susceptible de ser fosforilada por cinasas dependientes de calmodulina, lo cual también podría cambiar su estado de oligomerización y tener un papel en la regulación de su actividad (Ecroyd *et al*., 2007).

Existen antecedentes al respecto, pues se ha demostrado que cuando la HSP27 humana se fosforila en respuesta a diversos estímulos extracelulares, forma dímeros

para unirse a diversas proteínas, confiere resistencia a fármacos en células cancerígenas y participa en el crecimiento celular en respuesta a mitógenos, además de su papel como chaperona. Incluso se ha planteado su probable participación en la transducción de señales (Lambert *et al*., 1999)

Además de lo anterior, la deducción de nuevos sitios de unión a partir del análisis con PrankWeb sugirió varios aminoácidos, principalmente en el dominio α-cristalino (Figura 1), lo cual apoya la propuesta que han hecho diversos autores sobre el papel de esta región en la interacción con las proteínas blanco. Se ha observado que en otras HSPs de bajo peso, los cambios de temperatura modifican la estructura del dominio α-cristalino, presumiblemente haciendo que se expongan los residuos de unión al sustrato (Hochberg and Benesch, 2014; Horwitz, 1992).

Por otra parte, la porción C-terminal ha sido descrita con una longitud no mayor a 20 aminoácidos. CpHSP20 tiene 20 residuos, cuyo motivo IEI presente en la secuencia, le permite cierta flexibilidad para interactuar con las láminas β del dominio α-cristalino propio y con las secuencias IxI de otros monómeros de HSP. Se ha reportado previamente que la secuencia IxI en el extremo C-terminal de la proteína es altamente conservada en esta subfamilia y que las isoleucinas son particularmente importantes para la formación de hetero-oligómeros (estructuras formadas por monómeros de diferentes HSPs), así como para el reconocimiento de ciertas proteínas blanco. También se ha observado que algunas proteínas tienen valinas en vez de isoleucinas en la secuencia IxI, sin perder sus propiedades (Kriehuber *et al*., 2010; Pasta *et al*., 2004).

Inmunogenicidad de CpHSP20

La predicción de secuencias inmunogénicas mostró que dos péptidos de 15 y uno de 12 aminoácidos, tendrían las características para ser presentados por el MHC clase II humano (Figura 1). Dos de ellos se encuentra en la región N- terminal y el otro se encuentra en el dominio α-cristalino, entre las láminas b5 y b6, región que de acuerdo con el modelaje molecular estaría expuesta (Figura 2). Este análisis también determinó que la secuencia de 12 aminoácidos presente en el extremo N-terminal tendría altas probabilidades de inducir la producción de anticuerpos por las células B. Actualmente se sabe que de manera natural pueden generarse anticuerpos IgG e IgM contra algunas HSP de bajo peso molecular humanas durante la evolución de algunos procesos patológicos como Alzheimer, Parkinson y cáncer de ovario (Papuc *et al*., 2016; Papuc *et al*., 2015; Zhu *et al*., 2015). Asimismo se han reportado anticuerpos contra HSP de bajo peso de diversos virus, helmintos y protozoarios (Coceres *et al*., 2010; Montalvo-Alvarez *et al*., 2008; Ramezani *et al*., 2019; Vacirca *et al*., 2011). Sin embargo, aún se desconoce cabalmente la relevancia biológica de este fenómeno. Por otro lado, la propiedad de generar anticuerpos del péptido de 12 aminoácidos de CpHSP20, podría aprovecharse para establecer un sistema de diagnóstico de forma similar a lo que se ha hecho con la HSP16 de *Mycobacterium tuberculosis* y la HSP20 del Virus de Papiloma Humano (Ramezani *et al*., 2019; Trilling *et al*., 2011).

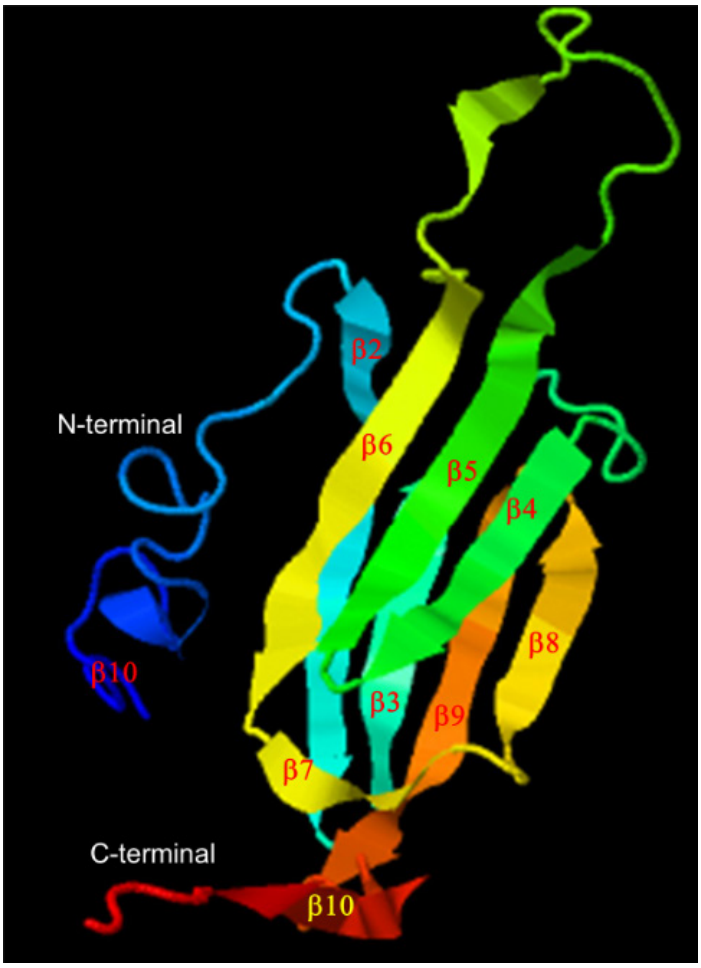


Figura 2. Modelo 3D de CpHSP20 (EGK56698.1). El modelado se realizó en la plataforma I-TASER como se indica en materiales y método. El núcleo de láminas β antiparalelas se muestra al centro (verde, cian, naranja y amarillo).

REMDIS Vol. 2, No. 11, mayo 2020 ISSN: 2594-1445

Modelo tridimensional de CpHSP20

La estructura tridimensional de CpHSP20 modelada por I-TASSER mediante TM-align (Figura 2) muestra las láminas β que adoptan la forma de un "sándwich" compacto compuesto de dos grupos de hojas antiparalelas de 3 y 4 láminas respectivamente, como se ha descrito para otras HSPs de bajo peso molecular (Haslbeck *et al*., 2019). La CpHSP20 fue comparada con todas las estructuras en la biblioteca PDB y se encontró que la identidad más alta fue con la proteína de 16 KDa de *Schyzosaccaromyces pombe*. De acuerdo con esta similitud estructural se puede predecir que el estado más probable de oligomerización de esta proteína sea de 16 moléculas homoméricas (monómeros idénticos), lo cual aún debe ser corroborado. Asimismo, se observa en el modelo tridimensional que la secuencia susceptible a fosforilación se encuentra expuesta fuera del "sándwich" de láminas β. Como información adicional, el modelaje tridimensional también señaló que la secuencia y disposición de algunas de las láminas β podrían favorecer la unión a otras HSPs de bajo peso, es decir permitirían la formación de hetero-oligómeros.

Esto sería muy relevante para la función de la CpHSP20 como chaperona, pues se ha demostrado en otros modelos que los hetero-oligómeros formados por HSPs de bajo peso tienen mayor estabilidad térmica e intercambian subunidades con mayor dinamismo, facilitando así su acción de chaperona sobre algunas proteínas (Aquilina *et al*., 2013).

En la base de datos PDB solo se encuentran proteínas que han sido cristalizadas, cuya estructura tridimensional ha sido confirmada, y hasta el momento no hay HSPs de bajo peso de bacterias similares a C. *periodontii*. Por ello, el modelo tridimensional propuesto deberá ser confirmado más adelante mediante la cristalización de la proteína.

CpHSP20 se relaciona filogenéticamente con especies del género *Selenomonas*

En 2013 y 2017 se anotaron en GenBank las secuencias de HSP20 de C. *periodontii*, empleadas en este trabajo, que resultaron ser idénticas entre sí. Hasta la fecha no se ha analizado la filogenia de C. *periodontii* mediante CpHSP20 para saber con qué otras bacterias comparte características. Mediante el análisis de Neighbor joining y UPGMA se encontró que CpHSP20 se relaciona filogenéticamente con la HSP20 de *Selenomonas sputigena* (Figura 3). Este resultado es consistente con estudios filogenéticos previos que emplearon el marcador ribososmal 16S y demostraron que *C. periodontii* y *S. sputigena* tienen una relación filogenética (Sawada et al., 1999; Sawada *et al*., 2000). Adicionalmente, los géneros *Centipeta* y *Selenomonas* podrían constituir un clado filogenético, claramente separado de otras bacterias orales como *Treponema* y *Porphyromonas*, lo cual no ha sido planteado formalmente hasta ahora.

Tanto C. *periodontii* como *S. sputigena* han sido considerados patógenos orales asociados a la evolución de la periodontitis, por lo que la relación filogenética observada por los marcadores ya señalados puede dar pie a una caracterización de otros factores involucrados en su virulencia. Por ejemplo, se ha demostrado que *S. sputigena* cuenta con una flagelina glicosilada expresada en su superficie, que está relacionada con su capacidad para formar bio-films. Sería importante establecer si *C. periodontii* cuenta con la misma molécula (Rath *et al*., 2018).

Por otro lado, dado que los análisis con NJ y UPGMA consideran solo las propiedades fenotípicas de las secuencias de aminoácidos y no la historia evolutiva, se requieren análisis de inferencia bayesiana a partir de secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, que fortalezcan la idea de un clado común a partir de una historia evolutiva compartida para los géneros *Centipeta* y *Selenomonas*.

Adicionalmente, se han reportado trabajos en los cuales emplean HSPs para vacunar modelos animales y se obtiene una respuesta protectora (Bolhassani and Rafati, 2013; Milani *et al*., 2019). Partiendo de ello, el resultado descrito líneas arriba predice que, si se usa la CpHSP20 como modelo vacunal, podría generarse una respuesta humoral compartida contra las proteínas de choque térmico de bajo peso de *C. periodontii* y las especies del género Selenomonas, pero probablemente no contra otras bacterias orales como *Porphyromonas* o *Prevotella*, por su menor similitud a nivel de aminoácidos.

Interesantemente, también se evaluó la filogenia de la proteína HSP20 de *Selenomonas massiliensis*, un patógeno oral humano descrito recientemente y del cual aún se cuenta con poca información (Belkacemi *et al*., 2018). Se encontró que si bien *S. massiliensis* puede formar parte del clado *Selenomonas*, aparentemente tiene menos similitud con S. *sputigena* (Figura 3).

Papel biológico de CpHSP20

Tomando en conjunto las características señaladas en el presente trabajo, puede deducirse que la proteína CpHSP20 tiene las características necesarias para la actividad de chaperona (unión a sustrato, formación de oligómeros, sitio de fosforilación, secuencia IxI) con capacidad de unirse a proteínas desdobladas o mal plegadas, evitando su agregación y degradación durante eventos de estrés celular, como ha sido descrito para otros miembros de esta familia (Horwitz, 1992; Jakob *et al*., 1993).

Así CpHSP20 podría ayudar a resistir las condiciones adversas que el patógeno enfrenta en la cavidad oral, como el estrés oxidante, que puede afectar su establecimiento exitoso y puede ser causado por diversos factores como xenobióticos (etanol, humo de cigarro, fármacos), alimentos (dietas altas en grasa, proteínas o irritantes), materiales y tratamientos dentales (ozono, luz ultravioleta, fluoruro, cementos y aplicaciones ortodóncicas) (Santos *et al*., 2007; Zukowski *et al*., 2018). También podría ser chaperona de algunos factores de virulencia del patógeno, como ha sido demostrado para otras HSPs de bajo peso en bacterias patógenas (*Mycobacterium tuberculosis* y *Agrobacterium tumefaciens*) y para algunos patógenos fúngicos como *Candida albicans* (Mayer *et al*., 2012; Stewart *et al*., 2005; Tsai *et al*., 2010).

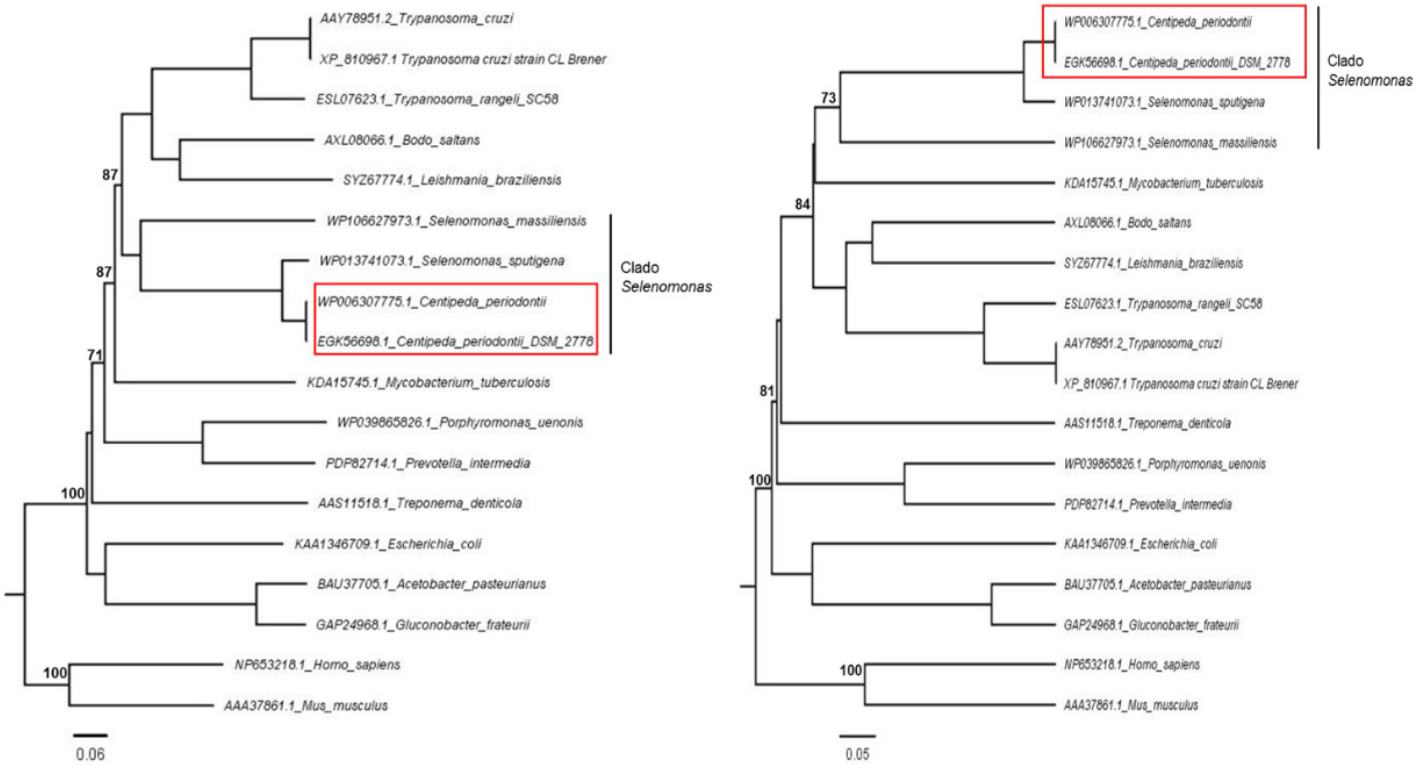


Figura 3. Filogenia de la proteína CpHSP20 (EGK56698.1). El análisis de Neighbor joining (izquierda) y UPGMA (derecha) se realizó como se describe en materiales y método. Se analizó la relación de esta proteína con otras HSP de bajo peso molecular y se encontró que CpHSP20 se agrupa con sus proteínas homólogas de *S. sputigena* y *S. massiliensis*. Los valores de bootstrap en los nodos se obtuvieron a partir de 2,000 réplicas. Las distancias genéticas para el análisis evolutivo fueron determinadas por el método *p-distance*. La escala mostrada representa el número de diferencias en aa por sitio en la secuencia. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura fueron eliminadas. Un total de 82 posiciones fueron empleadas en la construcción del cladograma.

CONCLUSIÓN

El análisis *in sílico* de la proteína CpHSP20 mostró que ésta cuenta con las características para ser chaperona y unirse probablemente a más de una proteína blanco. Su papel como chaperona de algunos factores de virulencia debe ser evaluado. Asimismo, la secuencia de CpHSP20 comparte características con la proteína homóloga de especies del género Selenomonas, por lo que podrían compartir una historia evolutiva aún por ser descrita.

PERSPECTIVAS

Para profundizar en el conocimiento de esta proteína y su papel en la fisiología de *C. periodontii*, podrían realizarse análisis computacionales de docking, para establecer los posibles blancos de unión de CpHSP20 y de esta forma saber cuáles de ellos son importantes para la patogenia de la periodontitis. Algo similar se ha realizado con otras proteínas de choque térmico como las HSP70 (Singh et al., 2019). Experimentalmente, podría obtenerse la proteína recombinante mediante técnicas de biología molecular, para realizar estudios de protección *in vitro* y comprobar el papel de chaperona, como se ha hecho para otras HSPs de bajo peso (Perez-Morales et al., 2009). La proteína recombinante podría emplearse también para ser cristalizada y de esta forma corroborar el modelo tridimensional presentado en este trabajo, o bien generar un nuevo modelo.

REFERENCIAS

- Aquilina JA, Shrestha S, Morris AM, *et al*. Structural and functional aspects of hetero-oligomers formed by the small heat shock proteins αB-crystallin and HSP27. Journal of Biological Chemistry 2013; 288: 13602-13609.
- Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. Trends in Biochemical Science 2012; 37: 106-117.
- Belkacemi S, Cassir N, Delerce J, *et al*. 'Selenomonas massiliensis,' a new anaerobic bacterial species isolated from human oral microbiota. New Microbes New Infection 2018; 24: 1-3.
- Berthold P, Males BM, Dougherty PA, *et al*. Ultrastructure of the flagellar basal body complex of Centipeda periodontii. Journal of ultrastructure and molecular structure research 1988; 99: 150-155.
- Bolhassani A, Rafati S. Mini-chaperones: potential immuno-stimulators in vaccine design. Human vaccines & immunotherapeutics 2013; 9: 153-161.
- Bouziane A, Hamdoun R, Abouqal R, Ennibi O. Global prevalence of aggressive periodontitis: A systematic review and meta-analysis. Journal of Clinical Periodontology 2020; 47:406-428.
- Chan Y, Chien R. Identification and analyses of periodontal pathogens in Taiwan by microbiological tests. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi 1994; 27: 59-69.
- Coceres VM, Becher ML, De Napoli MG, *et al*. Evaluation of the antigenic value of recombinant Toxoplasma gondii HSP20 to detect specific immunoglobulin G antibodies in Toxoplasma infected humans. Experimental Parasitology 2010; 126: 263-266.
- Delbecq SP, Jehle S, Klevit R. Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif. European Molecular Biology Organization Journal 2012; 31: 4587-4594.
- Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, *et al*. Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin affects its chaperone activity. Biochemical Journal 2007; 401: 129-141.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 2004; 32: 1792-1797.
- Fakruddin JM, Biswas S, Sharma YD. Metalloprotease activity in a small heat shock protein of the human malaria parasite Plasmodium vivax. Infection and Immunity 2000; 68: 1202-1206.
- Gao L, Kang M, Zhang MJ, *et al*. Polymicrobial periodontal disease triggers a wide radius of effect and unique virome. NPJ Biofilms Microbiomes 2020; 6: 10.
- Haslbeck M, Weinkauf S, Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. Journal of Biological Chemistry 2019; 294: 2121-2132.
- Hiranmayi KV, Sirisha K, Ramoji Rao MV, Sudhakar P. Novel Pathogens in Periodontal Microbiology. Journal of Pharmacy & Bioallied Science 2017; 9: 155-63.
- Hochberg GK, Benesch JL. Dynamical structure of alphaB-crystallin. Progress in Biophysics and Molecular Biology 2014; 115: 11-20.

- Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1992; 89: 10449-104453.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 1517-1520.
- Jaya N, Garcia V, Vierling E. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009; 106: 15604-15609.
- Jendele L, Krivak R, Skoda P, *et al*. PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. Nucleic Acids Research 2019; 47: W345-W349.
- Kokeguchi S, Tsutsui O, Kato K, Matsumura T. Isolation and characterization of lipopolysaccharide from Centipeda periodontii ATCC 35019. Oral Microbiology and Immunology 1990; 5: 108-112.
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, *et al*. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. FASEB Journal 2010; 24: 3633-3642.
- Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, *et al*. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. Journal of Biological Chemistry 1999; 274: 9378-9385.
- Mayer FL, Wilson D, Jacobsen ID, *et al*. Small but crucial: the novel small heat shock protein Hsp21 mediates stress adaptation and virulence in Candida albicans. PLoS One 2012; 7: e38584.
- Milani A, Basirnejad M, Bolhassani A. Heat-shock proteins in diagnosis and treatment: an overview of different biochemical and immunological functions. Immunotherapy 2019; 11: 215-239.
- Montalvo-Alvarez AM, Folgueira C, Carrion J, *et al*. The Leishmania HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental L. amazonensis infection. Journal of Biomedical Biotechnology 2008; 2008: 695432-695440.
- Nozawa A, Oshima H, Togawa N, *et al*. Development of Oral Care Chip, a novel device for quantitative detection of the oral microbiota associated with periodontal disease. PLoS One 2020; 15: e0229485.
- Papuc E, Krupski W, Kurys-Denis E, Rejdak K. Antibodies against small heat-shock proteins in Alzheimer's disease as a part of natural human immune repertoire or activation of humoral response? Journal of Neural Transmission (Vienna) 2016; 123: 455-461.
- Papuc E, Kurys-Denis E, Krupski W, Rejdak K. Humoral response against small heat shock proteins in Parkinson's disease. PLoS One 2015; 10: e0115480.
- Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M. The IXI/V motif in the C-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies. Molecular Vision 2004; 10: 655-662.
- Pérez-Morales D, Ostoa-Saloma P, Espinoza B. Trypanosoma cruzi SHSP16:
- Characterization of an alpha-crystallin small heat shock protein. Experimental Parasitology 2009; 123: 182-189.
- Rambaut A. FigTree: tree figure drawing tool. Edinburg, TX, USA., Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg, USA.); 2006.
- Ramezani A, Aghakhani A, Soleymani S, *et al*. Significance of serum antibodies against HPV E7, Hsp27, Hsp20 and Hp91 in Iranian HPV-exposed women. BMC Infectious Disease 2019; 19: 142-149.
- Rams TE, Hawley CE, Whitaker EJ, *et al*. Centipeda periodontii in human periodontitis. Odontology 2015; 103: 286-291.
- Rath CB, Schirmeister F, Figl R, *et al*. Flagellin Glycoproteomics of the Periodontitis Associated Pathogen Selenomonas sputigena Reveals Previously Not Described O-glycans and Rhamnose Fragment Rearrangement Occurring on the Glycopeptides. Molecular & Cellular Proteomics 2018; 17: 721-736.
- Santos SG, Diniz CG, Silva VL, *et al*. Effects of oxidative stress on the virulence profile of Prevotella intermedia during experimental infection in gnotobiotic mice. Journal of Medical Microbiology 2007; 56: 289-297.

