

REVISTA de la Sociedad Mexicana de

BioTECNOLOGIA

y Bioingeniería A.C.



Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería A.C.

REVISTA de la Sociedad Mexicana de
BIO TECNOLOGIA
y Bioingeniería, A.C.

MESA DIRECTIVA

Dra. Amelia Farres González Sarabia
Presidenta

Dra. María Luisa Villarreal Ortega
VicePresidenta

Dra. Judith Jiménez Guzmán
Secretaria

Dra. Gabriela Rodríguez Serrano
Tesorera

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Subsecretaria

Dra. Marco Rito Palomares
Vocal

I.A. Alaide Jiménez Serna
Vocal Estudiante

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Instituto Investigaciones Biológicas, UNAM

Dra. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAMI

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto Investigaciones Biológicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

SUSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

Lic. Elydeé Cardeña Medina
Tel./ Fax (01 55) 5849 5859
ambiotec@yahoo.com.mx

FORMACIÓN EDITORIAL Y DISEÑO GRÁFICO

Lic. Elydeé Cardeña Medina

COORDINADOR EDITORIAL

Lic. Elydeé Cardeña Medina

BioTecnología

ISSN 0189-976, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias (CICL-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1 200-08251 602000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 20.5 Carretera Federal México-Chetumal, Av. Cipréses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 1-400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares

EDITORIAL

El número que ahora presentamos marca el fin de un ciclo y el inicio de otro en la revista BIOTECNOLOGIA, órgano de difusión de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.

Los doctores Mayra de la Torre, Gustavo Viniegra y Octavio Loera tienen ahora nuevas tareas y responsabilidades que les impiden continuar con su labor de editores. A nombre de la Mesa Directiva 2004-2006 les manifestamos nuestro más sincero agradecimiento por la labor realizada y les deseamos el mayor de los éxitos en sus nuevas actividades. Su labor ha sido fundamental y nos dejan muchas ideas y posibilidades para el desarrollo futuro de la revista.

Es un honor dar la bienvenida como Editor en Jefe al presidente fundador de nuestra Sociedad, el Dr. Sergio Sánchez Esquivel. Le agradecemos el haber aceptado este reto, dada su experiencia como editor y colaborador de varias publicaciones nacionales e internacionales. El invitará a nuevos colaboradores para formar un comité editorial más amplio. Con él y con la mesa directiva 2006-2008 se tomarán decisiones importantes para el futuro de la revista, por lo que esperamos la respuesta y comentarios de todos los agremiados. Una de las principales decisiones a tomar es convertir la revista impresa en una electrónica. Otra, de fondo, es si será un órgano de difusión y divulgación. Estaremos abiertos a todas las opiniones. Estamos seguros de que esta nueva etapa será un éxito, dadas las innegables cualidades y la trayectoria del nuevo editor.

DRA. AMELIA FARRES
Presidenta de la Mesa Directiva Nacional
2006-2008

Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales

Heidy Pérez-Leonard

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 esquina Carretera Central, San Miguel del Padrón, AP.4026, Cuba. E-mail: heidy.perez@icidca.edu.cu

Palabras clave: Lactobacilos, probióticos, flora vaginal, infecciones urogenitales

RESUMEN

La necesidad de superar los problemas existentes en cuanto al uso de antibióticos, han impuesto a los investigadores una interesante e importante tarea en la búsqueda de productos o sustancias naturales bioactivas, como son los probióticos. En el área de ginecología, constituyen preparaciones con microorganismos vivos usadas intra-vaginalmente para prevenir infecciones y restaurar el balance ecológico microbiano afectado o desequilibrado. Dicha terapia se considera natural y sin efectos colaterales en contraste con los tratamientos farmacéuticos convencionales.

La flora microbiana normal de la vagina juega un papel importante en la prevención de infecciones en el tracto genital y urinario en mujeres. Las bacterias ácido lácticas son dominantes del tracto vaginal en mujeres saludables, específicamente los lactobacilos. Estos forman una barrera que protege la colonización de patógenos por distintos mecanismos y han sido enfocados para tratar pacientes con infecciones del tracto urogenital (UTI), vaginosis bacteriana (BV) y otro grupo de infecciones genitales, excluyendo candidiasis.

Sistemáticamente, los lactobacilos no han sido asociados con daños y por ende son considerados como miembros no patógenos de la flora intestinal y urogenital. Más recientemente, el uso de probióticos *per se* y lactobacilos reciben mayor atención como una alternativa natural para restaurar y mantener la salud. Ha sido observado que dos cepas de lactobacilos, GG (ATCC 53103) y GR-1 son efectivas para la colonización y protección del tracto intestinal y urogenital contra infecciones microbianas.

Esta revisión está dirigida hacia nuevas aplicaciones de la biotecnología, puesto que la perspectiva del uso de los lactobacilos probióticos contribuye al desarrollo de productos naturales para el riesgo a infecciones en el

tracto urogenital, lo cual alcanza gran importancia e impacto social en la calidad de vida de la mujer.

Key words: *Lactobacillus*, probiotics, vaginal flora, urogenital infections

ABSTRACT

The necessity to overcome the problems existing on antibiotics use, have attracted the attention of the research community to an interesting and important task in the seek for products or natural bioactive substances, namely probiotics. In the gynecological area, they constitute preparations with living microorganisms by intra-vaginal application to prevent infections and to restore the ecological microbial balance affected or unpaired. This therapy is considered natural and without side effects in contrast with the conventional pharmaceutical treatments.

The normal microbial flora of the vagina plays an important role in the prevention of infections in genital and urinary tracts in women. Lactic acid bacteria are dominant in the vaginal tract in healthy women, especially those of the lactobacilli genus. *Lactobacillus* species form a barrier that protects from pathogen colonization through different mechanisms. These bacteria have been used to treat patients with urogenital tract Infections (UTI), bacterial vaginosis (BV) and other genital infections, except candidiasis.

Systematically, lactobacilli have not been associated with damages and therefore they are considered as non pathogenic members of intestinal and urogenital microbiote. They are used in the industry of fermented food as probiotics for human and in animal nutrition, as well. More recently, the use of probiotics *per se* and particularly lactobacilli, have received bigger attention like a natural alternative to restore and to maintain the health. It has been found that two strains of *Lactobacillus*, GG (ATCC 53103) and GR-1 are effective to colonize and protect the intestinal and urogenital tract against microbial infections.

This revision is directed toward new applications of the biotechnology. The perspective of the use of the lactobacilli probiotics contributes to the development of

natural products to prevent the risk of infections in the urogenital tract, which has great importance and social impact in the quality of the woman's life.

INTRODUCCIÓN

Uno de los desafíos que presenta la Biotecnología, es la búsqueda de alternativas al uso de los antibióticos mediante sustancias naturales que disminuyan las infecciones que se presentan en el tracto urogenital provocados por bacterias patógenas. Sin duda, la situación que se ha creado entre los antibióticos y las bacterias debido a los problemas de resistencia entre ellos constituye una frontera a solucionar. Esto demuestra que la búsqueda de compuestos a