- Sawada S, Kokeguchi S, Nishimura F, *et al*. Phylogenetic characterization of Centipeda periodontii, Selenomonas sputigena and Selenomonas species by 16S rRNA gene sequence analysis. Microbios 1999; 98: 133-140.
- Sawada S, Kokeguchi S, Takashiba S, Murayama Y. Development of 16S rDNA-based PCR assay for detecting Centipeda periodontii and Selenomonas sputigena. Letters in Applied Microbiology 2000; 30: 423-426.
- Shenker BJ, Berthold P, Dougherty P, Porter KK. Immunosuppressive effects of Centipeda periodontii: selective cytotoxicity for lymphocytes and monocytes. Infection and Immunity 1987; 55: 2332-2340.
- Singh R, Gurao A, Rajesh C, *et al*. Comparative modeling and mutual docking of structurally uncharacterized heat shock protein 70 and heat shock factor-1 proteins in water buffalo. Veterinary World 2019; 12: 2036-2045.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Nested PCR detection of Centipeda periodontii in primary endodontic infections. Journal of Endodontics 2004; 30: 135-137.
- Stamler R, Kappe G, Boelens W, Slingsby C. Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. Journal of Molecular Biology 2005; 353: 68-79.
- Stewart GR, Newton SM, Wilkinson KA, *et al*. The stress-responsive chaperone alpha-crystallin 2 is required for pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis. Molecular Microbiology 2005; 55: 1127-1137.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al*. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 2013a; 30: 2725-2729.
- Tamura N, Ochi M, Miyakawa H, Nakazawa F. Analysis of bacterial flora associated with peri-implantitis using obligate anaerobic culture technique and 16S rDNA gene sequence. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 2013b; 28: 1521-1529.
- Trilling AK, de Ronde H, Noteboom L, *et al*. A broad set of different llama antibodies specific for a 16 kDa heat shock protein of Mycobacterium tuberculosis. PLoS One 2011; 6: e26754.
- Tsai YL, Chiang YR, Narberhaus F, *et al*. The small heat-shock protein HspL is a VirB8 chaperone promoting type IV secretion-mediated DNA transfer. Journal of Biological Chemistry 2010; 285: 19757-19766.
- Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, *et al*. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein. Journal of Biological Chemistry 2013; 288: 2281-2289.
- Tyrrell KL, Citron DM, Warren YA, *et al*. Anaerobic bacteria cultured from the tongue dorsum of subjects with oral malodor. Anaerobe 2003; 9: 243-246.
- Vacirca D, Perdicchio M, Campisi E, *et al*. Favourable prognostic value of antibodies anti-HSP20 in patients with cystic echinococcosis: a differential immunoproteomic approach. Parasite Immunology 2011; 33: 193-198.
- Wang P, Sidney J, Dow C, *et al*. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. PLoS Computational Biololgy 2008; 4: e1000048.
- Yang J, Yan R, Roy A, *et al*. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature Methods 2015; 12: 7-8.
- Zhu Y, Tian Q, Qiao N, *et al*. Anti-Hsp20 antibody concentrations inversely correlated with tumor progression in ovarian cancer. European Journal of Gynaecological Oncology 2015; 36: 394-396.
- Żukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. Archives of Oral Biology 2018; 92: 8-17.

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

LGAC: Farmacoquímica de los Productos Naturales

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

QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA

(Biotecnología, Toxicología, Farmaceútica, Clínica)

"No existe una mejor prueba del progreso de una civilización que la del progreso de la cooperación"
Jouh Stuart Mill (1806-1873): filósofo y economista británico

Oligosacáridos con fines terapéuticos: Presente, usos y alcances

Therapeutic oligosaccharides: Present, uses and scope

[1]Olicón-Hernández Dario Rafael, [2]Guerra-Sánchez Guadalupe, [1*]Pardo Juan Pablo.

[1] Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica. Laboratorio 7. Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria CP, 04510, Ciudad de México, México.

[2]Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología. Laboratorio de bioquímica y biotecnología de hongos. Carpio y Plan de Ayala s/n. Santo Tomas, Miguel Hidalgo. CP, 11350, Ciudad de México, México

*E-mail de correspondencia: pardov@bq.unam.mx

RESUMEN

Una de las tendencias actuales en el tratamiento de diversas enfermedades se centra en el uso de compuestos naturales para evitar efectos adversos en la salud humana y buscar un equilibrio entre los diversos factores que interactúan en la misma. La eficacia decreciente de los medicamentos actuales, la resistencia a antibióticos y la búsqueda de opciones menos invasivas en los tratamientos de enfermedades ha tenido como respuesta el interés en compuestos bioactivos como los oligosacáridos. Los oligosacáridos son compuestos de origen natural con potencial terapéutico para diversos padecimientos, y en diferentes estudios se ha evidenciado su eficacia como anticancerígenos, antidiabéticos y antimicrobianos, entre otros usos. Actualmente se investigan métodos de producción más eficientes para obtener mezclas activas de estos compuestos que sean efectivas contra las enfermedades antes mencionadas. De manera general, su uso se ha limitado como suplemento alimenticio o coadyuvante de tratamientos tradicionales, sin embargo, su eficacia para la prevención de procesos tumorales y su función como prebióticos está más que demostrada. En el presente trabajo se revisa el uso de los oligosacáridos en los últimos años como elementos terapéuticos para diferentes padecimientos, y se analiza su estructura y métodos de obtención.

PALABRAS CLAVES

Oligosacáridos, quito-oligosacáridos, oligosacáridos de la leche materna, fructo-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos

ABSTRACT

A current trend in the treatment of various diseases has focused on the use of natural compounds to avoid adverse effects on human health and looking for a balance between the factors that support health. The decreasing efficacy of current drugs, antibiotic resistance, and the search for less invasive options in the treatment of diseases opened the interest in bioactive compounds such as oligosaccharides. Oligosaccharides are natural compounds with therapeutic potential for several diseases, and their value as anticancer, antidiabetic, and antimicrobial drugs, have been demonstrated. More efficient methods for the production of oligosaccharides are investigated in order to obtain active mixtures against the diseases mentioned before. In general, their use has been limited as a dietary supplement or in combination with traditional treatments, however, their efficacy for the prevention of tumor development and their role as prebiotics is more than proven. In the present work, we review the current state of the potentially therapeutic oligosaccharides, their structure and methods used to obtain the oligosaccharides, and finally, some of their applications as potential therapeutic compounds.

KEYWORDS

Oligosaccharides, chito-oligosaccharides, oligosaccharides from breast milk, fructo-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides

INTRODUCCIÓN

Características generales de los oligosacáridos

Los oligosacáridos (OS) se definen como cadenas cortas, formadas por entre 3 y 10 unidades monoméricas conocidas como monosacáridos y unidas mediante enlaces covalentes glucosídicos (Olicón-Hernández et al. 2017b; Wen et al. 2018). Los oligosacáridos tienen las características fisicoquímicas de los carbohidratos simples, ya que presentan la misma composición en cuanto a la abundancia de los grupos alcohol y sus enlaces característicos. Asimismo, pueden unirse a moléculas como aminoácidos, lípidos, grupos sulfatados o aminados, entre otros. La enorme variedad de oligosacáridos que se encuentra en la naturaleza se debe a que son muchos los monosacáridos que pueden formar parte de su estructura, a la topología de las uniones glucosídicas que se llevan a cabo entre los monosacáridos y a las modificaciones covalentes que ocurren en las moléculas del carbohidrato. De esta manera, se pueden encontrar oligosacáridos formados por un solo tipo de monómero o por diferentes tipos, en configuración lineal o ramificada (Figura. 1).

Los oligosacáridos tienen funciones biológicas importantes, como moléculas señalizadoras y estructurales. Asimismo, la gran mayoría de ellos son altamente hidrosolubles y representan la primera línea de interacción de las células con el medio externo (Gunasekara and Zhao 2017). En las células, para que los oligosacáridos lleven a cabo su función, a menudo se presentan como glucoconjugados unidos a otras macromoléculas, como los lípidos o las proteínas. Más allá de su conocida función como fuente de energía, se conoce que los oligosacáridos juegan papeles importantes en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos; esto incluye, entre otros, el crecimiento y la proliferación celular, las respuestas inmunitarias, la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales, la interacción con toxinas, el plegamiento y la degradación de proteínas, las comunicaciones célula-célula y las interacciones célula-patógeno (Wen *et al*. 2018).

Actualmente los oligosacáridos tienen funciones terapéuticas diversas y se han asociado con diversos efectos benéficos en la salud humana. Por ejemplo, se han utilizado como moléculas antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabéticas, prebióticos,

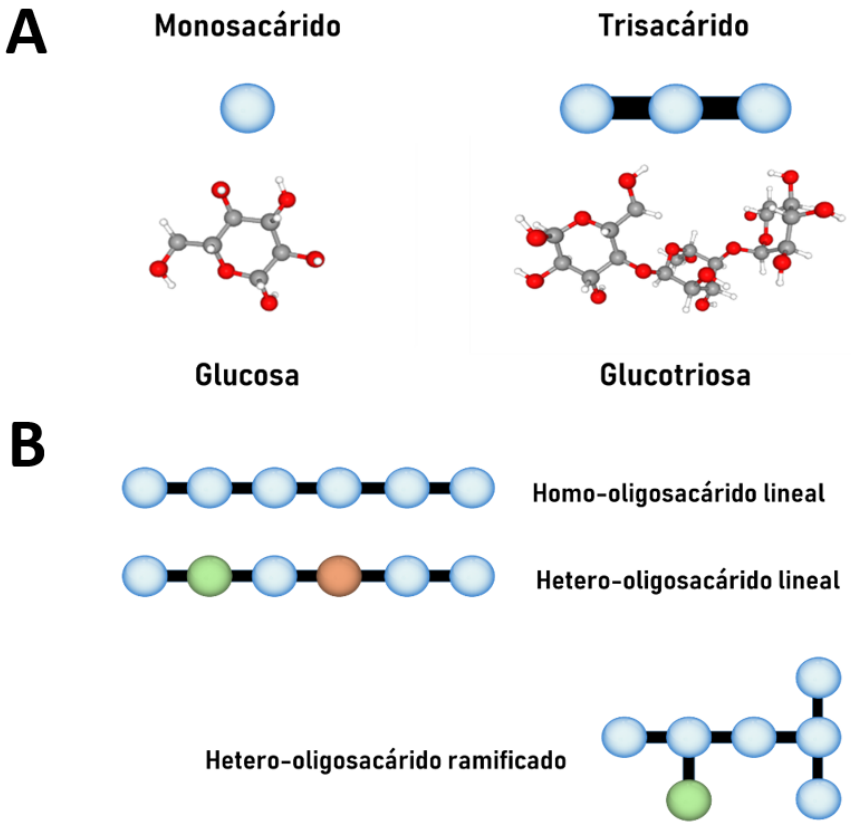


Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de un oligosacárido. A) Trisacárido lineal compuesto por D-glucosa. B) Representación de homo y hetero oligosacáridos lineales y ramificados.

inmunoreguladores, y componentes estructurales de biopelículas, entre otros (Bode 2015; Olicón-Hernández et al. 2019; Zou et al. 2016).

Producción de oligosacáridos

Se han estudiado diversas estrategias para la producción de oligosacáridos, tanto de forma natural como a nivel preparativo/industrial: **la biosíntesis** y la **hidrólisis polimérica**. En las vías biosintéticas, los oligosacáridos se construyen paso a paso mediante reacciones catalizadas por enzimas. Sin embargo, a diferencia de los oligonucleótidos y las proteínas, la biosíntesis de oligosacáridos no es un proceso guiado por un molde y su diversidad es muy amplia, por ejemplo, una hexosa tiene 4 centros quirales que dan como resultado 16 isómeros posibles, mientras que una pentosa puede tener hasta 8 isómeros.

Un enfoque general para el ensamblaje de oligosacáridos consiste en un donante glucosídico, un aceptor glucosídico y un activador. Es un proceso complejo que implica el acomodo estérico de los diversos componentes, pudiendo tener numerosas interferencias.

Las reacciones enzimáticas que conducen a la síntesis de los oligosacáridos se producen en soluciones acuosas y solo requieren un control limitado sobre las condiciones de reacción, como la temperatura, el pH del sistema y la presencia o ausencia de iones metálicos, siendo, las glicosiltransferasas (GTF, E.C. 2.4) las encargadas de realizar los enlaces glucosídicos a partir de los donadores activados (nucleótido-monosacárido) (Wen *et al*. 2018). Debido a que los monosacáridos pueden formar enlaces glucosídicos α o β con cualquier grupo hidroxilo de otro monosacárido, se incrementa el número de posibles estructuras y conformaciones de los oligosacáridos. Esta complejidad hace que la caracterización de estos compuestos sea extremadamente complicada (Gagneux and Varki 1999; Wen *et al*. 2018). En el caso de la hidrólisis polimérica, el sustrato primario para la obtención de oligosacáridos son polisacáridos que tengan su misma composición química pero mayor peso molecular. En este caso, el polisacárido se incuba con enzimas hidrolíticas que cortan en diferentes regiones de la cadena, dando como resultado una mezcla de oligosacáridos de diversos tamaños que después pueden ser sometidos a procesos de purificación.

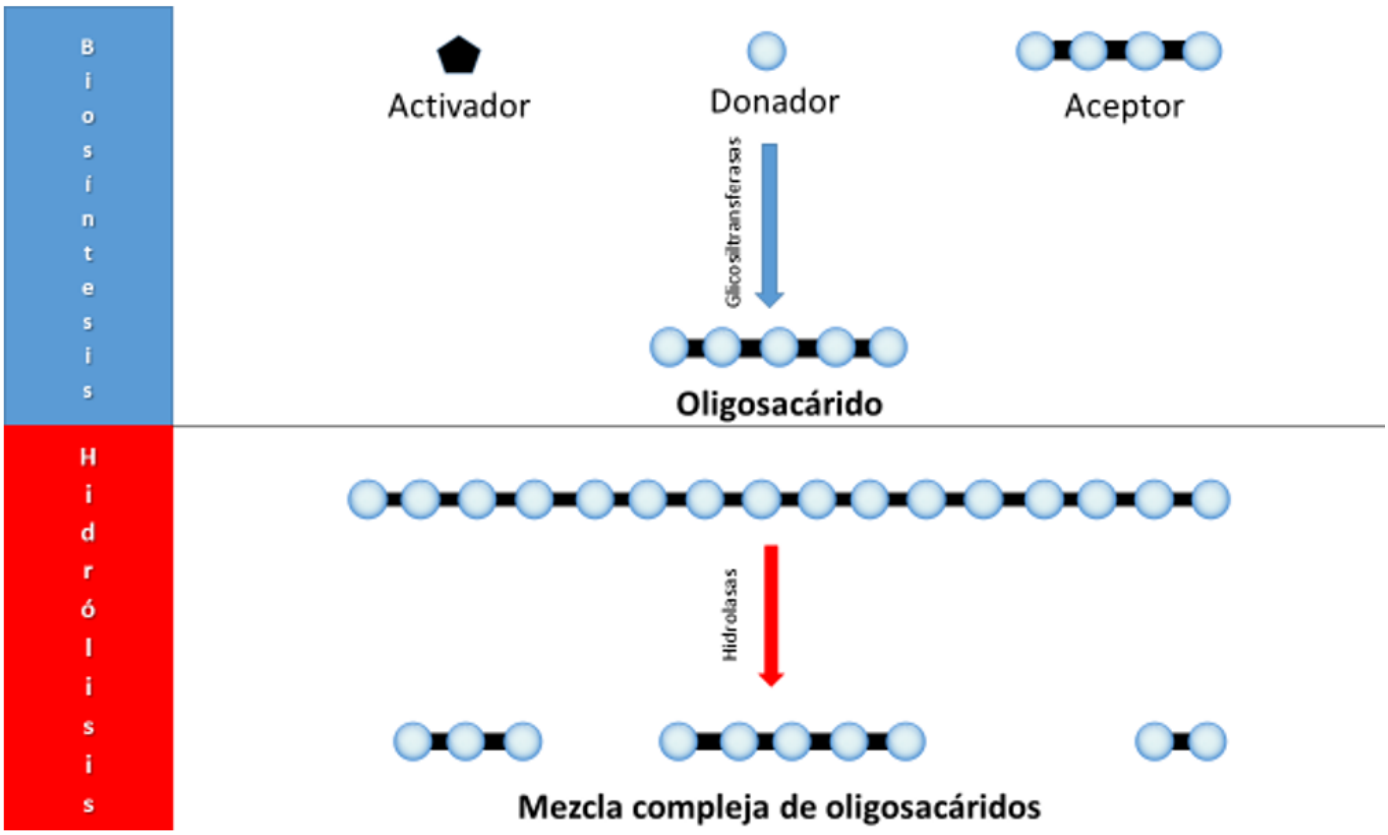


Figura 2.- Principales vías de obtención de oligosacáridos. La ruta biosintética parte del monosacáridos y polimeriza la cadena inicial hasta la formación del oligosacárido. La hidrólisis es el proceso contrario al romper la cadena polimérica en una mezcla compleja de oligosacáridos

La variedad y complejidad de los oligosacáridos resultantes depende directamente de las características intrínsecas del polisacárido, el tipo de enzimas hidrolíticas utilizadas, el tiempo de reacción, y el método de purificación, entre otros (Olicón-Hernández *et al*. 2017a; Olicón-Hernández *et al*. 2017b) (Figura 2).

Quito-oligosacáridos

El quitosano, polímero formado principalmente por glucosamina, se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina. Debido a que la glucosamina tiene un grupo amino en el carbono 2 de la glucosa, el quitosano, al encontrarse en soluciones ácidas diluidas, se convierte en un policatión con interesantes aplicaciones industriales y biomédicas. Esta molécula posee elevada viscosidad y es altamente cristalino, por lo que es insoluble a pH neutro (Olicón-Hernández *et al*. 2017b; Zou *et al*. 2016).

Los oligosacáridos que se derivan del quitosano son moléculas hidrosolubles de bajo peso molecular que tienen un interés creciente por sus múltiples aplicaciones en beneficio de la salud humana, entre las que destacan su acción como anticancerígenos y antimicrobianos (Azuma *et al*. 2015; Olicón-Hernández *et al*. 2019).

La producción de quito-oligosacáridos se basa en el uso de enzimas hidrolíticas que actúan sobre el quitosano y la posterior purificación de los componentes de las mezclas complejas. La variedad de enzimas que pueden hidrolizar al quitosano engloban a las quitosanasas, quitinasas, celulasas, y proteasas, entre otras. Otras estrategias proponen hidrolizar a la quitina (formada principalmente por N-acetil-glucosamina) para obtener una mezcla de quiti-oligosacáridos (oligosacáridos de quitina) y posteriormente tratar la mezcla con desacetilasas para la producción de quito-oligosacáridos. Modificaciones químicas que aumenten la carga de estos oligosacáridos son algunas vertientes que se han estudiado para potenciar sus efectos (Andrés *et al*. 2014; Naveed *et al*. 2019; Olicón-Hernández *et al*. 2017a; Pan *et al*. 2016; Xia *et al*. 2008).

Como agentes antimicrobianos, los quito-oligosacáridos se han probado como una alternativa para el tratamiento de agentes infecciosos como bacterias y hongos. En este contexto, se ha demostrado que una gran cantidad de bacterias Gram-negativas clínicamente importantes (*Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) y Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus epidermis*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus)* son susceptibles al tratamiento con esas moléculas, en concentraciones que pueden variar desde los 1 mg/mL hasta los 50 mg/mL (Naveed *et al*. 2019; Zou *et al*. 2016).

Con respecto a su actividad antifúngica, se ha observado que los quito-oligosacáridos son más efectivos a medida que su peso molecular es más bajo y su grado de desacetilación es más alto. Se ha comprobado que estos compuestos son efectivos contra cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1.3 mg/ml a 1.5 mg/ml de quito-oligosacáridos. Sin embargo, la respuesta de cada hongo a estas moléculas es tan variado que no se puede establecer un mecanismo preciso sobre su accionar (Naveed *et al*. 2019; Olicón-Hernández *et al*. 2015; Wang *et al*. 2007).

El modo de acción de la mezcla de quito-oligosacáridos contra los patógenos no está claro, sin embargo, la actividad depende de varios factores, como el grado de polimerización y desacetilación, el tipo de microorganismo y las propiedades fisicoquímicas de la pared celular. El mecanismo más aceptado de la actividad antimicrobiana está relacionado con el grupo amino libre y la carga positiva de los oligosacáridos, que puede alterar la permeabilidad de la membrana plasmática, causando la fuga de constituyentes celulares que finalmente conduce a la muerte de las células. Uno de los principales factores para que se produzca la muerte celular en organismos como las levaduras y otros hongos es la distribución de carga de la pared celular (Olicón-Hernández *et al*. 2019).

En lo que respecta a su actividad anticancerígena, se ha evidenciado el efecto citotóxico de los quito-oligosacáridos frente a células de cáncer de vejiga, próstata, pulmón, hígado, útero, colorrectal y varios tipos de leucemias. En general, se ha observado que concentraciones entre los 25 y 50 µg/mL son efectivas para inhibir el 50% de la proliferación celular, dependiendo del tipo de tumor (Naveed *et al*. 2019; Park *et al*. 2011). Se desconoce el mecanismo exacto de la inhibición de la proliferación de células cancerosas, pero puede estar asociado con las cargas electrostáticas de los quito-oligosacáridos, los cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática de las células tumorales y la regulación de la expresión de factores tumorales como la metaloproteinasa-9 y / o el factor de crecimiento endotelial vascular. Además,

se ha propuesto que los quito-oligosacáridos, como elementos de nanomateriales, son capaces de aumentar la biodisponibilidad de medicamentos anticancerígenos como paclitaxel y doxorrubicina (Olicón-Hernández *et al*. 2019; Liaqat and Eltem 2018; Naveed *et al*. 2019).

Oligosacáridos de la leche materna humana

Los oligosacáridos de la leche materna humana (Human Milk Oligosaccharides, HMOs) son carbohidratos complejos no conjugados abundantes en la leche materna. Un litro de leche humana puede contener entre 10 y 15 g de HMOs. Estos oligosacáridos contienen principalmente galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y el ácido N-acetil-neuramínico, derivado del ácido siálico (Sia). Un elemento importante en su estructura es que los HMOs poseen el disacárido lactosa en su extremo reductor, el cual puede ser alargado mediante la adición de otros disacáridos. Esto confiere una complejidad estructural a los HMOs, ya que pueden tener elongaciones lineales o ramificadas que pueden modificarse aún más por la adición de fucosa o ácido siálico (Bode 2015).

Una vez ingeridos, los HMOs pasan al intestino delgado proximal, tras resistir la digestión gástrica y pancreática, donde su principal función es como un prebiótico de las bacterias benéficas, pero además mejoran la respuesta inmunitaria a las vacunas, favorecen una función mejorada de la barrera intestinal y una protección contra la infección por enteropatógenos. Aproximadamente el 1% de las HMOs ingeridas se absorben, alcanzan la circulación sistémica y se excretan por la orina. Dado que los HMOs se absorben y aparecen en la circulación sistémica, es probable que lleguen a muchos órganos además del intestino, incluidos el hígado y el cerebro, así como las vías respiratorias y urinarias, lo que indicaría que pueden tener muchas más funciones que las que desempeñan a nivel intestinal (Bode 2015; Charbonneau *et al*. 2016).

Como elementos importantes para la microbiota intestinal, los HMOs tienen un papel preponderante en el desarrollo de los microorganismos benéficos para la salud humana. Estudios comparativos de infantes alimentados con leche materna o con fórmulas comerciales deficientes en HMOs muestran que la presencia de estos oligosacáridos aumenta la proporción de *Bacteroides* (bacterias Gram negativas en forma de bacilo), especialmente *Bifidobacterium,* y disminuyen significativamente las poblaciones de bacterias como *Clostridium*, *Lachnospiracea incertae*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Veillonella* (Wang *et al*. 2015).

Por otro lado, se ha estudiado la relación que existe entre el desarrollo de la diabetes tipo I y la deficiencia del desarrollo de una microbiota sana en las primeras etapas de la vida, que tiene una relación directa con el consumo de HMOs. Se ha demostrado que la alimentación con una mezcla al 1% de HMOs de cadenas largas y cortas por un período de seis semanas retrasó y / o suprimió el desarrollo de la diabetes mellitus tipo I en ratones diabéticos no obesos y redujo la aparición de insulitis pancreática severa en la edad adulta. Estos efectos protectores se asociaron con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, disminución de la inflamación e inducción de citoquinas antidiabéticas (Xiao *et al*. 2018).

Como elementos terapéuticos, los HMOs se han estudiado para reducir las respuestas alérgicas a diferentes compuestos alimenticios. En este contexto, se ha demostrado que el uso de la 2'-fucosillactosa y la 6'-sialilactosa reducen los síntomas de alergia alimentaria a ovoalbúmina a través de la inducción de células reguladoras de IL-10 y la estabilización indirecta de los mastocitos en modelos murinos, siendo una alternativa interesante para el tratamiento de estos padecimientos (Castillo-Courtade *et al*. 2015).

A pesar de que se conoce la efectividad de estas moléculas, su uso terapéutico es limitado debido a dos factores principales: 1) La complejidad de la mezcla de HMOs, en donde se han descrito más de 100 tipo diferentes, pudiendo tener un gran número de combinaciones distintas, así como su uso individual y 2) La accesibilidad limitada a grandes cantidades de HMOs. Actualmente, los procesos enzimáticos y quimioenzimáticos para la síntesis de HMOs ha reducido esta brecha, sin embargo, los procesos biotecnológicos con sistemas de células enteras o enzimas bacterianas aún deben perfeccionarse para cubrir las necesidades actuales (Chen 2015; Petschacher and Nidetzky 2016).

Fructo-oligosacáridos

Los fructo-oligosacaridos (FOS) son carbohidratos no digeribles que representan una de las principales clases de oligosacáridos bifidogénicos. En general, son oligómeros compuestos principalmente por unidades de fructosa con una molécula de glucosa en el extremo

terminal unida por enlaces glucosídicos β- (2-1). También se conocen como fructanos, oligofructanos y glucofructanos. La inulina es uno de los miembros más conocidos de este grupo, aunque los autores difieren si se considera un oligosacárido o un polisacárido. Para fines de este trabajo consideramos a la inulina como parte de los FOS. Estos compuestos son fitoquímicos de reserva presentes en plantas, pudiéndose distinguir 4 grupos principales: inulinas, levanos, mezclas de levanos y los llamados neo-FOS (Flores-Maltos *et al*. 2016).

Los FOS se encuentran en alimentos como la cebolla, el ajo, el plátano, la alcachofa y algunos cereales. Estos pueden fabricarse por tres métodos: 1) extracción de materiales vegetales ricos en inulina, 2) por síntesis enzimática a partir de sacarosa por la acción de fructosiltransferasas, y 3) por degradación enzimática de la inulina. Las 2 últimas son los principales métodos de obtención de mezclas comerciales de FOS alimenticios. Los FOS producidos a partir de inulina tienen un alto grado de polimerización (DP <9) en comparación con los producidos a partir de sacarosa (DP <4). El grado de polimerización juega un papel importante en la fermentación intestinal de los FOS (Singh *et al*. 2016).

La función principal de los FOS es como prebiótico para la microbiota del intestino. En este contexto, un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente la salud del organismo al estimular selectivamente el crecimiento y / o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon (Singh *et al*. 2016). A diferencia de los HOMs, los FOS se consumen en todas las etapas de la vida para mantener una comunidad microbiana saludable. Los FOS pueden escapar de la digestión enzimática en el tracto gastrointestinal superior, llegando al colon intacto, antes de someterse a la fermentación microbiana. La ingesta de FOS provoca un efecto bifidogénico al estimular selectivamente la proliferación de bifidobacterias, un grupo de bacterias beneficiosas que se encuentran naturalmente en el colon humano. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), los productos finales de la fermentación de FOS por la microbiota intestinal, también pueden favorecer el crecimiento de bacterias promotoras de la salud como *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., al tiempo que reduce o mantiene las poblaciones patógenas (por ejemplo, *Clostridium* spp. y *Escherichia coli*) en niveles bajos (Caetano *et al*. 2016).

Un efecto terapéutico importante que se ha descrito para los FOS y que tiene relación directa con su efecto prebiótico es la prevención del cáncer colorrectal (CCR). La interacción entre la microbiota intestinal, el epitelio intestinal y el sistema inmune innato del hospedero está asociada con varias enfermedades humanas, incluidas la colitis y el CCR secundaria a disbiosis (desequilibrio entre microbiota sana y patógenos). Los FOS promueven el crecimiento de bifidobacterias, un género de bacterias pleomórficas Gram-positivas que juegan un papel regulador en el colon al inhibir el crecimiento de bacterias que favorecen la carcinogénesis. Se ha sugerido que las bifidobacterias disminuyen la expresión de enzimas metabolizadoras de xenobióticos y estimulan el sistema inmune en la mucosa del colon (Caetano et al. 2016; Raman *et al*. 2013).

El consumo de FOS también conduce a una mayor producción de SCFA, principalmente acetato, propionato y butirato. Hallazgos recientes sugieren que los SCFA pueden suprimir la inflamación y el cáncer al aumentar la respuesta inmune local, disminuir el pH del colon y promover la excreción de amoníaco. Durante la carcinogénesis, la producción de SCFA en el colon por bacterias beneficiosas disminuye la proliferación celular e induce la apoptosis, especialmente en las células tumorales de colon. De hecho, también se ha demostrado que el aumento de la producción de butirato disminuye el desarrollo de focos de criptas aberrantes preneoplásicas y retrasa la progresión del tumor en ratas (Caetano et al. 2016; Tang *et al*. 2011)

Por otra parte, se estudiaron los efectos de los FOS en el desarrollo de la obesidad en modelos murinos. Se determinó que la presencia de FOS podía reducir la concentración plasmática de triacilgliceroles en ratas alimentadas con una dieta oral de emulsión lipídica de 2.5 g/kg de peso corporal. En el segundo experimento, ratones macho C57BL/6J se alimentaron con una dieta "occidental" alta en grasas con o sin suplementación de FOS al 2.5% durante 12 semanas. El peso corporal y el porcentaje de grasa corporal fueron menores en ratones alimentados con FOS que en los controles. Además, el peso del tejido adiposo visceral, incluyendo el hígado, así como el contenido de triacilgliceroles del mismo hígado fueron significativamente menores en el grupo con suplemento de FOS (Nakamura *et al*. 2017).

Un aspecto innovador del uso de FOS es el tratamiento de trastornos emocionales como la depresión, usando

oligosacáridos derivados de la inulina. Empleando modelos murinos conductuales de depresión se observó que extractos ricos en FOS, obtenidos del yacón (*Smallanthus sonchifolius*), en concentraciones de 25, 50 o 100 mg/kg, redujo significativamente la respuesta estrés-depresión del ratón ocasionada por pruebas TST (prueba de suspensión) y FST (pruebas de nado forzado), de forma dependiente de la dosis, sin evidencias de efectos estimulantes sobre la actividad locomotora, lo que sugiere que los FOS pueden ser una alternativa para el tratamiento de padecimientos psicoemocionales (An *et al*. 2016).

Xilo-oligosacáridos

Los xilo-oligosacáridos (XOS) son oligómeros compuestos de unidades de xilosa a través de enlaces β- (1 → 4) –xilosídicos. Estos son los productos de hidrólisis del xilano, un polisacárido con una cadena lineal y diferentes ramificaciones y grupos laterales, presente en diversas proporciones en la mayoría de los materiales lignocelulósicos (Samanta *et al*. 2015). Los XOS pueden producirse mediante métodos químicos, enzimáticos o combinaciones de ellos a partir de compuestos agrícolas diversos. Además de estos métodos, la biomasa de plantas agrícolas ricas en xilano también podría someterse a autohidrólisis directa a alta temperatura y presión para producir XOS (Jayapal *et al*. 2013).

Siendo parte importante de la fibra no digerible, los XOS se utilizan ampliamente como prebióticos en diversos alimentos. El potencial de estos compuestos radica no solo en sus propiedades nutracéuticas, sino también en sus beneficios económicos, ya que constituyen una oportunidad para que las industrias agroalimentarias otorguen un valor agregado a los desechos e indirectamente mejoren el medio ambiente (Wan Azelee *et al*. 2016). La hidrólisis enzimática directa del xilano en dichos materiales es difícil debido a que la lignina es una barrera al ataque enzimático, por lo que se necesita un tratamiento previo para romper la compleja red de polimerización y facilitar la exposición de la celulosa y hemicelulosas para la hidrólisis enzimática (Antov and Đorđević 2017).

Como se mencionó anteriormente, el principal uso de los XOS es como fibra en la dieta y se ha demostrado su efecto benéfico en el desarrollo de una microbiota saludable. Por ejemplo, se investigaron los efectos del consumo de granos de arroz enriquecidas con XOS en el tracto intestinal de humanos sanos, por un periodo de 6 semanas. Se analizaron muestras fecales de los individuos en diferentes periodos de tiempo durante la alimentación con XOS y se realizó un análisis de las poblaciones microbianas. Los resultados mostraron que la ingestión diaria durante 6 semanas de la papilla de arroz enriquecida con XOS indujo aumentos significativos en los recuentos bacterianos fecales de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., así como disminuciones en *Clostridium perfringens,* sin cambiar los recuentos bacterianos anaeróbicos totales, concluyendo que la ingesta de XOS ayudó a equilibrar la microbiota intestinal funcionando como un prebiótico potencial en diferentes alimentos (Lin *et al*. 2016).

Por otro lado, los XOS también se han evaluado para contrarrestar la propagación del cáncer de colon. En modelos animales se indujo la formación de tumores cancerosos por inyecciones sucesivas de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) a una concentración de 20 mg/kg de peso corporal a intervalos semanales en ratas Wistar machos. La dieta de los modelos murinos se enriqueció con XOS al 5% y 10% (p/p) durante 45 días después de la inyección del DMH. Se observaron efectos beneficiosos de los XOS en la dieta sobre la microbiota y los focos de criptas aberrantes (ACF) en el colon de animales. La dieta con XOS aumentó significativamente la población de bifidobacterias y redujo la incidencia y la multiplicidad de la formación de ACF en el colon. La suplementación también disminuyó el nivel de peroxidación lipídica y aumentó las actividades de la glutatión-S-transferasa y de la catalasa en la mucosa del colon y el hígado, lo que pudo haber contribuido a inhibir la carcinogénesis en el colon, mostrando efectos benéficos en el tratamiento de este tipo de cáncer (Aachary *et al*. 2015).

Otras actividades asociadas a los XOS es su capacidad antioxidante y antibacteriana *in vitro*. En este sentido, se ha observado que mezclas de XOS mostraron una importante actividad antioxidante medida con la prueba de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), con una IC50 de 0.45 mg/mL y un alto blanqueamiento de β-caroteno (IC50 = 2.2 mg/mL). Además, se evidenció una alta actividad antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Kallel *et al*. 2015).

Otros oligosacáridos

Existen oligosacáridos menos frecuentes que se han estudiado como potenciales agentes terapéuticos empleando diversos métodos de preparación. En la tabla 1 se aprecian las principales características y usos de estos oligosacáridos. Esto sugiere que hay un gran potencial en el estudio de estas moléculas y que la búsqueda de nuevas propiedades puede contribuir a la utilización de materiales con beneficios a la salud de humana.

Tabla 1. Aplicaciones terapéuticas de diferentes tipos de oligosacáridos

Nombre	Origen	Estructura	Método de obtención	Aplicación terapéutica	Referencia
Oligosacáridos de carragenano	Pared celular de algas rojas (*Rhodophyta*)	Cadenas lineales sulfatadas de 3 β-D-galactosa (Unidad G) unida a 4 α-D-galactosa (unidad D).	Degradación del κ-carragenano por despolimerizaciones químicas y enzimáticas	Protección contra especies reactivas de oxígeno y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas	Sun et al. 2015
Oligosacáridos de pectina	Tejidos vegetales de cítricos y frutos	Homogalacturonana (ácido D-galacturónico); xilogalacturonano (D-galacturonato unido a β-D-xilopiranosa) y rhamnogalacturonan (formado por secuencias repetitivas del disacárido α (1-4) -D- ácido galacturónico-α (1-2) -L-ramnosa con una variedad de diferentes cadenas de glucano.	Hidrólisis enzimática, la hidrólisis ácida, procesamiento hidrotérmico o degradación física.	Prebiótico, antiinflamatorio, anticancerígeno	Gómez et al. 2016
Oligosacáridos de hialuronano (ácido hialurónico)	Tejidos animales	Es un glicosaminoglicano lineal no sulfurado que consiste en unidades repetitivas de (β, 1–4) -D-ácido glucurónico- (β, 1–3) -N-acetil-D- glucosamina.	Hidrolisis química o enzimática	Proangiogénicos para el tratamiento de heridas y pie diabético	Gao et al. 2006; Wang et al. 2016
Isomalto oligosacáridos (IMO)	Almidón. Alimentos fermentados, cereales, miel	Unidades de α-D-glucosa unidas mediante enlaces (1,4) y (1,6).	Hidrolisis química o enzimática. Se encuentran también de forma natural en los alimentos	Prebiótico, control de diabetes e inmuno-moduladores	Bharti et al. 2015

CONCLUSIONES

Los oligosacáridos son compuestos de origen natural que se pueden usar con fines terapéuticos contra diversas enfermedades, siendo su actividad prebiótica y anticancerígena dos de los efectos más estudiados en años recientes. Su gran diversidad estructural y múltiples variantes en los métodos de producción y purificación, sumado a sus aplicaciones nutracéuticas y terapéuticas, hacen de su estudio un campo amplio para profundizar en su obtención y aplicación. Más estudios sobre sus efectos deben ser conducidos para mejorar su uso potencial para el tratamiento de diversos padecimientos y así mejorar la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos CONACyT 254904 (JPP) y 256520 (GGS), el proyecto SIP 20190200 (GGS) y el proyecto PAPIIT-DGAPA IN222117 (JPP). El primer autor (DROH) quiere agradecer al programa de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo de la beca posdoctoral.

REFERENCIAS

- Aachary AA, Gobinath D, Srinivasan K, Prapulla SG. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 2015; 5 (2): 146-152.
- An L, Yang JC, Yin H, Xue R, Wang Q, Chen S, Zhang Y, Yang M. Inulin-Type Oligosaccharides Extracted from Yacon Produce Antidepressant-Like Effects in Behavioral Models of Depression. Phytotherapy Research 2016; 30 (12): 1937-1942.
- Andrés E, Albesa-Jové D, Biarnés X, Moerschbacher BM, Guerin ME, Planas A. Structural Basis of Chitin Oligosaccharide Deacetylation. Angewandte Chemie 2014; 53 (27): 6882-6887.
- Antov MG, Đorđević TR. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. Food Chemistry 2017; 235: 175-180.
- Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto YJJofb. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. Journal of Functional Biomaterials 2015; 6 (1): 33-49.
- Bharti SK, Krishnan S, Kumar A, Gupta AK, Ghosh AK, Kumar A. Mechanism-based antidiabetic activity of Fructo- and isomalto-oligosaccharides: Validation by in vivo, in silico and in vitro interaction potential. Process Biochemistry 2015; 50 (2): 317-327.
- Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. Early Human Development 2015; 91 (11): 619-622.
- Caetano BF, De Moura NA, Almeida AP, Dias MC, Sivieri K, Barbisan LFJN. Yacon (Smallanthus sonchifolius) as a food supplement: health-promoting benefits of fructooligosaccharides. Nutrients 2016; 8 (7): 436.
- Castillo-Courtade L, Han S, Lee S, Mian FM, Buck R, Forsythe P. Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model. Allergy 2015; 70 (9): 1091-1102.
- Charbonneau MR, O'Donnell D, Blanton LV, Totten SM, Davis JC, Barratt MJ, Cheng J, Guruge J, Talcott M, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Wu C, Struckmeyer T, Barile D, Mangani C, Jorgensen J, Fan YM, Maleta K, Dewey KG, Ashorn P, Newgard CB, Lebrilla C, Mills DA, Gordon JI. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. Cell 2016; 164 (5): 859-871.
- Chen X. Chapter Four - Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis. En: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. California, USA: Academic Press, 2015: 113-190.
- Flores-Maltos DA, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Teixeira JA, Aguilar CN. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. Critical Reviews in Biotechnology 2016; 36 (2): 259-267.
- Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. Glycobiology 1999; 9 (8): 747-755.
- Gao F, Cao M, Yang C, He Y, Liu Y. Preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides for angiogenesis study. Journal of Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials 2006; 78B (2): 385-392.
- Gómez B, Gullón B, Yáñez R, Schols H, Alonso JL. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. Journal of Functional Foods 2016; 20: 108-121.
- Gunasekara RW, Zhao Y. A General Method for Selective Recognition of Monosaccharides and Oligosaccharides in Water. Journal of the American Chemical Society 2017; 139 (2): 829-835.
- Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh KP, Sampath KT. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. Industrial Crops and Products 2013; 42: 14-24.
- Kallel F, Driss D, Chaabouni SE, Ghorbel R. Biological Activities of Xylooligosaccharides Generated from Garlic Straw Xylan by Purified Xylanase from Bacillus mojavensis UEB-FK. Applied Biochemistry and Biotechnology 2015; 175 (2): 950-964.

- Liaqat F, Eltem R. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. Carbohydrate Polymers 2018; 184: 243-259.
- Lin, S. H., Chou, L. M., Chien, Y. W., Chang, J. S., & Lin, C. I. (2016). Prebiotic Effects of Xylooligosaccharides on the Improvement of Microbiota Balance in Human Subjects. *Gastroenterology Research and Practice*, *2016*, [5789232]. https://doi.org/10.1155/2016/5789232
- Nakamura Y, Natsume M, Yasuda A, Ishizaka M, Kawahata K, Koga J. Fructooligosaccharides suppress high-fat diet-induced fat accumulation in C57BL/6J mice. 2017; 43 (2): 145-151. doi:10.1002/biof.147
- Naveed M *et al*. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. International Journal of Biological Macromolecules 2019; 129: 827-843.
- Olicón-Hernández DR, Zepeda Girud LF, Pedroza-Torres A, Vázquez-Landaverde PA, Guerra-Sánchez G, Pardo Juan Pablo. Production of chitosan-oligosaccharides by the chitin-hydrolytic system of Trichoderma harzianum and their antimicrobial and anticancer effects. Carbohydrate Research 2019; 486: 107836.
- Olicón-Hernández DR, Hernández-Lauzardo AN, Pardo JP, Peña A, Velázquez-del Valle MG, Guerra-Sánchez G. Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of Ustilago maydis. International Journal of Biological Macromolecules 2015; 79: 654-660.
- Olicón-Hernández DR, Vázquez-Landaverde PA, Cruz-Camarillo R, Rojas-Avelizapa LI. Comparison of chito-oligosaccharide production from three different colloidal chitosans using the endochitonsanolytic system of Bacillus thuringiensis. Preparative Biochemistry & Biotechnology 2017a; 47 (2): 116-122.
- Olicón-Hernández DR, Zepeda Giraud L, Guerra-Sánchez G. Current applications of chitosan and chito-oligosaccharides. Journal of Drug Design and Research 2017b; 4 (2): 1039.
- Pan AD, Zeng H-Y, Foua GB, Alain C, Li Y-Q. Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics. Carbohydrate Polymers 2016; 135: 199-206.
- Park JK, Chung MJ, Choi HN, Park YI. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. International Journal of Molecular Sciences 2011; 12 (1): 266-277.
- Petschacher B, Nidetzky B. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. Journal of Biotechnology 2016; 235: 61-83.
- Raman M, Ambalam P, Kondepudi KK, Pithva S, Kothari C, Patel AT, Purama RK, Dave JM, Vyas BR. Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. Gut Microbes 2013; 4 (3): 181-192.
- Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, Sridhar M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 2015; 5 (1): 62-71.
- Singh RS, Singh RP, Kennedy JF. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. International Journal of Biological Macromolecules 2016; 85: 565-572.
- Sun Y, Yang B, Wu Y, Liu Y, Gu X, Zhang H, Wang C, Cao H, Huang L, Wang Z. Structural characterization and antioxidant activities of κ-carrageenan oligosaccharides degraded by different methods. Food Chemistry 2015; 178: 311-318.
- Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D. The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. Autophagy 2011; 7 (2): 235-237.
- Wan Azelee NI, Jahim JM, Ismail AF, Fuzi SFZM, Rahman RA, Md Illias R. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. Industrial Crops and Products 2016; 81: 11-19.
- Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, Ivanov I, Donovan SM. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. 2015; 60 (6): 825.

- Wang Y, Han G, Guo B, Huang J. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. Pharmacological Reports 2016; 68 (6): 1126-1132.
- Wang Y, Zhou P, Yu J, Pan X, Wang P, Lan W, Tao SJ. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from Pseudomonas CUY8. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 2007; 16: 174-177.
- Wen L, Edmunds G, Gibbons C, Zhang J, Gadi MR, Zhu H, Fang J, Liu X, Kong Y, Wang PG. Toward Automated Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. Chemical Reviews 2018; 118 (17): 8151-8187.
- Xia W, Liu P, Liu J. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. Bioresource Technology 2008; 99 (15): 6751-6762.
- Xiao L, Van't Land B, Engen PA, Naqib A, Green SJ, Nato A, Leusink-Muis T, Garssen J, Keshavarzian A, Stahl B, Folkerts G. Human milk oligosaccharides protect against the development of autoimmune diabetes in NOD-mice. Scientific Reports 2018; 8 (1): 3829.
- Zou P, Yang X, Wang J, Li Y, Yu H, Zhang Y, Liu G. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. Food Chemistry 2016; 190: 1174-1181.

Cuerpo académico UJE- CA- 134 Química y Tecnología de Productos Alimenticios LGAC: Tecnología de Alimentos y sus biocomponentes		
Nombre proyecto	**Investigador responsable**	
Contenido de licopeno en tomate orgánico y con fertilización química.	Guadalupe Candelas Cadillo	
PROPIEDADES FUNCIONALES Y DE TEXTURA DE SÁBILA (*Aloe vera barbadensis* Miller) FRESCA Y PROCESADA.		
Extracción de biocomponentes de diferentes matrices alimentarias aplicando ultrasonido de potencia	José Rafael Minjares Fuentes	
Aplicación de ultrasonidos de potencia al gel de Aloe vera		
Efecto de la temperatura y la velocidad de alimentación del secado por aspersión en las propiedades funcionales, la concentración de aloemodina y aloína, la actividad antioxidante y el perfil de carbohidratos del jugo de gel de *Aloe barbadensis Miller*	Juan José Martínez García	
Construcción de un extractor sólido – líquido didáctico	Víctor Manuel Rodríguez González	
Textura, nivel de agrado y vida de anaquel de un mazapán de nuez (*Carya illinoinensis*) adicionado con diferentes concentraciones de inulina y leche en polvo	Juan Pablo Alemán Morán	

Efecto de la harina obtenida de la semilla de yaca (Artocarpus heterophyllus) sobre cáncer cervicouterino

[1]Trejo-Rodríguez Ibna Suli, [2]*Alcántara-Quintana Luz Eugenia, [3]Algara-Suárez Paola, [4]Grajales-Lagunes Alicia.

[1]Estudiante de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava 6, San Luis Potosí, CP 78210, México.

[2]*Catedra, CONACyT, Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Niño Artillero 130, CP 78240, México.

[3]Profesor Investigador, Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Niño Artillero 130, CP 78240, México.

[4]Profesor Investigador, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Niño Artillero 130, CP 78240, México.

*E mail de correspondencia: luz.alcantara@uaslp.mx

RESUMEN

Artocarpus heterophyllus es un árbol frutal de hoja perenne cultivado en muchas regiones tropicales, de origen asiático, perteneciente a la familia de las Moráceas. Estudios previos han demostrado que algunas de sus composiciones exhiben actividades potenciales de inhibición de la tirosinasa, y otros estudios han demostrado que sus xantonas y flavonoides confieren una actividad antiproliferativa, lo que sugiere un probable potencial anticancerígeno. Objetivo: Evaluar el efecto de la harina obtenida de la semilla de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) sobre el conteo y la viabilidad celular en cáncer cervicouterino. Material y métodos: Los posibles efectos anticancerígenos de los compuestos aislados de Artocarpus heterophyllus se examinaron en este trabajo. Se prepararon cuatro concentraciones diferentes (50, 100, 500 µg/ml y 1 mg/ml) en medio de cultivo RPMI suplementado con suero más antibióticos; y se evaluaron sus efectos en una línea celular neoplásica (HeLa) y otra no neoplásica (HaCaT.) Se utilizó el cisplatino como control anticancerígeno. Los métodos de evaluación fueron el recuento de células en cámara de Neubauer a las 24, 48 y 72 horas y una prueba de MTT a las mismas horas. Resultados: Se observó un incremento significativo dosis-dependiente en el número y viabilidad de células neoplásicas ($p \leq 0.0090$ y $p \leq 0.018$ respectivamente), principalmente en el tratamiento de 50 mg/ml. No se observó ningún cambio para las células HaCaT, comparadas con el control. El cisplatino a las tres concentraciones (20, 40 y 60 mg/ml), disminuyó la viabilidad celular en ambas líneas ($p \leq .001$). Conclusión: En este trabajo se sugiere que la harina de semillas de yaca (todos sus componentes) no tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerosas (HeLa), al contrario es mitogénica; sin embargo promueven la viabilidad de células epiteliales por lo que probablemente también ejerzan este efecto en células sanas de cualquier epitelio de revestimiento., tal como lo hacen en las HaCaT; por lo tanto, su probable actividad antineoplásica depende de la especie de planta, del tipo de obtención de la harina y de otras condicionantes, por lo que la investigación del uso de la harina de yaca, en este caso requiere de mayores estudios.

Palabras clave: cáncer, *Arthocarpus heterophyllus*, conteo y viabilidad celular.

ABSTRACT

Artocarpus heterophyllus is an evergreen fruit tree cultivated in many tropical regions, of Asian origin, belonging to the family of the Moraceas. Previous studies have shown that some of its compositions exhibit potential tyrosinase inhibition activities, and other studies have shown that its xanthones and flavonoids confer antiproliferative activity, suggesting an anticancer potential. Objective: To evaluate the effect of flour obtained from jackfruit seed (*Artocarpus heterophyllus*) on the count and cell viability in cervical cancer. Material and methods: The possible anticancer effects of the isolated compounds of *Artocarpus heterophyllus* were examined in this work. Four different concentrations (50, 100, 500 µg/ml and 1 mg/ml) were prepared and their effects on a neoplastic cell line (HeLa) and a non-neoplastic cell line (HaCaT.) Were

evaluated and cisplatin was used as an anticancer control. The evaluation methods were the cell count of the Neubauer chamber at 24, 48 and 72 hours and an MTT test at the same hours. Results: A significant dose-dependent increase was observed in the number and viability of neoplastic cells ($p \leq 0.0090$ and $p \leq 0.018$ respectively), mainly in the treatment of 50 ug/ml. And no change was observed for HaCaT cells, compared to control. Cisplatin at the three concentrations (20, 40, and 60 µg / ml), decreased cell viability in both lines ($p \leq .001$). Conclusion: In this work it is suggested that jackfruit flour (all its components) do not have the capacity to inhibit the proliferation of cancer cells (HeLa), on the contrary it is mitogenic; however, they promote the viability of epithelial cells, so they probably also exert this effect in healthy cells of any epithelium lining, as they do in HaCaT; therefore, it´s probable antineoplastic activity depends on the plant species, the type of production of the flour and other conditions, so the investigation of the use of jackfruit flour, in this case, requires further studies.

Keywords: *Arthocarpus heterophyllus*, cancer, cell count and viability.

INTRODUCCIÓN

El fruto de la yaca (*Artocarpus heterophyllus*), proviene de una planta que pertenece a la familia Morácea. De manera abundante crecen en diversas partes del sudeste asiático (Rahaman et al, 1999), en México, sobre todo en zonas tropicales, se ha incrementado la producción y consumo de esta como suplemento alimenticio (Ulloa et al; 2007).

La semilla de la yaca es lisa, ovalada, de color blanco y marrón claro, puede medir entre 2-4 cm de longitud y entre 1.25-2 cm de espesor (Jagadeesh et al., 2007). Dentro de una fruta es posible encontrar entre 100 y 500 semillas (Crane y Balerdi, 2000). El peso promedio de la yaca oscila entre 4 y 10 kg y algunas veces puede alcanzar hasta 25 kg. Se ha reportado que las semillas de yaca son una buena fuente de almidón y fibra dietética, también se ha reportado el contenido de proteínas (7-12%), carbohidratos (38%) y lípidos (1%; Baliga et al., 2011).

Diversos autores han mencionado que las semillas de yaca tienen un gran valor comercial, nutricional y medicinal (Kumar et al., 1988; Ocloo et al; 2010). Así que se ha documentado que *Artocarpus heterophyllus* contiene flavonoides, estilbenoides, y arilbenzofuranos, y a estos se les atribuye sus propiedades antioxidantes (Panthong, K et al, 2013), anti-inflammatorias (Wei et al., 2003), antibacteriales (Khan et al., 2003), antifúngicas (Shanmugapriya et al., 2011), antineoplásicas (Arung et al, 2010), e hipoglucemiantes (Fernando et al, 1990), concluyendo así que el consumo habitual de las semillas puede proveer beneficios en la prevención y control de diversas enfermedades.

Sin embargo, son nulos los reportes del uso de la harina de la semilla de la yaca, en cuanto al cáncer cervicouterino. Por lo anterior, se decidió evaluar el

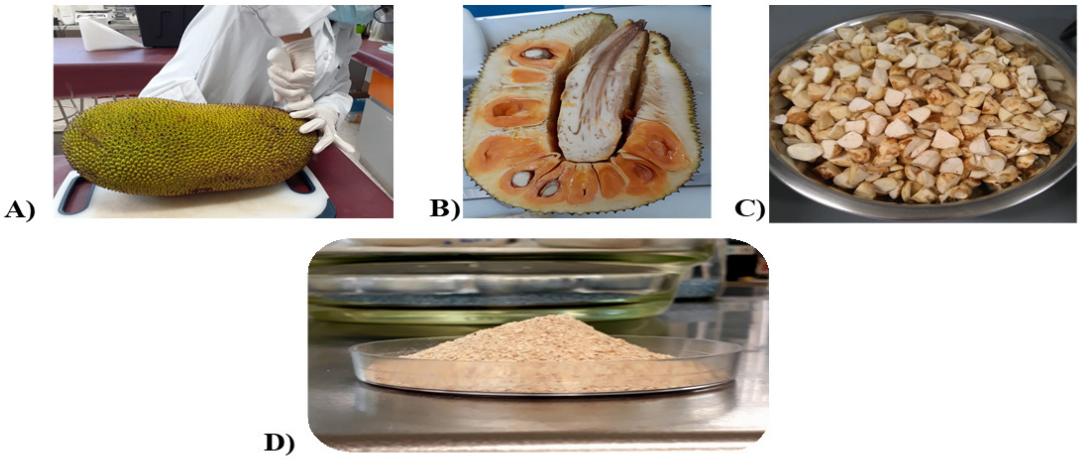


Figura 1. A) Fruto de yaca (*Artocarpus heterophyllus*); B) Parte interna del fruto de la yaca, bulbo y semilla, son la parte comestible; C) Semillas de yaca; D) Harina obtenida a partir de la deshidratación de semillas de yaca.

efecto de la harina obtenida a partir de las semillas de yaca sobre la viabilidad de células HeLa, utilizando como control otras células epiteliales (HaCaT).

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las células HeLa (neoplásicas) y HaCaT (células no neoplásicas) se sembraron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) + 1% de penicilina (10,000 unidades/ml) / estreptomicina (10,000 µg/ml) y se colocaron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO2 y 5% de humedad controlada.

Obtención de la harina de semillas de yaca

Las semillas previamente descongeladas, se cortaron en trozos pequeños incluyendo la cascarilla o arilo. Se llevaron a una estufa de aire forzado a 60°C hasta alcanzar el peso constante. Una vez deshidratadas, las semillas fueron molidas para la obtención de la harina utilizando procesador de alimentos NutriBullet Rx. La harina obtenida fue conservada en frascos ámbar y herméticos en un ambiente libre de humedad a temperatura ambiente (Figura 1). La harina se esterilizó con un ciclo de exposición a luz ultravioleta.

Ensayo de citotoxicidad

Se utilizaron las siguientes concentraciones de la harina de las semillas de yaca 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml y 1 mg/ml para evaluar su efecto sobre las células HeLa y HaCaT, utilizando DMSO (0.01%) como vehículo,

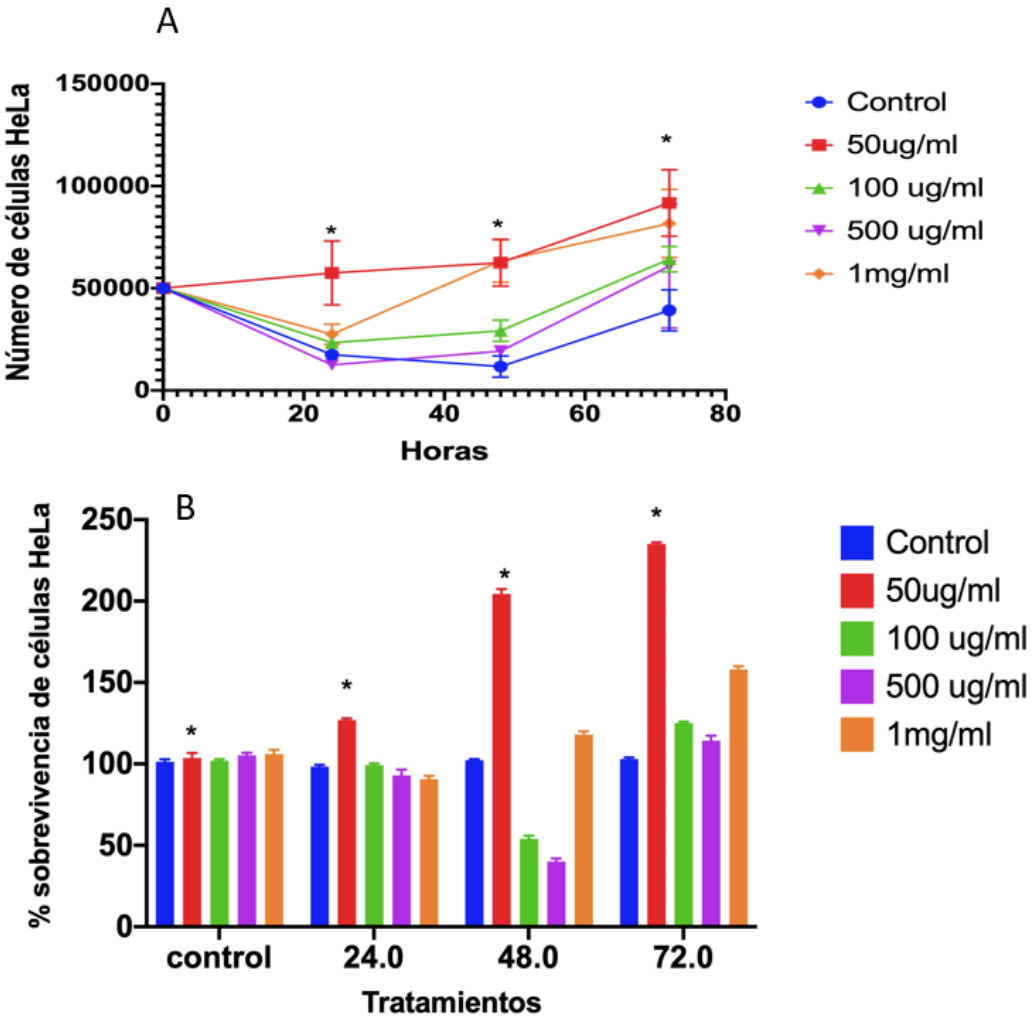


Figura 2. A) Se observa el efecto de las diferentes concentraciones de la harina de yaca sobre el número de células HeLa a las 24, 48 y 72 horas. Se puede observar que, para 50 mg, existe diferencia significativa al compararse con el control (*p ≤ 0.0090. 2B) En el caso de la viabilidad existe a 50 mg, un aumento en la viabilidad (2 veces más), al compararse con el control (*p ≤ 0.018).

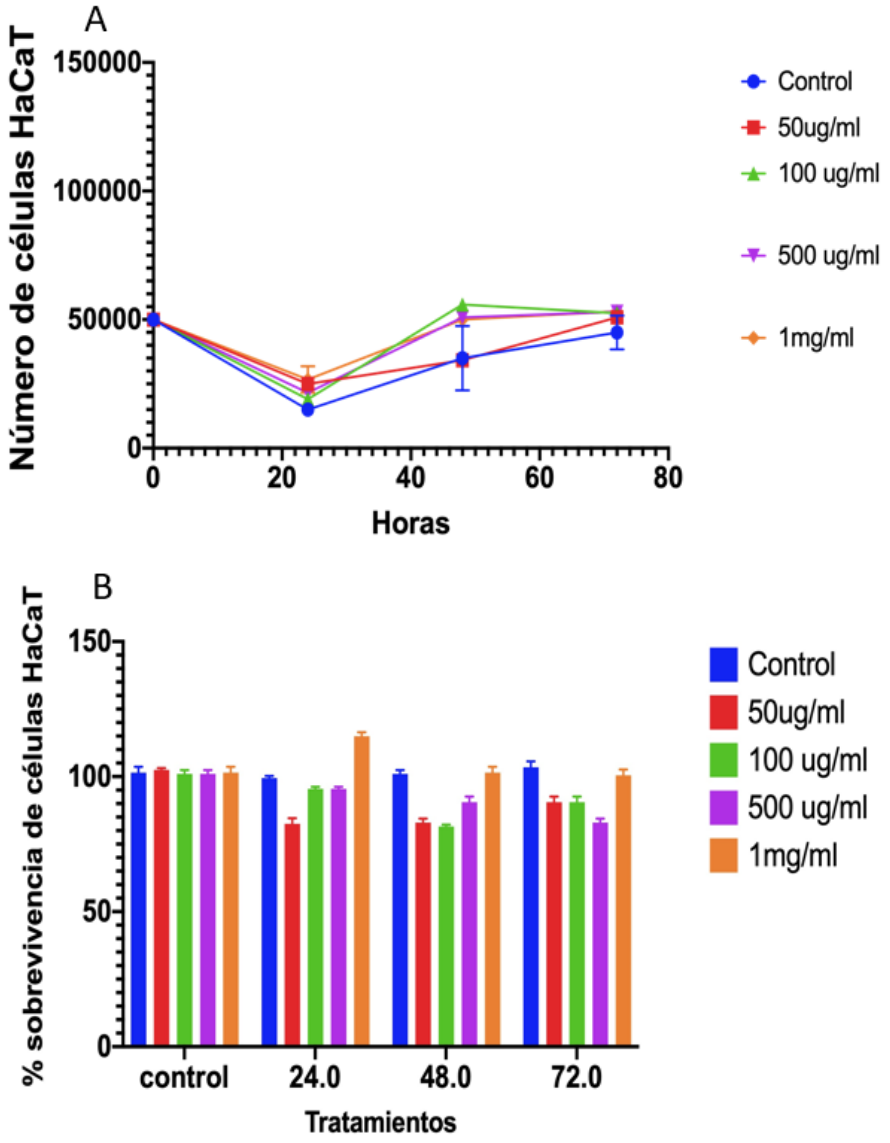


Figura 3. A) Para las células HaCaT, no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de la harina de yaca sobre el número de células a las 24, 48 y 72 horas. 3B) En el caso de la viabilidad tampoco hubo diferencias de las concentraciones de la harina de la yaca.

y como disolvente RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino más 1% de antibióticos. Las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos incluyendo el control negativo (células solas). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para los conteos celulares se utilizó el ensayo de exclusión con azul de tripano y recuento en cámara de Neubauer a las 24, 48 y 72 h. La viabilidad se evaluó con un ensayo MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide a 5 mg/ml) a las 24, 48 y 72 horas, midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 570-590 nm. Se utilizó el cisplatino como control positivo y anticancerigeno a tres diferentes concentraciones: 20, 40 y 60 µg/mL. A los datos obtenidos se les analizó con una prueba de Kruskal-Wallis mediante el software GraphPad Prism versión 8.4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través de estos tratamientos con harina de yaca se pudo observar que en el conteo celular de HeLa, el número de células se ve aumentado significativamente con la concentración de 50 mg/ml ($p \leq 0.0090$; Figura 2A). Lo anterior concuerda con lo encontrado en la viabilidad celular ($p \leq 0.018$, Fig 2B), en donde de manera dosis dependiente aumenta la viabilidad en 50 mg/ml. Por lo tanto dicha concentración favorece el número y viabilidad celular, de células HeLa. Estos resultados difieren de lo reportado en el trabajo de Zong-Ping et al, 2014; en el que demuestran que después de 48 horas, las células tratadas con *Artocarpus heterophyllus* a las concentraciones de 10, 25 y 50 µM, disminuyen su viabilidad, de forma dosis dependiente.

Así mismo, Najihah Mohd Hashim y colaboradores en el 2012 reportaron que tres xantonas extraídas de *Artocarpus obtusus*, a las siguientes concentraciones de 0.5, 2.0 y 5.0 mg/mL, tuvieron actividad antiproliferativa para las células neoplásicas, de leucemia promielocitica (HL60), leucemia mieloide crónica (K562) y cáncer de mama (MCF7). También se ha reportado que los extractos y productos químicos preparados a partir de *Artocarpus heterophyllus* mostraron efectos citotóxicos (Kumar et al., 2010; Arung et al., 2010) en las líneas celulares de hepatoma, coriocarcinoma y melanoma in vitro (Wang, et al 2000).

No obstante, los anteriores autores no reportan el uso de la harina completa como tratamientos, así como tampoco muestran el efecto de estas concentraciones en células no cancerosas. Existe un reporte el de Linjie Zeng y colaboradores en el 2018, que concuerda con nuestros datos obtenidos para HeLa, ellos mencionan que extractos de *Artocarpus lingnanensis*, exclusivamente las lectinas (proteínas unidas a carbohidratos) tienen actividad proliferativa o mitogénica. En el caso de las células epiteliales HaCaT (control), se observó que todas las concentraciones estimulan el número de células (3A) y aumentan ligeramente la viabilidad (Figura 3B), aunque no hubo diferencias significativas. Sin embargo, este efecto sugiere podría ser el mismo en otras líneas celulares epiteliales. Y estos últimos datos concuerdan con Kai-Wei y colaboradores en el 2015, en donde prueban dos fenoles prenilados aislados de las raíces de *Artocarpus communis*, estos compuestos (5, 10, 25, 50, 100, y 150 mM) actúan como atenuantes

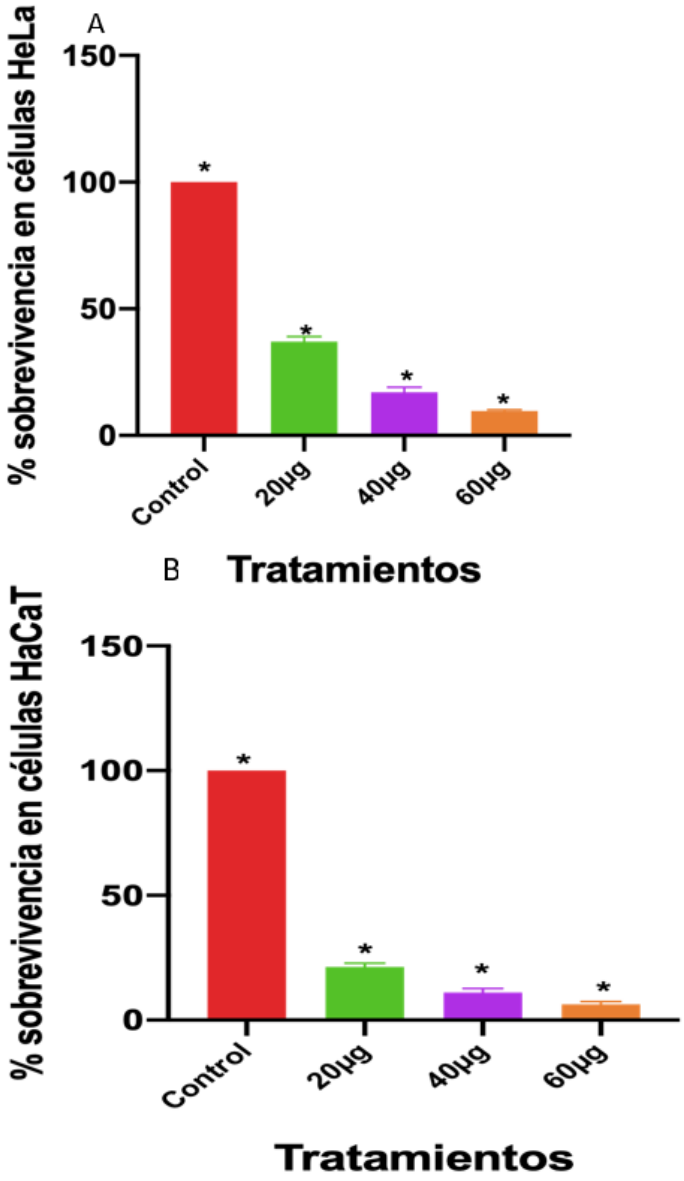


Figura 4. Se observa disminución significativa (p=<0.0001) del porcentaje de sobrevivencia de células neoplásicas (A) y no neoplásicas (B) posterior al tratamiento con cisplatino, a diferentes concentraciones, con respecto al control.

de la radiación UVA para los queratinocitos HaCaT y los fibroblastos Hs68, protegiéndolos a través de un mecanismo antioxidante, pero también activando su viabilidad celular.

Se utilizo al cisplatino como control positivo, ya que está bien documentado su uso para tratar el cáncer cervicouterino (HeLa, Figura 4A), y al no ser específico para algún tipo celular también disminuye la viabilidad de las células no neoplásicas (HaCaT, Figura 4B), con una $p \leq 0.01$.

En conclusión, los resultados de este estudio, sugieren que la harina de semillas de yaca (todos sus componentes) no tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerosas (HeLa), al contrario es mitogénica; sin embargo promueven la viabilidad de células epiteliales por lo que probablemente también ejerzan este efecto en células sanas de cualquier epitelio de revestimiento., tal como lo hacen en las HaCaT; por lo tanto, su probable actividad antineoplásica depende de la especie de planta, del tipo de extracción y de otras condicionantes, por lo que la investigación del uso de la harina de yaca, en este caso requiere de mayores estudios.

REFERENCIAS

- Arung, E. T.; Wicaksono, B. D.; Handoko, Y. A.; Kusuma, I. W.;Shimizu, K.; Yulia, D.; Sandra, F. Cytotoxic effect of artocarpin onT47D cells. J. Nat. Med. 2010, 64, 423−429.
- Arung, E. T.; Yoshikawa, K.; Shimizu, K.; Kondo, R. Isoprenoidsubstituted flavonoids from wood of Artocarpus heterophyllus on B16 melanoma cells: cytotoxicity and structural criteria. Fitoterapia, 2010,81, 120−123.
- Baliga, Shrinath & Arnadi Ramachandrayya, Shivashankara & Haniadka, Raghavendra & D'Souza, Jason & P. Bhat, Harshith. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. Food Research International 2011, 44: (7) 1800-1811.
- Crane, J. y C. Balerdi. La Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) en Florida. Departamento de Ciencias Hortícolas, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, 2000, Disponible en línea: http:// hammock.ifas.ufl.edu.
- Fernando, M. R.; Thabrew, M. I.; Karunanayake, E. H. Hypoglycaemic activity of some medicinal plants in Sri-Lanka. Gen. Pharmacol, 1990, 21, 779−782.
- Jagadeesh, S., B. Reddy, G. Swamy, K. Gorbal, L. Hegde and G. Raghavan. Chemical Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) selections of Wester Ghats of India. Food Chemistry 2007,102 :1-7.
- Kai-Wei Lina, Bo-Wei Wangb, Chien-Ming Wua,c, Ming-Hong Yena, Bai-Luh Weib, Chi-Feng Hungd, Chun-Nan Lin. Antioxidant prenylated phenols of Artocarpus plants attenuate ultraviolet radiation-induced damage on human keratinocytes and fibroblasts. Phytochemistry Letters 2015 14: 190–197.
- Khan, M. R.; Omoloso, A. D.; Kihara, M. Antibacterial activityof Artocarpus heterophyllus. Fitoterapia 2003, 74, 501−505.
- Kumar S, Singh AB, Abidi AB, Upadhyay RG, Singh A. Proximate composition of jack fruit seeds. J Food Sci Technology 1988, 25: 308-309.
- Kumar, R. N.; Jayapradha, R. Polyphenol analysis and antitumor activity of crude extracts from tegmen of Artocarpus heterophyllus. Res.J. Biotechnol. 2010, 5, 61−63.
- Linjie Zeng · Lu Li · Qiyan Zeng, Yong Deng, Lijun Yin, Liejun Liao. Mitogenic activity of *Artocarpus lingnanensis* lectin and its apoptosis induction in Jurkat T cells. Journal of Natural Medicines, 2018, 72:745–756.
- Najihah Mohd Hashim, Mawardi Rahmani, Gwendoline Cheng Lian Ee, Mohd Aspollah Sukari, Maizatulakmal Yahayu, Winda Oktima,1AbdManaf Ali,and Rusea G. Antiproliferative Activity of Xanthones Isolated from Artocarpus obtusus. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012,130627: 9-14.
- Panthong, K.; Tohdee, K.; Hutadilok-Towatana, N.; Voravuthikunchai, S. P.; Chusri, S. Prenylated flavone from roots of a hybrid between Artocarpus heterophyllus and Artocarpus integer and itsbiological activities. J. Braz. Chem. Soc. 2013, 24, 1656−1661.
- Rahaman MA, Nahar N, Mian AJ, Moshiuzzaman M.Variation of carbohydrate compostion of two forms of fruit from jack tree (*Artocarpus heterophyllus* L) with maturity and climatic condition. Food Chemistry 1999; 65: 91–97.

- Shanmugapriya, K.; Saravana, P. S.; Payal, H.; Mohammedaaa, S.P.; Bennai, W. A comparative study of antimicrobial potential andphytochemical analysis of *Artocarpus heterophyllus* and Manilkarazapota seed extracts. J. Pharm. Res. 2011, 4, 2587−2589.
- Ulloa J, Rosas U. P, Flores J, Ulloa R. B y Escalona H. Comportamiento del color en bulbos del fruto de la jaca (*Artocarpus heterophyllus*) auto estabilizados en frascos de vidrio por la tecnología de obstáculos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2007, 5: 372-378.
- Wang, H.; Ng, T. B.; Ooi, V. E. C.; Liu, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. Int. J.Biochem. Cell Biol. 2000, 32, 365−372.
- Wei, B. L.; Weng, J. R.; Chiu, P. H.; Hung, C. F.; Wang, J. P.; Lin,C. N. Antiinflammatory flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus communis*. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3867−3871.
- Zong-Ping Zheng, Yang Xu, Chuan Qin, Shuang Zhang, Xiaohong Gu, Yingying Lin, Guobin Xie, Mingfu Wang, § and Jie Chen. Characterization of Antiproliferative Activity Constituents from *Artocarpus heterophyllus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2014, 62: 5519−5527.

UJED
Universidad Juárez del Estado de Durango

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS UJED

Facultad de Ciencias Químicas

Gómez Palacio

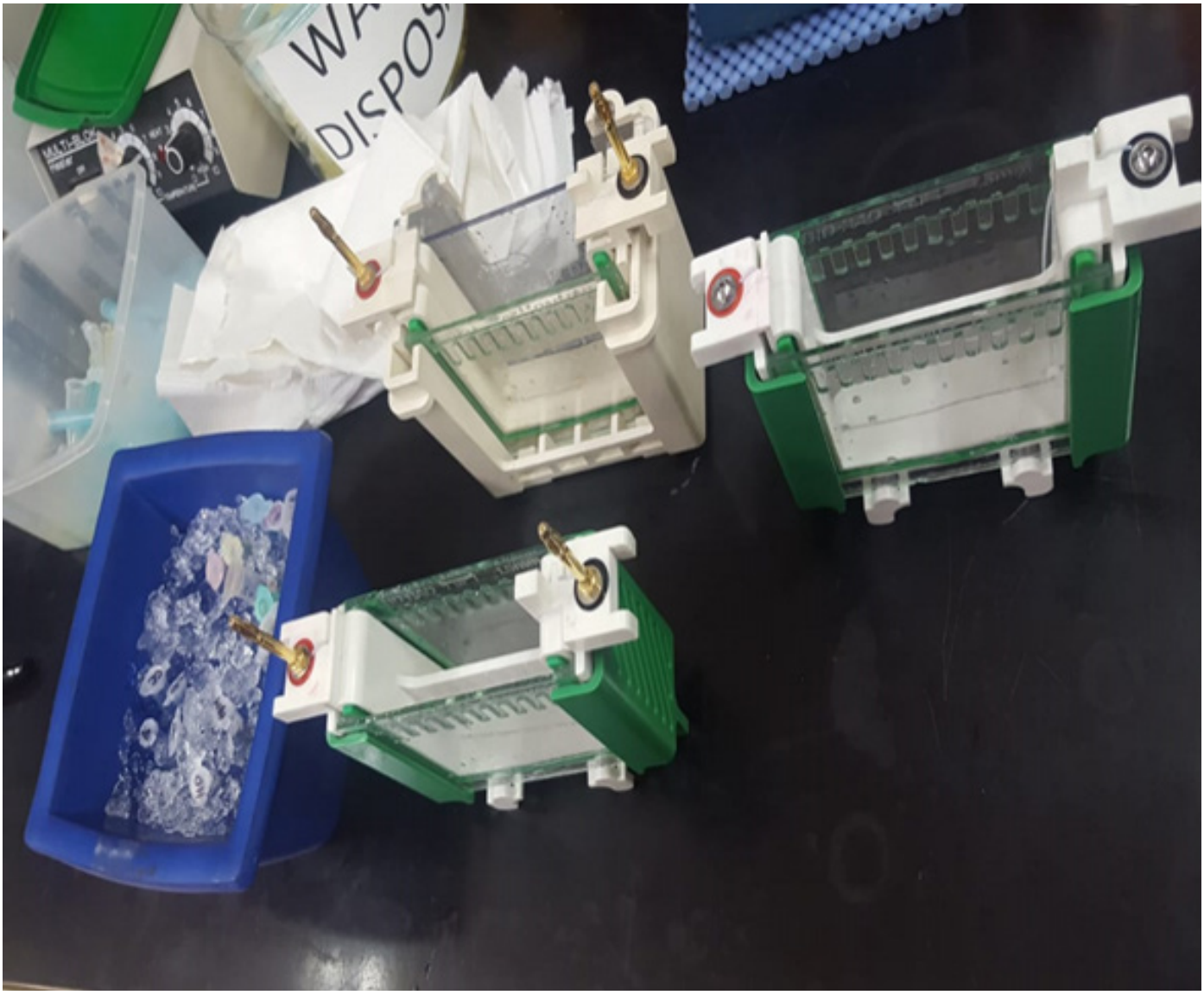
R E G L A M E N T O

Artículo 5. El usuario tiene las siguientes obligaciones:

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

ADMINISTRACIÓN 2018-2024

Cuerpo académico UJE-CA-108 Fisiopatología en Salud Ambiental LGAC: Bases Moleculares y Bioquímicas de la Salud Ambiental		
Nombre proyecto	**Investigador responsable**	
Nitrosaminas y óxido nítrico como derivados del metabolismo de los nitratos, su papel en la respuesta a la hipoxia mediada por HIF y su implicación en la carcinogenesis.	Rebeca Pérez Morales	
Variabilidad genética y caracterización bioquímica de las metaloproteinasas y la toxina		
Citotoxicidad del nitrato y nitrito en distintas líneas celulares y su posible mecanismo de acción		
Alteración en la síntesis de hormonas tiroideas mediada por los factores de transcripción FOXE1 y PAX8 durante la intoxicación crónica por nitratos 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.		
Biomarcador de insuficiencia renal	Esperanza Yasmín Calleros Rincón	
Anemia asociada a factores ambientales en el estudiante Universitario		
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	Edgar Héctor Olivas Calderón	
Evaluación del daño oxidativo al ADN en niños con exposición prenatal al arsénico, flúor y compuestos organoclorados		
Evaluación de la función renal e hipertensión arterial en población expuesta a cadmio		
Detección de anticuerpos IgG e IgM contra Toxoplasma gondii en primigestantes y sus neonatos en el Hospital General de Gómez Palacio, Dgo.		



"Todo acto forzoso se vuelve desagradable"
Aristóteles (384-322 a. C): filósofo griego

Polimorfismos como biomarcadores de cáncer cervicouterino

[1]Omar Medina-de la Cruz, [1]Edgar Villegas-Hinojosa, [1]*Verónica Gallegos-García.

[1]Facultad de Enfermería y Nutrición. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.
Dirección: Av. Niño Artillero No. 130. Zona Universitaria. C.P. 78240.

*E-mail de correspondencia: veronica.gallegos@uaslp.mx

RESUMEN

En los últimos años se han realizado investigaciones para el desarrollo de técnicas moleculares que permitan el uso de la secuencia del genoma humano a favor del entendimiento de las distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. Los polimorfismos son mutaciones que se presentan en la población, forman parte de la predisposición genética y explican las diferentes respuestas biológicas en individuos que presentan los mismos factores de riesgo para algunas patologías como el cáncer cervicouterino (CaCu). Estos polimorfismos pueden ser utilizados como biomarcadores (característica que se mide y evalúa como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas) predictivos, de pronostico o diagnóstico. Los biomarcadores en los que se han enfocado la mayoría de las investigaciones se relacionan con la desregulación de vías moleculares específicas y con la fisiopatología del cáncer, aunque se han utilizado en la aplicación de estrategias terapéuticas e intervenciones. Algunos de los posibles biomarcadores en el diagnóstico del CaCu, podrían ser los asociados a los polimorfismos de los genes Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR), MTHFR-677T, Interleucina (IL), IL-10-1082 A/G, *Toll-like* (TLR), TLR9-1486T/C, Metaloproteasas de Matriz Extracelular (MMP´s) MMP-1-1607 (1G>2G), MMP-1-1607 (1G>2G), MMP-2-1306C>T y MMP-7 (−181A> G). La importancia de la necesidad de biomarcadores en la detección de CaCu como los polimorfismos es la identificación de mujeres en riesgo en un punto de la historia natural de la enfermedad que todavía permita una intervención preventiva exitosa.

Palabras clave: Metaloproteasas, SNP´s, Cáncer

ABSTRACT

In recent years, research has been carried out to develop molecular techniques that allow the use of the human genome sequence in favor of understanding different diseases, including cancer. Polymorphisms are mutations that occur in population, are part of the genetic predisposition, and explain different biological responses in individuals who present the same risk factors for some pathologies as Cervical Cancer (CC). They can be used as biomarkers (a characteristic that is measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathological processes or pharmacological responses) predictive, prognostic or diagnostic. The biomarkers on which most of the research has focused are related to the dysregulation of specific molecular pathways and the pathophysiology of cancer, although they have been used in the application of therapeutic strategies and interventions. Some of the possible biomarkers in CC diagnosis, could be those associated with polymorphisms of different genes such as: Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), MTHFR-677T, Interleukin (IL), IL-10-1082A/G, *Toll-like* (TLR), TLR9-1486T/C, Matrix Metalloproteinase (MMP´s), MMP-1-1607 (1G>2G), MMP-1-1607 (1G>2G), MMP-2-1306C>T and MMP-7 (−181A> G). The importance of the need for biomarkers in the detection of CC as polymorphisms, is the identification of women at risk at a point in the natural history of the disease, that still allows a successful preventive intervention.

Keywords: Metalloproteinase, SNP´s, Cancer

INTRODUCCIÓN

Desde el año de 1953 cuando los científicos James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura tridimensional del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) se han realizado un gran número de investigaciones para la estandarización de técnicas y tecnologías que faciliten el estudio y la comprensión del genoma humano (Figura 1) (Sáez, 2017). El genoma está conformado por más de 3 mil millones de pares de bases que se localizan en el interior del núcleo de las células, es importante mencionar que comparte un 99.5% de identidad el genoma entre humanos, sin embargo, es el 0.5% restante lo que hace a cada humano único (Mayor, 2007).

El ADN puede sufrir cambios en la secuencia de los nucleótidos que se originan por errores en los mecanismos de replicación y reparación (Por escisión de bases, por escisión de nucleótidos, por desapareamiento de bases y de los cortes de doble cadena), pero también por diversos factores ambientales que producen mutaciones (Chatterjee y Walker, 2017). Estas pueden tener efectos deletéreos y causar polimorfismos, que es cuando la frecuencia en uno de sus alelos se presenta en más del 1% de la población (Caratachea, 2007).

Polimorfismos

Los polimorfismos se han vinculado con la predicción de susceptibilidad para algunas patologías y la respuesta a medicamentos, porque la mayoría de las enfermedades tienen una firma genética muy compleja (Lander, 2011). Es por ello que las investigaciones del área biomédica se han enfocado en tratar de comprender la importancia funcional de estas variaciones en un gen y su impacto en algunas enfermedades, lo cual ha sido más sencillo utilizando herramientas de secuenciación del ADN (Metzker, 2010).

Los genes son una parte muy activa de los cromosomas, su estructura está compuesta por tres partes: 1) una región promotora, que se localiza al inicio y no codifica para ningún aminoácido, pero sirve como un modulador de la transcripción génica y regula diferentes factores transcripcionales (proteínas que pueden unirse a secuencias específicas de ADN para regular la expresión génica); 2) una región codificante o también conocida como marco de lectura abierto, el cual está compuesto por intrones (secuencias no codificantes) y exones (contienen la secuencia para la síntesis de Ácido Ribonucleico Mensajero [ARNm] que se traducirá en una proteína) y 3) la región terminadora, la cual marca el final de un gen (Figura 2) (Corella, *et al.*, 2017; De Guglielmo, *et al.*, 2016; Hernández-Romano, *et al.*, 2009).

Los polimorfismos más frecuentes son los SNP´s (*Single Nucleotide Polymorphisms*, por sus siglas en inglés) (Caratachea, 2007). Los SNP´s pueden modificar la expresión génica entre un sujeto y otro hasta alterar el fenotipo de enfermedades complejas, estos pueden

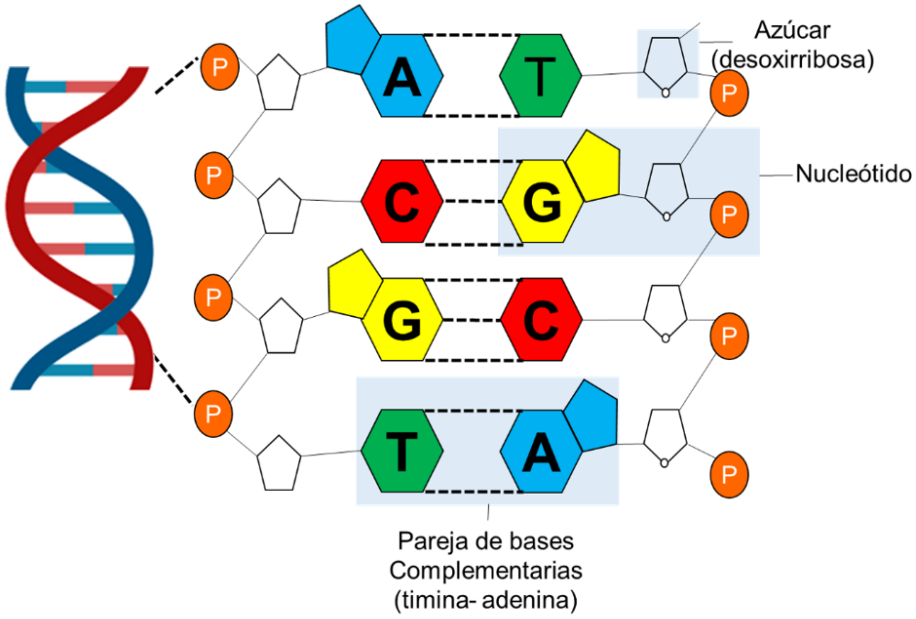


Figura 1. Estructura de doble cadena del ADN propuesta por Watson y Crick. Bases nitrogenadas: A (Adenina), T (Timina), C (Citosina) y G (Guanina). P: Fosfato. Modificado de Berg, *et al.*, 2007.

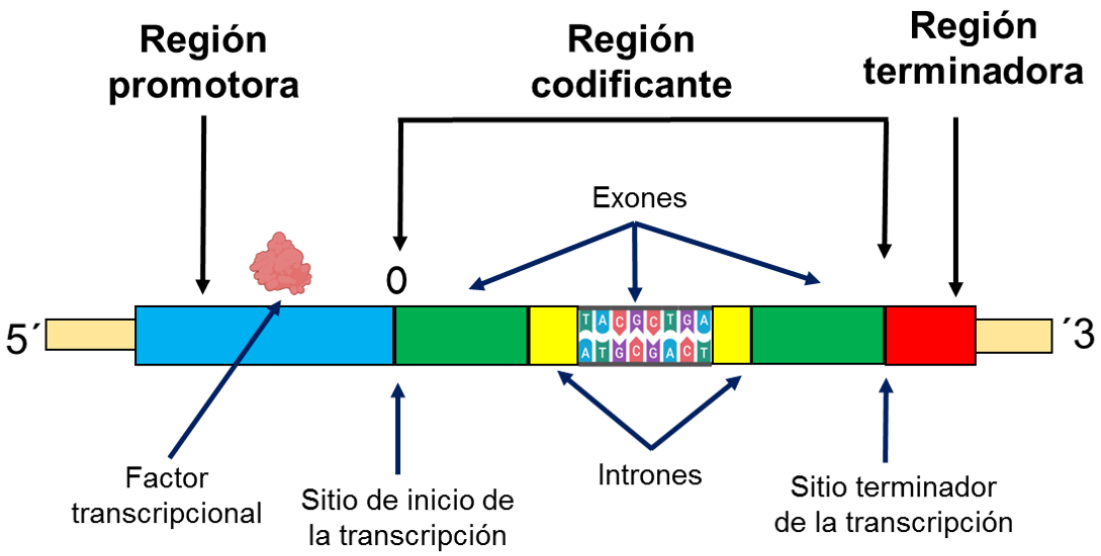


Figura 2. Estructura de un gen.

originar cambios en la región promotora de los genes para modificar, destruir o crear sitios de unión y reconocimiento para algunos factores de transcripción, de esta manera hay variaciones en los niveles de expresión génica y puede ocasionar una sobrexpresión de los mismos (Ramírez-Bello, *et al*., 2013).

Los SNP´s juegan un rol importante para el desarrollo de algunas patologías porque constituyen SNP´s funcionales, estos producen afectaciones en los genes, al ARNm de los genes que sintetizan proteínas e incluso en las mismas proteínas. Estos se pueden clasificar según su importancia funcional o a su localización (parte del gen que afectan o en el ARNm) (Ramírez-Bello, *et al*., 2013).

Los SNP´s funcionales se pueden dividir principalmente en tres grupos: a) los SNP´s codificantes (cSNP) sinónimos (en este el nucleótido no cambia el aminoácido) y no sinónimos (el nucleótido cambia el aminoácido) que se encuentra en los exones; b) en SNP´s reguladores (rSNP) afectan el nivel de expresión génica (la cantidad de transcritos), y c) los SNP´s ARN estructurales (srSNP) estos afectan a la estructura y función del ARNm de genes que se encargan de la síntesis de proteínas (Figura 3) (Ramírez-Bello, *et al*., 2013).

Polimorfismos como biomarcadores

Enfermedades como el cáncer están condicionadas de manera directa e indirectamente por factores de origen genéticos los cuales se encargan de determinar su magnitud y relevancia en cada individuo (Del Valle, *et al*., 2018). Los polimorfismos son parte de la "susceptibilidad individual" o mejor conocida como predisposición genética y que podrían explicar las diferentes respuestas biológicas observadas en individuos que presentan los mismos factores de riesgo para determinadas enfermedades como el cáncer (Atieh, *et al*., 2013; Rosero, *et al*., 2016).

En los últimos años ha crecido la necesidad de realizar estudios poblacionales que permitan identificar polimorfismos como posibles biomarcadores para la prevención de enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado más en los distintos tipos de cánceres (Marti, *et al*., 2005).

Un biomarcador se define de acuerdo a los Institutos Nacionales de Salud como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica" (Diamandis, 2010). Para la Organización Mundial de la Salud "un biomarcador es cualquier sustancia, estructura o proceso que se puede medir en el cuerpo o sus productos e influyen o predicen la incidencia de resultados o enfermedades" (Lassere, 2008).

Los biomarcadores en cáncer se relacionan con la desregulación de vías moleculares específicas y con la fisiopatología del cáncer, también se han utilizado en la aplicación de ciertas estrategias terapéuticas e intervenciones (Omenn, *et al*., 2012). Estos se pueden

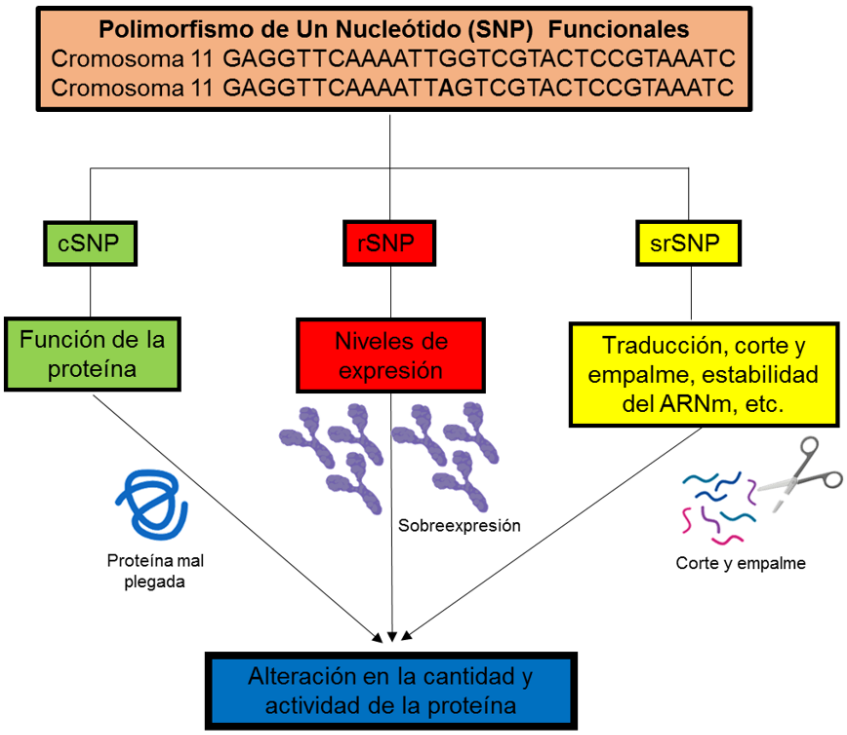


Figura 3. Polimorfismos de un nucleótido funcional.

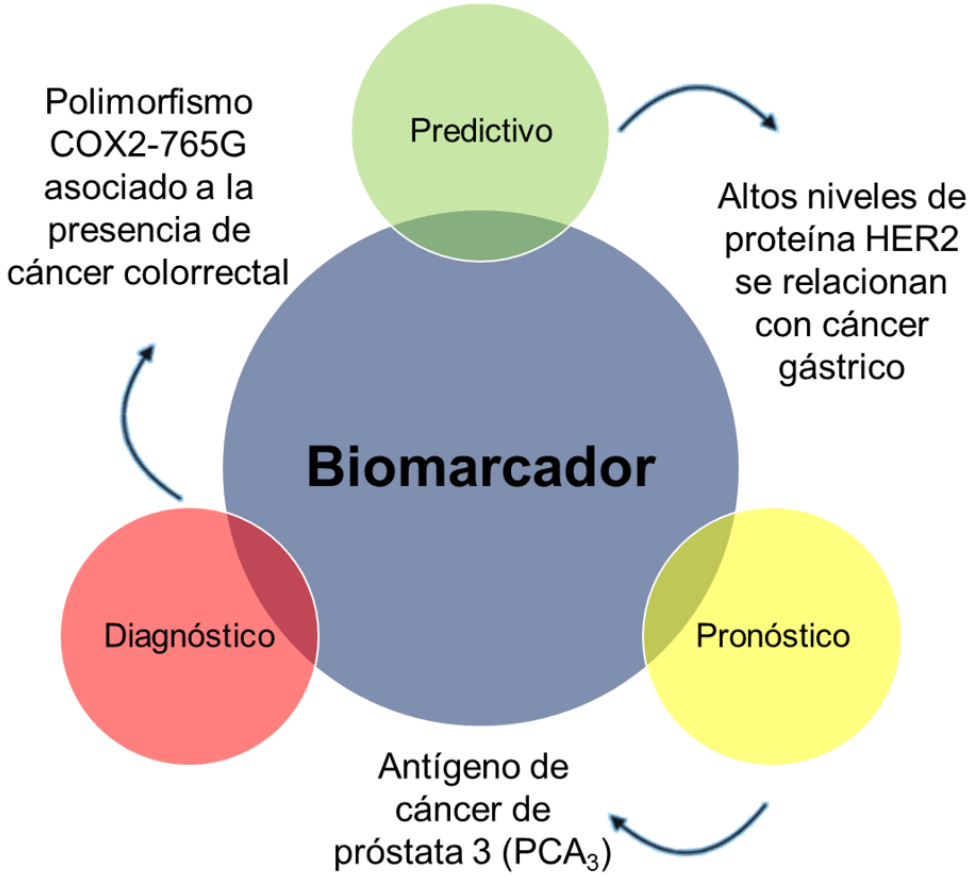


Figura 4. Tipos de biomarcadores de acuerdo con su uso. **COX2**: Ciclooxigenasa 2. **HER2**: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. **PCA3:** Antígeno de cáncer de próstata 3.

clasificar según su uso en: biomarcadores predictivos (predicen la respuesta a intervenciones terapéuticas específicas), biomarcadores de pronostico (informan sobre el riesgo, resultados clínicos o progresión de enfermedad) y biomarcadores de diagnóstico (identifican si un paciente tiene una enfermedad especifica) (Figura 4) (Goossens, *et al*., 2015). Los biomarcadores de diagnóstico pueden coadyuvar en la identificación de distintos tipos de cánceres como el de esófago, estómago, pulmón, hígado, ovario y cáncer cervicouterino (CaCu) (Malik, *et al*., 2011; Moreno-Ortiz, *et al*., 2014; Qiu, *et al*., 2008; Singh, *et al*., 2008; Zhang, *et al*., 2006).

POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICOUTERINO

El CaCu es uno de los principales tipos de cáncer que se diagnostica en mujeres a nivel mundial. En el año 2018, de acuerdo con las estimaciones de GLOBOCAN (por sus siglas en inglés *Global Cancer Observatory*) se diagnosticaron 569,847 nuevos casos de CaCu (es el cuarto cáncer más común en mujeres), en este mismo año se estimaron 311,365 muertes por esta enfermedad (Bray, *et al*., 2018).

El mecanismo de la carcinogénesis del CaCu no está del todo descrito, aunque hay algunos co-factores como los de origen genético que en interacción con el Virus del Papiloma Humano (VPH) se encargan de modular una infección por VPH hacia una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y su progreso a CaCu (Figura 5) (Gong, *et al*., 2018). Cuando el diagnóstico médico de CaCu se realiza en una etapa tardía, la supervivencia media es inferior a un año, por lo tanto, es importante desarrollar pruebas moleculares a través del uso de biomarcadores como los polimorfismos que sean capaces de proporcionar detección y prevención temprana.

Algunas investigaciones muestran que para la identificación del riesgo al desarrollo de CaCu se han enfocado en defectos del gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) que participa en el catabolismo de la homocisteína y ocasionan una serie de procesos bioquímicos de los trastornos del cuerpo, incluida la regulación del ciclo celular, la replicación del ADN, la modificación de la metilación del ADN, lo que puede conducir a defectos del tubo neural, cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Li, *et al*., 2017).

En el 2014 un estudio de casos y controles realizado por Badiga encontraron la asociación del polimorfismo MTHFR C677T y el CaCu, en el participaron 64 pacientes con la enfermedad y 31 controles, la evidencia mostró que las mujeres con el alelo T tuvieron 9 veces más el riesgo para el desarrollo de NIC respecto a las que tenían el alelo C, este biomarcador es de diagnóstico (Badiga, *et al*., 2014).

En la investigación de Hajiesmaeli se observó que el

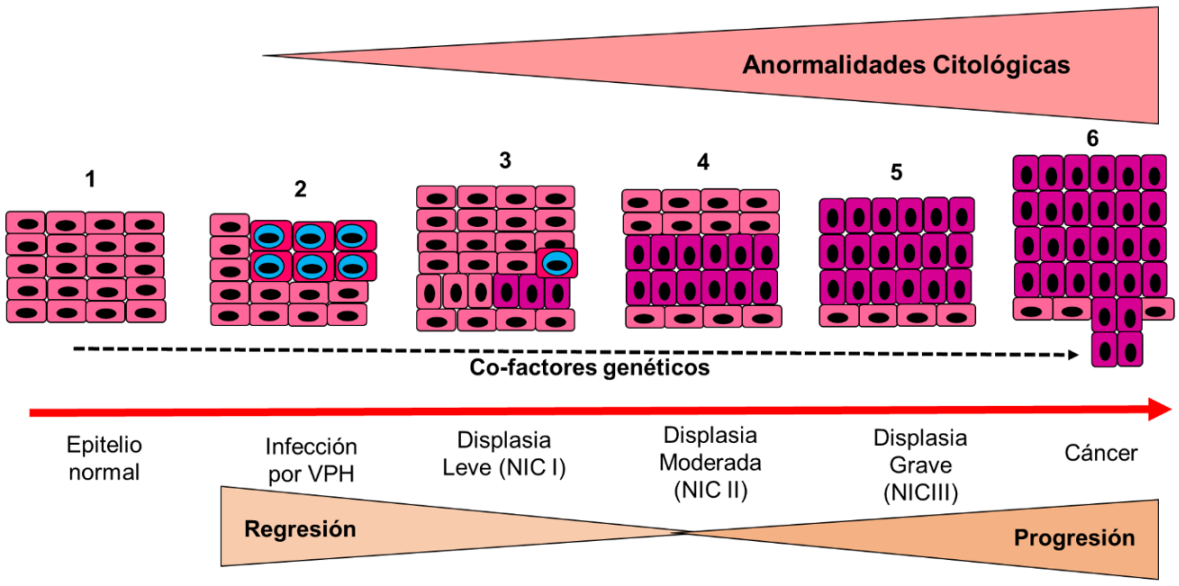


Figura 5. Figura 5. Historia Natural del CaCu. El riesgo de progresión del CaCu aumenta con el grado de lesión (1-6). Lesiones que pueden tener regresión de acuerdo con las condiciones de las pacientes (2-4). Lesiones que tienden a progresar por las características de las pacientes (4-6). NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical.

metabolismo del ácido fólico se asoció aún más con los genes MTHFR y MTRR (codifica para la enzima metionina sintasa reductasa) de pacientes con CaCu (Hajiesmaeil, *et al*., 2016). En el 2011 en una investigación con alimentos y suplementos de ácido fólico el cual mostró que el riesgo de CaCu estaba asociado con una ingesta inadecuada de ácido fólico (Agodi, *et al*., 2011).

Otra investigación realizada por Delgado-Enciso reportó un polimorfismo en el gen MTHFR que cataliza la síntesis del folato circulante (Delgado-Enciso¸et al., 2006). La falta de folato en el organismo puede ocasionar modificaciones en procesos de síntesis o reparación de ADN, reprimir la expresión de genes que inhiben el crecimiento del tumor y facilitar la integración del ADN viral en el genoma celular (Eichholzer, *et al*., 2001). El genotipo 677TT produce una actividad reducida de esta enzima además de que se piensa que la falta de folato en el cuerpo puede beneficiar que el VPH se integre al genoma celular (Delgado-Enciso, *et al*., 2006).

Numerosos estudios han sugerido que algunas citosinas desempeñan papeles críticos en los procesos de infiltración celular inflamatoria y la transformación celular maligna (Lee, *et al*., 2015). Se ha demostrado que una variedad de factores de riesgo entre ellos la inflamación crónica y condiciones poco saludables aumentan el riesgo de tumorigénesis cervical (Guo, *et al*., 2018).

La interleucina-10 (IL-10) es una citosina multifuncional que es secretada por las células T helper tipo 2, monocitos, macrófagos, queratinocitos y células tumorales (Guo, *et al*., 2018). El polimorfismo en el gen que se encarga de la síntesis de esta interleucina puede influir en la respuesta inmune al VPH, se ha estudiado que el polimorfismo en G>A en la posición -1082 en la región promotora del gen produce una sobreexpresión de la misma, por lo tanto, altera la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune (Turner¸*et al*., 1997).

El nivel aumentado de la IL-10 se localiza en la zona de transformación, de acuerdo a la investigación de Stanczuk en donde participaron 77 pacientes con CaCu y 69 pacientes sanas de Zimbabwe, mostraron que el genotipo de la producción media de IL-10-1082 A/G predomino en el 40.2% (31) de los casos respecto al 16% (11) de los controles. Esta interleucina puede regular la supervivencia o muerte de las células inmunes a través de las vías apoptóticas dependientes de CD95/CD95L (Fas/FasL) (Stanczuk, *et al*., 2001), aunque ninguna citosina se puede considerar de manera independiente (Giannini, *et al*., 1998).

Dentro de la fisiopatología del cáncer se ha identificado que uno de los componentes que juegan un papel crucial son los receptores *Toll-like* (TLR), los cuales son receptores de reconocimiento de patógenos del sistema inmune innato (Misch y Hawn 2008). Hasta la fecha se han descrito 10 TLR funcionales en el humano por células inmunes y no inmunes, sin embargo, estos también se han implicado en la iniciación, progresión y metástasis de los tumores (Akira yTakeda, 2004; , *et al*., 2009).

Los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se encuentran en las superficies celulares, mientras que TLR 3, 7, 8 y 9 se encuentran en los endosomas o retículo endoplásmico (Akira y Takeda, 2004). Hay informes sobre los polimorfismos en los TLR 4 y 9 en la susceptibilidad de CaCu (Pandey, *et al*., 2018; Yang, et al., 2018). En el caso del TLR4 los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile están asociados con la progresión tumoral al igual que el polimorfismo TLR9-1486T/C fueron factores de riesgo para el CaCu (Pandey, *et al*., 2009; Roszak, *et al*., 2012).

En el 2019 se encontró que el polimorfismo TLR9-1486T/C confirió un mayor riesgo por VPH 16 y 18 y CaCu. Con respecto al polimorfismo en el promotor TLR 4 no se observó asociación ni con la infección por VPH y el CaCu, estos polimorfismos han aumentado en el campo de estudio como posibles biomarcadores (Pandey, *et al*., 2019).

Se han descrito diversos polimorfismos en las Metaloproteasas de Matriz Extracelular (MMP´s) asociados al desarrollo de CaCu (Singh, *et al*., 2008). Las MMP´s son enzimas que regulan la degradación de la matriz extracelular, estas se encuentran de manera fisiológica en el humano, sin embargo, en procesos patológicos como el CaCu regulan distintas etapas de su progresión como: la regulación del crecimiento de células cancerígenas, diferenciación, apoptosis, invasión, migración, metástasis (diseminación de células malignas del tumor así otros tejidos del cuerpo) y angiogénesis (Naranjo, *et al*., 2009; Peng, *et al*., 2010; Álvaro, *et al*., 2010).

La investigación realizada en 2008 por Singh sobre un polimorfismo en la MMP-7 revelo que las mujeres que tenían CaCu, además de tener este co-factor genético para el desarrollo de la patología también presentaron

el co-factor del hábito tabáquico (Singh, *et al*., 2008). En el 2005 se estudió un polimorfismo en la MMP-1, esta proteasa puede degradar el colágeno intersticial tipo I, II y III, despejando así el camino para que las células cancerosas invadan la matriz extracelular y de esta manera pueda migrar a través del estroma tisular. En el estudio se investigó el polimorfismo MMP-1-1607 (1G>2G) este se asocia a una mayor transcripción, el alelo 2G se asoció con etapas avanzadas del CaCu (Lai, *et al*., 2005).

Otra metaloproteasa que se ha estudiado es la MMP-2 que juega un papel importante en la proliferación de células cancerígenas, la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis. El polimorfismo MMP-2-1306C>T puede afectar el nivel de expresión de la proteína, al cambiar la actividad transcripcional de los genes y esto se asocia con la aparición de tumores (Zhang, *et al*., 2017). En el estudio de Baltazar-Rodríguez en el 2008 el polimorfismo MMP-2-1306C>T se asoció con la aparición de CaCu en mujeres mexicanas, lo anterior es especialmente en mujeres que iniciaron su vida sexual a edad temprana (Baltazar-Rodriguez, *et al*., 2008).

DISCUSIÓN

La falta de biomarcadores tumorales que estén validados para el CaCu en etapas tempranas no implica la falta de necesidad de estos, sino que es muy probable la falta del desarrollo y mejora en los estándares de práctica de este tipo de cáncer en las últimas décadas. Sin embargo, hay que recordar que en México la citología cervical sirve como la principal herramienta de diagnóstico para CaCu, aunque es una prueba subjetiva ya que requiere de la capacitación del personal y experiencia de citotecnólogos y patólogos (Granados-García, *et al*., 2014).

La mejora en los métodos sobre detección actuales de CaCu tienen principalmente dos objetivos: el primero es para ofrecer pruebas de detección factibles y accesibles para los países que tienen la mayor carga de morbilidad; el segundo es mejorar la eficiencia de los programas de detección oportuna actuales para hacerlos más rentables mejorando y reduciendo la demanda de pruebas costosas y con resultados pocos claros con el fin de aumentar el porcentaje de cobertura en la detección de la población (Wentzensen yvon Knebel, 2007).

En el estudio de Granados-García se estimaron los costos del Programa Nacional de Detección Oportuna de Cáncer Cervical del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el cual el costo de la citología vaginal fue 14.94 *United States Dollar* (USD), colposcopia sin biopsia 39.80 USD, colposcopia con biopsia 69.01 USD y el estudio de patología 26.27 USD (Granados-García, et al., 2014). Además, en el mismo estudio se calcula el costo para el tratamiento de los 21,103 falsos negativos de citología vaginal, lo cual fue de casi 62 millones de USD lo que representa el 42.6% del costo total del programa (Granados-García, *et al*., 2014). En el estudio de Bui determino los costos de la reacción en cadena de polimerasa que se utiliza al realizar la identificación de polimorfismos como biomarcadores, el costo de la reacción únicamente oscilo entre los 9.58-38.04 USD dependiendo del número de polimorfismos a identificar (Bui, *et al*., 2017).

Uno de los campos de aplicación de los biomarcadores de cáncer incluye la detección temprana, reproducibilidad de los diagnósticos, vigilancia epidemiológica de personas en riesgo y el seguimiento después del tratamiento (Kamel y Al-Amodi, 2016). Es importante mencionar que en la actualidad en México se utilizan algunos polimorfismos como diagnóstico, por ejemplo, en el IMSS la guía de diagnóstico fibrosis quística en la edad pediátrica marca como evidencia por parte del Colegio Americano de Genética Médica un tamizaje con estudio molecular que debe incluir la realización de un panel con al menos 25 mutaciones y 6 polimorfismos para el diagnóstico de la enfermedad (IMSS, 2013).

Es importante reconocer que mujeres que tengan algún polimorfismo que se encuentre asociado a CaCu no significa que vayan a desarrollar la enfermedad ya que se considera al VPH como el agente necesario más no suficiente para el desarrollo de CaCu, ya que este tiene que actuar en conjunto con distintos co-factores que se encargan de modular la infección por VPH y su evolución a CaCu.

CONCLUSIÓN

La identificación de polimorfismos como biomarcadores ayudara a la identificación temprana de mujeres que pudieran desarrollar CaCu, aunque se tienen que realizar programas de salud pública que permitan la detección oportuna en la población con diversos factores de riesgo para que modifiquen sus hábitos, estilo de vida y puedan de esta manera contribuir a la prevención de la enfermedad.

REFERENCIAS

- Álvaro T, Noguera-Salvá R, Fariñas-Guerrero F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). Revista Española de Patología 2010; 43(1):24-32.
- Agodi A, Barchitta M, Valenti G, Marzagalli R, Frontini V, Marchese AE. Increase in the prevalence of the MTHFR 677 TT polymorphism in women born since 1959: potential implications for folate requirements. European Journal of Clinical Nutrition 2011; 65(12):1302-1308.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology 2004; 4(7):499-511.
- Atieh MA, Alsabeeha NHM, Faggion Jr CM, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. Journal of Periodontology 2013; 84(11):1586-1598.
- Badiga S, Johanning GL, Macaluso M, Azuero A, Chambers MM, Siddiqui NR, et al. A lower degree of PBMC L1 methylation in women with lower folate status may explain the MTHFR C677T polymorphism associated higher risk of CIN in the US post folic acid fortification era. PloS One 2014; 9(10).
- Baltazar-Rodriguez LM, Anaya-Ventura A, Andrade-Soto M, Monrroy-Guizar EA, Bautista-Lam JR, Jonguitud-Olguin G, et al. Polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter is associated with cervical neoplasm risk in Mexican women. Biochemical Genetics 2008; 46(3-4):137-144.
- Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. 007. Bioquímica. Reverte 2007.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2018; 68(6):394-424.
- Bui TGT, Hoa NTL, Yen J-y, Schafleitner R. PCR-based assays for validation of single nucleotide polymorphism markers in rice and mungbean. Hereditas 2017; 154(1):3.
- Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 2007; 20(3):213-221.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis 2017; 58(5):235-263.
- Corella D, Ordovas JM. Conceptos básicos en biología molecular relacionados con la genética y la epigenética. Revista Española de Cardiología 2017; 70(9):744-753.
- De Guglielmo C, Zoraya M, Fernandez Da Silva R. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. Revista Colombiana de Biotecnología 2016; 18(2):119-128.
- Del Valle AE, López-Vicente J, Martínez-Conde R, Aguirre-Zorzano L-A. Current understanding of genetic polymorphisms as biomarkers for risk of biological complications in implantology. Journal of Clinical and Experimental Dentistry 2018; 10(10):e1029.
- Delgado-Enciso I, Martínez-Garza SG, Espinoza-Gómez F, Canseco-Avila LM, Vidal-Gutiérrez O, Garza-Leal JG, et al. Interacciones entre polimorfismos del gen MTHFR, gestaciones e inicio de vida sexual modifican el riesgo para cáncer cérvico-uterino en una población del noreste de México. Revista de Investigación Clínica 2006; 58(5):462-469.
- Diamandis EP. Cancer biomarkers: can we turn recent failures into success? Journal of the National Cancer Institute 2010; 102(19):1462-1467.
- Eichholzer M, Lüthy J, Moser U, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. Swiss Medical Weekly 2001; 131(37-38):539-549.
- Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. Clinical and Experimental Immunology 1998; 113(2):183.
- Gong J-M, Shen Y, Shan W-W, He Y-X. The association between MTHFR polymorphism and cervical cancer. Scientific Reports 2018; 8(1):1-7.
- Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. Translational Cancer Research 2015; 4(3):256.

- Granados-García V, Flores YN, Pérez R, Rudolph SE, Lazcano-Ponce E, Salmerón J. Cost of the cervical cancer screening program at the Mexican Social Security Institute. Salud Pública de México 2014; 56(5):502-510.
- Guo C, Wen L, Song J-K, Zeng W-J, Dan C, Niu Y-M, et al. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget 2018; 9(15):12365.
- Hajiesmaeil M, Tafvizi F, Sarmadi S. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer. Infection, Genetics and Evolution 2016; 46:1-6.
- Hernández-Romano J, Martínez-Barnetche J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. Salud Pública de México 2009; 51:s455-s462.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico de Fibrosis Quística en la Edad Pediatrica. Mexico 2013.
- Kamel HFM, Al-Amodi HSB. Cancer Biomarkers. Role of Biomarkers in Medicine. IntechOpen 2016.
- Lai H-C, Chu C-M, Lin Y-W, Chang C-C, Nieh S, Yu M-H, et al. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. Gynecologic Oncology 2005; 96(2):314-319.
- Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature 2011; 470(7333):187.
- Lassere MN. The Biomarker-Surrogacy Evaluation Schema: a review of the biomarker-surrogate literature and a proposal for a criterion-based, quantitative, multidimensional hierarchical levels of evidence schema for evaluating the status of biomarkers as surrogate endpoints. Statistical Methods in Medical Research 2008; 17(3):303-340.
- Lee CH, Chang JSM, Syu SH, Wong TS, Chan JYW, Tang YC, et al. IL-1β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. Journal of Cellular Physiology 2015; 230(4):875-884.
- Li X, Nai S, Ding Y, Geng Q, Zhu B, Yu K, et al.. Polo-like kinase 1 (PLK1)-dependent phosphorylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) regulates replication via histone methylation. Cell Cycle 2017; 16(20):1933-1942.
- Malik MA, Sharma KL, Zargar SA, Mittal B. Association of matrix metalloproteinase-7 (-181A> G) polymorphism with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Kashmir Valley. Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association 2011; 17(5):301.
- Marti A, Moreno-Aliaga M, Zulet M, Martinez JA. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. Nutrición Hospitalaria 2005; 20(3):157-164.
- Mayor S. Genome sequence of one individual is published for first time. British Medical Journal Publishing Group 2007.
- Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. Nature Reviews Genetics 2010; 11(1):31.
- Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. Clinical Science 2008; 114(5):347-360.
- Moreno-Ortiz JM, Gutierrez-Angulo M, Partida-Perez M, Peregrina-Sandoval J, Ramirez-Ramirez R, Muniz-Mendoza R, et al.. Association of MMP7-181A/Gand MMP13-77A/G polymorphisms with colorectal cancer in a Mexican population. Genetics and Molecular Research 2014; 13(2):3537-3544.
- Naranjo TÁ, Noguera-Salvá R, Guerrero FF. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). Revista Española de Patología 2009; 42(4):249-261.
- Omenn GS, Nass SJ, Micheel CM. Evolution of translational omics: lessons learned and the path forward. National Academies Press 2012.
- Pandey N, Chauhan A, Jain N. TLR4 polymorphisms and expression in solid cancers. Molecular Diagnosis & Therapy 2018; 22(6):683-702.
- Pandey NO, Chauhan AV, Raithatha NS, Patel PK, Khandelwal R, Desai AN, et al. Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility. Scientific Reports 2019; 9(1):1-11.

- Pandey S, Mittal RD, Srivastava M, Srivastava K, Singh S, Srivastava S. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (− 196 to− 174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. Gynecologic Oncology 2009; 114(3):501-505.
- Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wang D, Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. Mutagenesis 2010; 25(4):371-379.
- Qiu W, Zhou G, Zhai Y, Zhang X, Xie W, Zhang H, et al. No association of MMP-7, MMP-8, and MMP-21 polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 2008; 17(9):2514-2518.
- Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Gaceta Medica de Mexico 2013; 149(2):220-228.
- Rosero CY, Corredor M, Mejía L. Polimorfismos en genes implicados en el desarrollo de cáncer gástrico: revisión. Revista Colombiana de Gastroenterología 2016; 31(4):391-402.
- Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. Molecular Biology Reports 2012; 39(8):8425-8430.
- Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DSB. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. Cancer Microenvironment 2009; 2(1):205-214.
- Singh H, Jain M, Mittal B. MMP-7 (− 181A> G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. Gynecologic Oncology 2008; 110(1):71-75.
- Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV, et al.. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. International Journal of Cancer 2001; 94(6):792-794.
- Sáez GT. DNA Damage and Repair in Degenerative Diseases 2016. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2017.
- Turner D, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. European journal of immunogenetics 1997; 24(1):1-8.
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Disease Markers 2007; 23(4):315-330.
- Yang S, Liu L, Xu D, Li X. The relationship of the tlr9 and tlr2 genetic polymorphisms with cervical cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. Pathology & Oncology Research 2018;1-9.
- Zhang H, Li G, Zhang Z, Wang S, Zhang S. MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms associated with cervical cancer risk. Int J Clin Exp Pathol 2017; 10(12):11760-11765.
- Zhang X-J, Guo W, Wang N, Zhou R-M, Dong X-J, Li Y.. The association of MMP-13 polymorphism with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. Hereditas 2006; 28(12):1500-1504.

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PERFIL DE INGRESO

Conocimientos generales de: Química, Física, Matemáticas y Biología

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

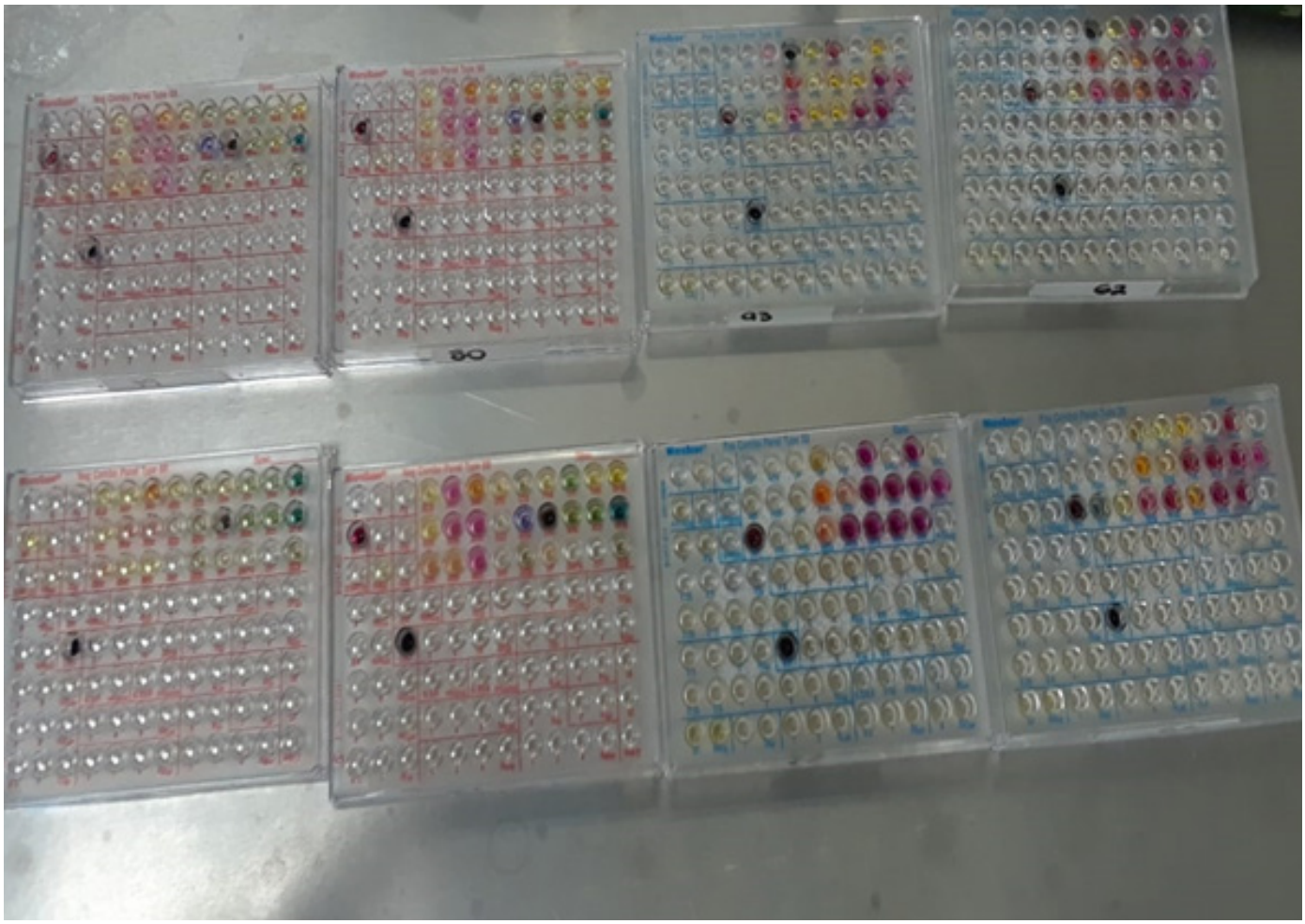
Tener espíritu emprendedor, una actividad proactiva y capacidad para trabajar en equipo.

PERFIL DE EGRESO

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

MICROBIOLOGÍA

(Clínica, Veterinaria, Vegetal)



"Caminante no hay camino, se hace camino al andar"
Antonio Machado (1875-1939): poeta español.

Búsqueda intencionada de β-lactamasas de espectro extendido en cepas de Escherichia coli de muestras diarréicas

[1]Díaz-González Yuritzi del Pilar, [1]Orona-Martínez Diana Cristina, [1]González-Yañez María Guadalupe Ernestina, [1]Castro-Barraza Fernando, [1]García-Luján Concepción

[1]Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, Universidad Juárez Del Estado De Durango. Av. Articulo 123 s/n Fracc. Filadelfia Gómez Palacio, Dgo., C.P. 35010. Tel. (871 7 15 88 10, FAX (871) 7 15 29 64

*Email correspondencia: conygarcialujan@hotmail.com

RESUMEN

En México, las enfermedades gastrointestinales son la causa principal de consulta médica y de muerte, por esto son consideradas un problema de salud pública. La cepa bacteriana más común asociada con la diarrea incluye a *E. coli.* Actualmente padecemos la resistencia bacteriana extendida por todo el mundo. Debido al aumento de fracasos terapéuticos en las infecciones por microorganismos como las enterobacterias, los estudios se han dirigido a investigar los mecanismos de resistencia de dichos gérmenes y se ha comprobado la presencia de bacterias productoras de enzimas inactivadoras de los antibióticos betalactámicos llamadas betalactamasas (BLEE). El objetivo de este estudio es identificar la presencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE en muestras diarreicas provenientes de un hospital de la Comarca Lagunera. Se consideró un número de 52 muestras diarréicas. Su identificación fue mediante tinción de Gram y BBL Crystal. Se determinó la resistencia de cada una de las cepas a los antibióticos y la producción de enzimas BLEE mediante el método de Jarlier. Fueron identificadas 27 cepas como E. *coli*, una cepa de *Rahnella aqualitis*, y una cepa de *Klebsiella oxytoca*; 23 cepas mostraron inhibición de crecimiento microbiano ante los antibióticos de uso común. En el estudio realizado no hubo presencia de β-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli,* sin embargo, se observó una alta resistencia a los antibióticos probados.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, antibiótico, cefalosporinas, enterobacterias

ABSTRACT

In Mexico, gastrointestinal diseases are the main cause of medical consultation and death, so they are considered a public health problem. The most common bacterial strain associated with diarrhea includes *E. coli*. We are currently suffering from bacterial resistance extended all over the world. Due to the increase of therapeutic failures in the infections by microorganisms such as the enterobacteries, the studies have been directed to investigate the mechanisms of resistance of these germs and it has been verified the presence of bacteria producing enzymes inactivators of betalactams antibiotics (BLEE). The objective of this study was identified the presence of strains of *Escherichia coli* producing BLEE in diarrheal samples from a hospital in the Comarca Lagunera. Were considerated 52 diarrheal samples. Its identification by Gram stain and BBL Crystal. The resistance of each of the strains to antibiotics and the production of BLEE enzymes was determined by the Jarlier method. 27 strains were identified as *E. coli*, one strain of *Rahnella aqualitis*, and one strain of *Klebsiella oxytoca* and 23 strains showed inhibition of microbial growth front to antibiotics of common use. In the study, it could be observed that there was no prevalence of β-lactamases of extended spectrum in strains of *Escherichia coli*, it demonstrates high resistance to antibiotics analized.

Keywords: Bacterial resistance, antibiotic, cephalosporins, enterobacteria.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, se han desarrollado nuevos antibióticos betalactámicos, diseñados específicamente para ser resistentes a la acción hidrolítica de las β-lactamasas. Sin embargo, con cada nueva clase de antibiótico que se usa para tratar a pacientes, emergen nuevas β-lactamasas que causan resistencia. La primera de esas enzimas capaz de hidrolizar los nuevos antibióticos se encontró en una cepa de *Klebsiella ozaenae* y, debido a su amplio espectro de actividad, se le denomino β-lactamasa de espectro extendido (Sánchez, 2008).

Debido al aumento de fracasos terapéuticos en las infecciones por microorganismos como las enterobacterias, los estudios se han dirigido a investigar los mecanismos de resistencia de dichos gérmenes y se ha comprobado la presencia de bacterias productoras de enzimas inactivadoras de los antibióticos betalactámicos (β-lactamasas). Dentro del grupo de bacterias productoras de β-lactamasas se encuentran las de espectro extendido (Escalante, 2013). El incremento en el aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE, posiblemente esté relacionado con el uso generalizado de cefalosporinas de amplio espectro. Ya que, a partir de 1983, cuando aparece la primera cepa productora de BLEE, estos microorganismos se han ido describiendo en diferentes partes del mundo. La presencia de una BLEE en enterobacterias puede determinar falla en el tratamiento de infecciones nosocomiales con cefalosporinas de tercera generación, cuarta generación y mono-bactámicos, a pesar de parecer sensibles en los resultados del antibiograma. La correcta detección de este mecanismo de resistencia en los aislamientos clínicos es, por lo tanto, una gran responsabilidad del laboratorio de microbiología (Enríquez, 2010).

La campaña del Día Mundial de la Salud Digestiva señaló que el 20% de las muertes se debe a diarrea y sólo el 39% de los casos con diarrea recibe el tratamiento recomendado. En la actualidad las BLEE son un serio problema en el tratamiento de infecciones nosocomiales. Es por eso que se propone identificar la presencia de las BLEE en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras diarréicas de un hospital de la Comarca Lagunera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento, caracterización e identificación de *Escherichia coli*

Para el aislamiento de la bacteria se utilizó agar selectivo y diferencial agar Mac Conkey. Se identificó la bacteria por medio de la tinción de Gram y por el sistema de identificación BBL Crystal.

El sistema de identificación BBL Crystal consiste en tomar un tubo de fluido de inóculo y anotar el número de la muestra en la etiqueta. Usando una técnica aséptica, se tomaron con un asa varias colonias de la misma morfología de uno de los medios de cultivo con los aislados bacterianos, poniendo las colonias en suspensión en un tubo BBL Crystal ID de fluido de inóculo. La turbidez fue equivalente a un patrón Mc Farland Nº 0.5. Rotulando una base del BBL Crystal ID con el número de la muestra empleada, se vertió todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área indicada de la base. Tomando la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo. Se balanceo nuevamente para escurrir el exceso de líquido de vuelta al área inicial. Alineando la tapa de modo que el extremo donde se encuentra la inscripción esté sobre el área inicial de la base. Presionando hacia abajo hasta que la tapa se asiente en su lugar para después ser incubada por 24 h a un intervalo de 35-37 °C. Los paneles fueron incubados boca abajo. Después del período de incubación, se continuó con su lectura, los paneles fueron leídos boca abajo usando el visor para paneles BBL Crystal Reacciones de color, para realizar la interpretación de las reacciones se usó el bloc de informes BBL Crystal GN para registrar las reacciones. La lectura se realiza de la columna A-J calculando del número de perfil BBL Crystal, cada reacción positiva recibe un valor de 4, 2 ó 1 según la posición de la celdilla en la fila donde se encuentre la reacción correspondiente, cada resultado negativo recibe un valor de 0. Los valores resultantes de cada reacción positiva en cada columna se sumaron. Obteniendo de esta manera un número de 10 dígitos. El número de perfil resultante y morfología celular se introdujo en el software BBL Crystal MIND, para obtener la identificación bacteriana.

Determinación de la resistencia de cepas de Escherichia coli a los antibióticos

Se realizó utilizando el método de difusión en disco. Las cepas reconstituidas se desarrollaron toda la noche en agar nutritivo. Se seleccionaron 2-3 colonias para preparar un inóculo en caldo soya tripticasa hasta igualar la turbidez con el estándar 0.5 de Mc Farland, y se sembraron en cajas con agar Müeller-Hinton, para luego colocar los siguientes sensidiscos: cefotaxima (30 µg), ampicilina, (10 µg), amoxicilina/ác. Clavulánico (30/10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), norfloxacino (10 µg), ofloxacin (5 µg).

Las cajas se incubaron por 24 horas y la resistencia o sensibilidad de los gérmenes se interpretaron comparando la medida de los diámetros de los halos de inhibición con tablas preestablecidas por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS).

Cepas sospechosas productoras de BLEE

Con base a las recomendaciones de la NCCLS, las cepas que presentaron los siguientes halos de inhibición para uno o varios de los antibióticos que se mencionan, fueron consideradas sospechosas de producir BLEE: [27 mm para cefotaxima], [22 mm para ceftazidima] y [25 mm para ceftriaxona], y fueron seleccionadas para realizarles pruebas fenotípicas confirmatorias para la producción de BLEE.

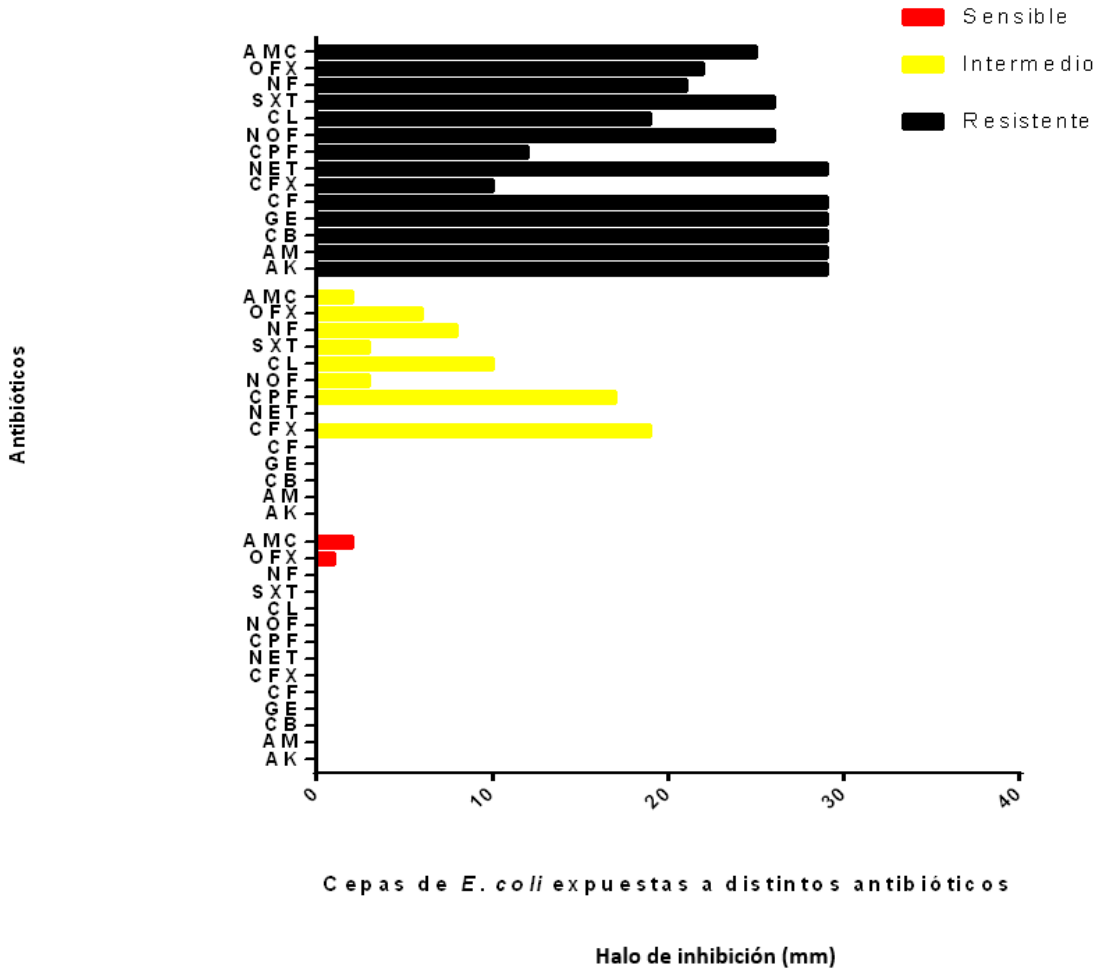


Figura 1. Cepas de *E. coli* expuestas a distintos antibióticos. En el eje de Y se localizan los antibióticos: AK (amikacina); Am (ampicilina); CB (carbenicilina); GE (gentamicina); CF (cefalotina); CFX (cefotaxima); NET (netilmicina); CPF (ciprofloxacino); NOF (norfloxacino); CL (cloranfenicol); SXT (sulfametoxazol/trimetropin; NF (nitrofurantoina); OFX (ofloxacin); AMC (amoxicilina/ácido clavulánico). En eje X se encuentran los halos de inhibición (mm).

REMDIS Vol. 2, No. 11, mayo 2020 ISSN: 2594-1445

Cuadro 1. Criterios de interpretación del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos.

Los siguientes criterios de interpretación fueron derivados para el agente antimicrobiano "X":

Método	Susceptible	Intermedio	Resistente
Difusión de Discos (mm)	≥21	17-20	≤16
CIM (μg/mL)	≤2	4	≥8

Determinación de la producción de enzimas BLEE por parte de cepas de Escherichia coli mediante el método de Jarlier

La identificación de especies bacterianas que presentan mayor porcentaje de producción de BLEE, se realiza mediante el método de Jarlier, este consiste en tomar una muestra de cultivo de *E. coli* para ser inoculado en caldo soya tripticasa, se introduce un hisopo al caldo para poder inocular una caja con agar Mueller–Hinton, con una turbidez similar a la suspensión de 0.5 de Mc Farland, se efectuó una prueba de susceptibilidad a CF3G (Ej; cefatoxamina y/o ceftazidima) colocando en el centro de la caja un disco con ácido clavulánico (en su defecto, un disco con amoxicilina/ácido clavulánico) conteniendo 10 µl de inhibidor, y a una distancia razonable (20 mm) los discos conteniendo estos antimicrobianos, cefotaxima (30mcg), ceftriaxona (30mcg) y ceftazidima (30mcg). Si la cepa ensayada resulta ser productora de BLEE, se produce incremento del halo de inhibición en la zona de interconexión entre la cefalosporina y el AC por el efecto sinérgico del inhibidor. Esta sinergia, es llamada "efecto huevo" o cola de pez.

Análisis de datos

Se elaboraron tablas con los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas, se identificó la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y se establecieron los límites de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos mediante el software GraphPad Prism 7.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* (productoras de BLEE) aisladas de muestras diarréicas provenientes de un hospital de la Comarca Lagunera son en su mayoría resistentes a los antibióticos de elección clínica (**Figura 1**).

Se identificaron 27 cepas de *E. coli*, una cepa de *Rahnella aqualitis*, y una cepa de *Klebsiella oxytoca* (el resto de las muestras mostró inhibición del desarrollo microbiano), fueron expuestas a los siguientes antibióticos: AK (amikacina); Am (ampicilina); CB (carbenicilina); GE (gentamicina); CF (cefalotina); CFX (cefotaxima); NET (netilmicina); CPF (ciprofloxacino); NOF (norfloxacino); CL (cloranfenicol); SXT (sulfametoxazol/trimetropin); NF (nitrofurantoina); OFX (ofloxacin); AMC (amoxicilina/ácido clavulánico).

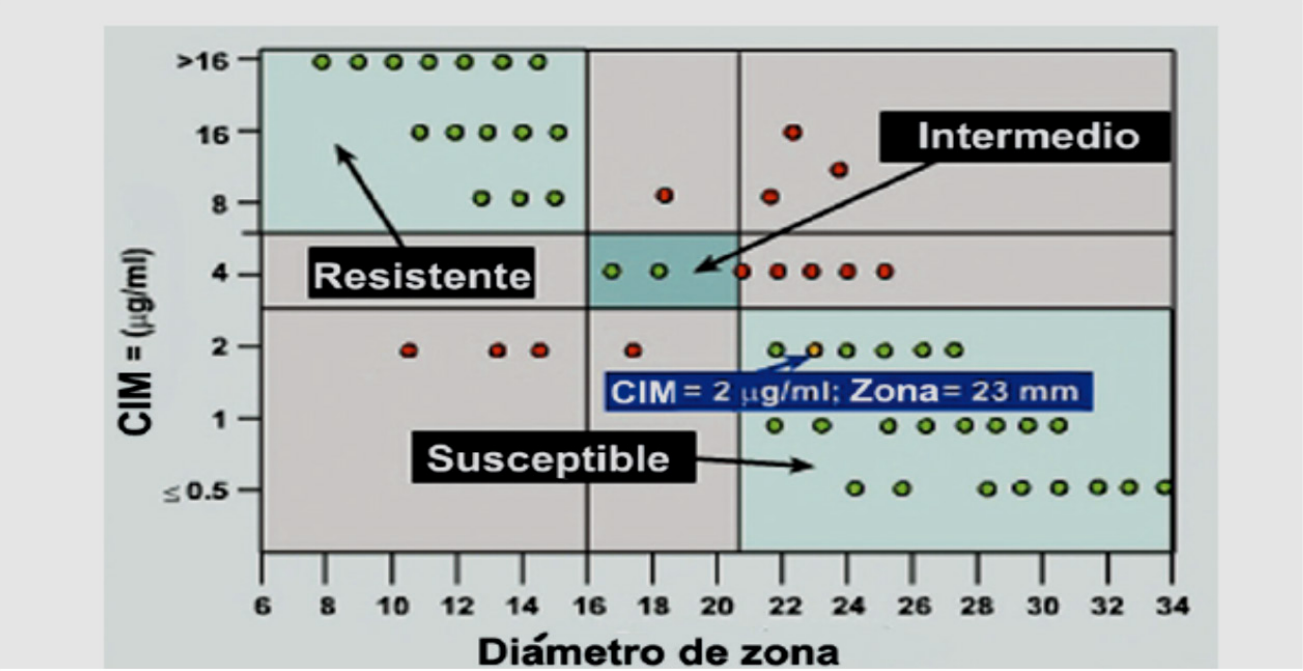
Además, se utilizaron los criterios del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos para las lecturas de interpretación (NCCLS) (**Cuadro 1**).

Para determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó el escalograma recomendado por el NCCLS y la FDA (**Cuadro 2**).

A finales de los años noventa la mayoría de las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) detectadas provenían de brotes epidemiológicos nosocomiales (Canton, 2007). En el presente estudio las 27 cepas de *E. coli* estudiadas son resistentes a los antibióticos: AK, Am, CB, GE, CF, CFX, NET, CPF, NOF, CL, SXT, NF, OFX y AMC. Las β-lactamasas de amplio espectro extendido son resistentes a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos (Bush, 1995). La aparición de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de amplio espectro se ha convertido en un gran problema de salud pública mundial. En los últimos años se ha producido un aumento de la incidencia de enterobacterias productoras de BLEE principalmente en *E. coli* (Garcia, 2013).

Se cuenta el número de puntos fuera del campo (puntos rojos) para calcular el porcentaje de aislamientos que presentan discrepancias entre la interpretación de difusión por disco y la concentración mínima inhibitoria (CIM, por sus siglas en inglés). Para que los criterios de interpretación sean aceptables, el porcentaje de errores no puede exceder los límites preestablecidos por la FDA y por el NCCLS.

Cuadro 2. Escalograma que muestra la interpretación de los límites preestablecidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y el NCCLS.



La multiresistencia a antibióticos que expresan estas cepas de *E. coli* productoras de BLEE, ocasionan un problema terapéutico importante tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario como ya se ha citado anteriormente se debe determinar un tratamiento adecuado en base a los resultados de susceptibilidad y resistencia. A pesar de que en la definición de BLEE se menciona que estas enzimas inactivan las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, múltiples estudios solo recomiendan con seguridad, al menos en la sepsis moderada o severa, a los carbapenémicos, sin embargo, presenta efecto inóculo, aumento de concentración inhibitoria mínima en presencia de inóculos bacterianos elevados (Canton, 2007).

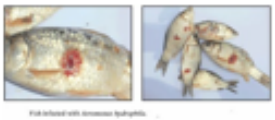
CONCLUSIONES

En el estudio realizado se pudo observar que no hubo presencia de β- lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras diarreicas provenientes de un hospital de la Comarca Lagunera.

Se puede considerar a *Escherichia coli* un agente muy importante en el padecimiento de diarreas en la Comarca Lagunera ya que en el presente estudio de 52 muestras de heces fecales analizadas se pudo recuperar *Escherichia coli* en 27 de ellas (52%) con un alto nivel de resistencia a los antibióticos probados.

LITERATURA CITADA

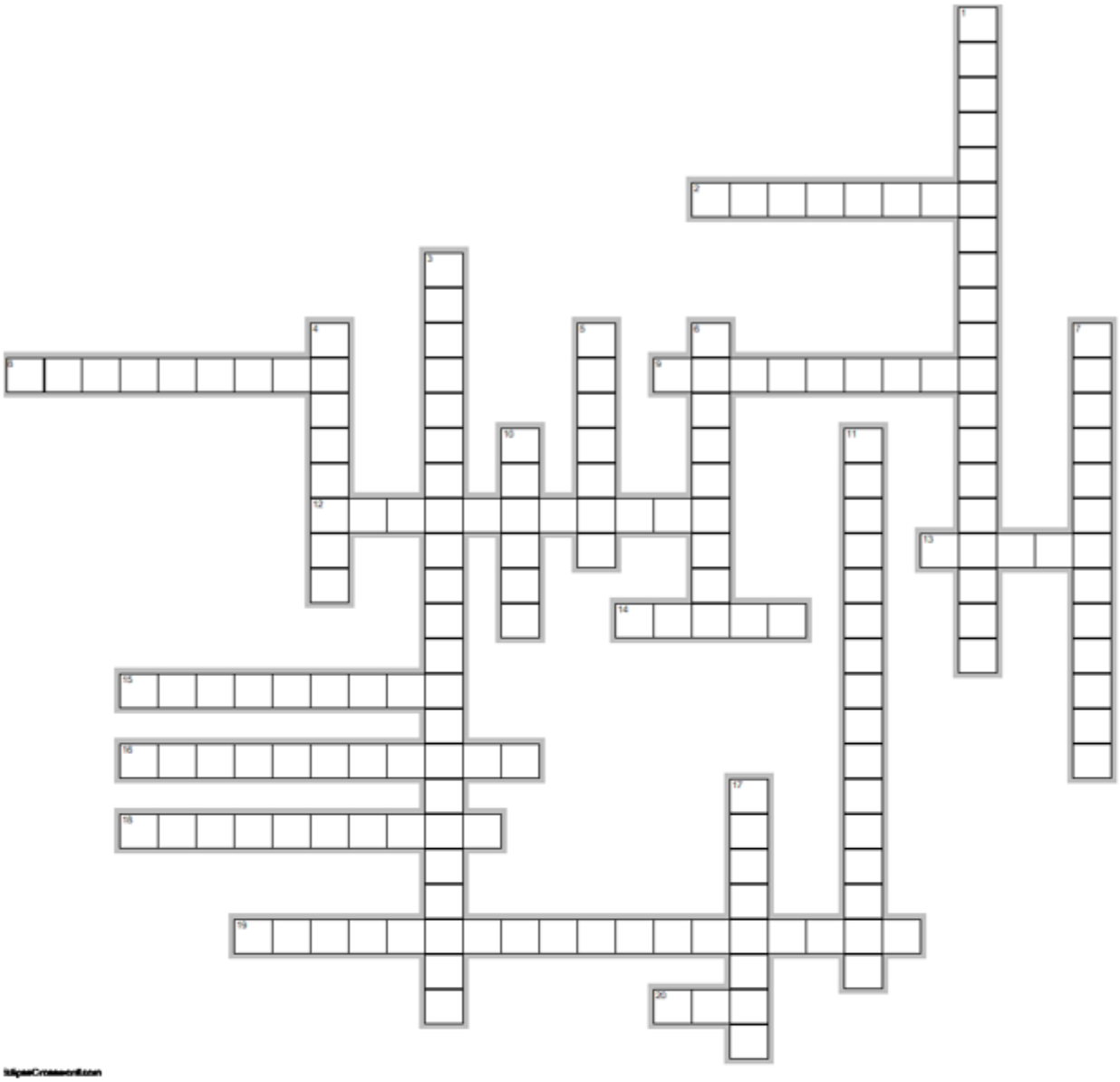
- Sánchez L, et al. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Asociación colombiana de infectología. 2008: 192-200.
- Escalante J. Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido.Revista Peruana de Epidemiología. 2013.
- Enríquez J, Peralta X. Determinación de la presencia de Betalactamasas de Espectro Extendidoo en cepas de Escherichia coli aisladas de muestras de orina de pacientes de la fundación de "Pablo Jaramillo. Universidad de Cuenca. (2010).
- Canton R. Evolución y panorama actual de las BLEE. Enferm Infecc Microbiol. 2007.
- Bush K. Functional Classification Scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. (1995).
- Garcia M. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Sanidad Militar. 2013; 244-248.

Cuerpo académico UJE-CA-125 Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública LGAC: Factores de virulencia y drogosensibilidad de las enfermedades infecciosas y Salud Pública		
Nombre proyecto	**Investigador responsable**	
Perfil microbiológico de úlceras de pie diabético y actividad antimicrobiana	Aurora Martínez Romero	
Identificación de fuentes de contaminación, una estrategia de saneamiento básico en la prevención de brucelosis humana		
Evaluación del efecto inhibidor y potenciador del plasma rico en plaquetas ante fármacos en microorganismos nosocomiales y su correlación con resistencia a fármacos		
Aplicación del árbol de neem en agricultura, industria, medicina y ambiente: una revisión.		
Diagnóstico de brucelosis caprina por serología y PCR múltiple		
Aislamiento de Mycobacterium abscessus en un paciente con afección cutánea		
Asociación entre el fenotipo del sistema sanguíneo AB0 y leucemias		
Análisis de los factores de crecimiento y su efecto inhibidor en microorganismos de importancia clínica	José de Jesús Alba Romero	
Aislamiento e identificación de Aeromonas productoras de biopelícula en peces del rio Nazas		
Aislamiento e identificación de microorganismos nosocomiales más frecuentes y análisis de sus factores de virulencia		
Análisis de expresión de los genes que codifican para bombas de expulsión y su correlación con resistencia a fármacos de primera y segunda línea por el método de azul de alamar en cepas de micobacterias		
Análisis de los genes lasI/lasR y rhli/rhlR como reguladores de transcripción de los factores de virulencia dependientes del Quorum sensing y su correlación a fármacos en cepas de Pseudomana aeruginosa aislada de pacientes hospitalizados		
Evaluación de los métodos para el diagnóstico de salmonelosis por ELISA y aglutinación en pacientes crónicamente expuestos		
Determinación de Plomo (Pb) y Arsénico (As) en cápsulas de gelatina dura y blanda para uso farmacéutico	Sandra Hernández González	

Problema de análisis instrumental

Explica cómo está constituido y cómo funciona un electrodo para la medición de pH.

Crucigrama de bioquímica



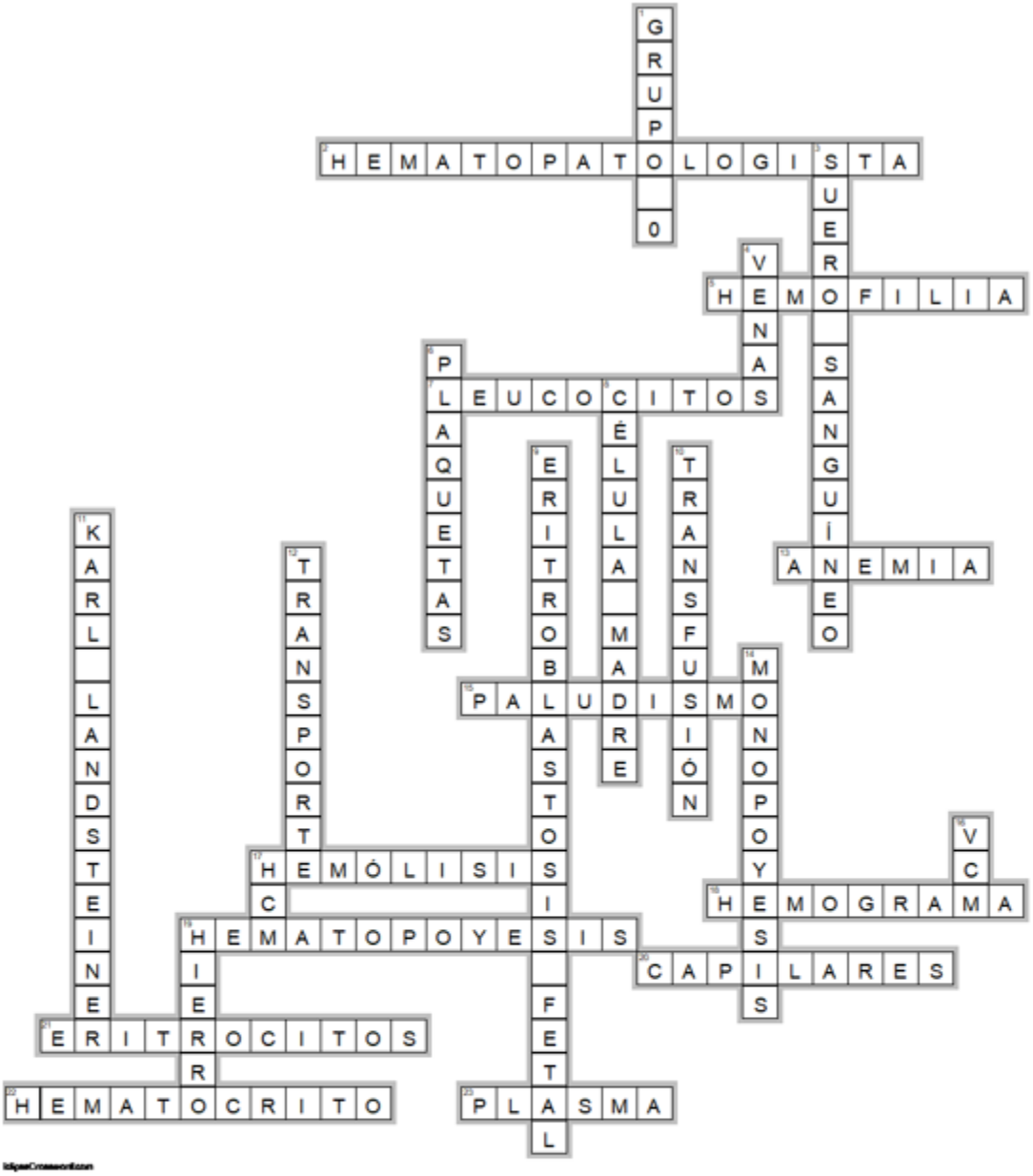
Horizontales

2. Conjunto organizado e interrelacionado de átomos de diversa naturaleza, ya sea de un mismo elemento químico o de elementos diferentes que dan un conjunto estable.
8. Macromolécula que almacena energía en las células de los mamíferos
9. Obtenido por la transesterificación de los lípidos en ésteres
12. Estudia la actividad catalítica de las enzimas
13. Unidad más pequeña e indivisible que constituye la materia
14. fibra sintética derivada del petróleo
15. Mecanismo de autodestrucción celular que permite al cuerpo controlar el desarrollo y crecimiento de las células
16. Organelo citoplásmico capaz de producir ATP y almacenar iones, moléculas de agua y proteínas
18. Estudioso de la química de la vida, lleva a cabo experimentación en materia médica, farmacológica, toxicológica, tecnología alimentaria, higiene y seguridad
19. Realizó la primera clasificación de los elementos periódicos en 1869
20. Macromolécula que almacena la información genética de una célula

Verticales

1. Delimitación, administración, preservación y comunicación son funciones de:
3. Se especializa en la arquitectura molecular de las sustancias orgánicas y macromoléculas biológicas
4. Unidad más pequeña que conforma a las macromoléculas
5. Macromoléculas que tienen función estructural
6. Se obtiene por la fermentación de monosacáridos no cristalizables o por la hidrólisis de polímeros de carbohidratos por las levaduras. Requiere de tres etapas: fermentación, destilación y deshidratación
7. Término acuñado por Hermann Staudinger en 1920. Sinónimo de polímero
10. Mezcla de gases que se descomponen de la materia orgánica por acción bacteriana
11. Publicó un artículo sobre la síntesis de la urea, demostrando que los compuestos orgánicos pueden producirse artificialmente
17. Proteína que tiene un mecanismo de acción sobre otros tejidos para el control de la glucosa en sangre

Respuesta al Crucigrama del número anterior



VERTICALES

3. Estudia la formación, desarrollo y maduración de los elementos componentes de la sangre
4. Medición del porcentaje sólido de la sangre
6. Enfermedad provocada por una madre Rh- que concibe un hijo Rh+
9. Trabaja rutinariamente en el cuidado y atención de pacientes con enfermedades hematológicas
11. Anemia por infección
12. Presencia de anticuerpos A y B en el plasma sanguíneo
13. Función de la sangre
16. Presentan una vida media de 120 días
17. Volumen corpuscular medio de los glóbulos rojos
18. Al transferir sangre incompatible se ocasiona...
19. Mide la cantidad promedio de hemoglobina de cada glóbulo rojo
20. Contiene sustancias inorgánicas como gases, sales, minerales, vitaminas y desechos metabólicos
21. No contiene factores de coagulación como el fibrinógeno
22. Mecanismo por el cual la sangre es repuesta cuando se pierde en grandes cantidades

HORIZONTALES

1. Realizó la caracterización de los tipos sanguíneos AB0
2. Fragmentos citoplásmicos provenientes de los megacariocitos
5. Permite el intercambio de gases y nutrientes con los tejidos
7. Formación de los monocitos
8. La causa principal de la anemia es la deficiencia de ...
9. Da información sobre índices corpusculares, recuento de elementos formes, valores de hemoglobina y valores normales
10. Su conteo normal está dentro del rango de 4,500 a 11500 células por microlitro
14. Dada por la cantidad disminuida de hemoglobina o hematocrito
15. Precursor celular multipotente
17. transportan sangre a baja presión por medio de válvulas
19. Desorden de la sangre

Respuesta al problema del número anterior

Método	% Ca			
A	73,2	73,0	73,4	73,3
B	69,8	71,4	71,3	70,2
C	70,7	71,1	71,7	71,5

Porcentaje real de Ca en CaO es 71,3. ¿Qué método es más exacto? ¿Cuál tiene más precisión?

EXACTITUD

Porcentaje real de Ca en CaO	71,3

	A	B	C
	73,2	69,8	70,7
	73,0	71,4	71,1
	73,4	71,3	71,7
	73,3	70,2	71,5
Σ	**292,9**	**282,7**	**285,0**
Media	73,225	70,675	71,250
Ea	1,925	-0,625	-0,050
Er	2,700	-0,877	-0,070

Ea es el error absoluto = (media laboratorio – valor real)

Er es el error relativo = (error absoluto/media) x 100

El método más exacto es el C puesto que tiene un menor error absoluto

PRECISIÓN

Hacemos una tabla con los datos y calculamos "s" con la fórmula: $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$

	A	B	C
	Ixi - medI2	Ixi - medI2	Ixi - medI2
	0,001	0,766	0,302
	0,051	0,526	0,023
	0,031	0,391	0,203
	0,006	0,226	0,063
Σ	**0,088**	**1,908**	**0,590**
"s"	0,17	0,80	0,44

El valor más pequeño de "s" indica una mayor precisión, en este caso el método A

La Universidad Juárez del Estado de Durango

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio

a través de la

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Convoca

A todas las personas interesadas, egresadas de las carreras de Químico Farmacéutico Biólogo, Ingeniero Químico en Alimentos, Medicina, Biología, Ingeniería Química, Ingeniería Bioquímica, Agronomía, Ecología, Biotecnología entre otras áreas afines; que tengan conocimientos en el área de química, biología y estadística, destreza en el manejo de instrumental de laboratorio, habilidades orales escritas (En español e inglés) y habilidades en el uso de herramientas informáticas, que tengan iniciativa así como, interés en la investigación, creatividad, disciplina y con visión holística, para participar en el proceso de admisión y ser candidato a la:

Maestría en Ciencias Químicas

Líneas de Investigación:

- ✓ Desarrollo e Innovación de los Alimentos
- ✓ Bases Bioquímicas y Moleculares de la Salud Ambiental

Opciones terminales:

- ✓ Ciencia y Tecnología de los Alimentos
- ✓ Ciencias Bioquímicas

Padrón Nacional de Posgrados de Calidad CONACYT

Fechas importantes

Venta de fichas: Del 18 de febrero al 10 de abril

1ª Etapa:

- Fecha límite para entrega de solicitudes y papelería: 12 de abril

2ª Etapa:

- Curso propedéutico el 29 de abril al 19 de junio
- Evaluación Psicométrica:
  - ✓ Entrevista: 13 – 17 de mayo
  - ✓ Examen psicométrico: 3 de junio
- Examen de conocimientos: 15 de abril
- EXANI III el 08 de junio

3ª Etapa:

- Presentación de proyecto, trabajo de tesis o artículo
- Entrevista con comité de selección: 20 y 21 de junio
- Publicación de resultados el 3 de julio
- Inscripciones nuevo ingreso: 5 de agosto
- Plática de inducción: 5 de agosto 2019
- **Inicio de clases el 12 de agosto 2019**

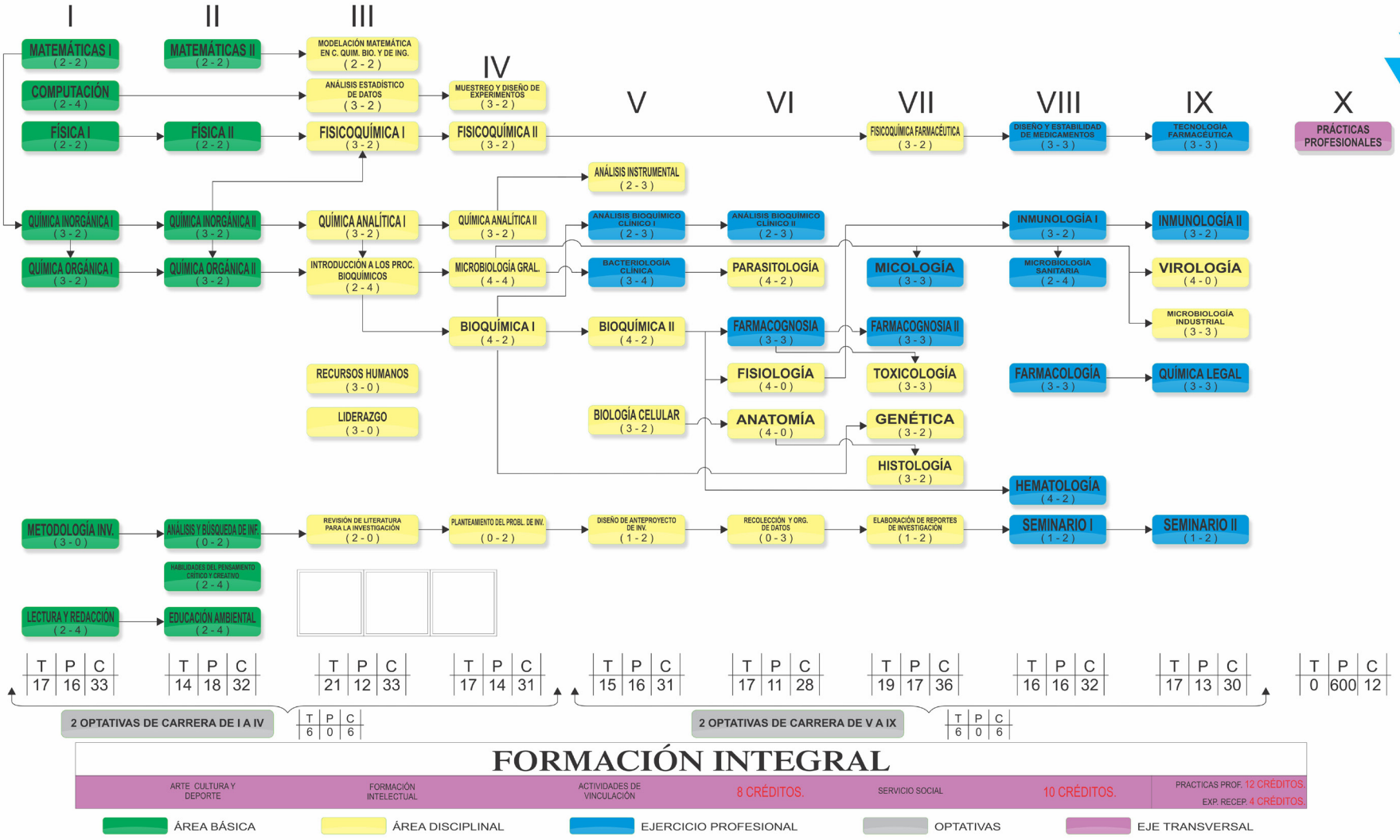
Requisitos para ficha.

- Copia de acta de nacimiento con formato nuevo
- Copia del certificado de licenciatura o constancia de estudios con calificaciones y promedio mínimo de ocho
- Copia notariada de título o acta de examen profesional
- CV con documentos probatorios
- 2 fotografías tamaño credencial
- CURP
- RFC
- Credencial de elector IFE o INE
- 2 cartas de recomendación de investigadores consolidados
- Recibo de pago de ficha

Mayores informes:
Dra. Concepción García Luján
posgradofcqgp@ujed.mx
Tel: (871) 7158810 ext. 118 y 131
Pág. Web: www.fcqgp.ujed.mx

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MAPA CURRICULAR



REMDIS (fcqgp.ujed.mx)
ISSN: 2594-1445
Publicación Semestral de Investigación Cientifica 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
Telefono (871) 715 8810 FAX (871) 715 2964
e-mail: editorremdis@gmail.com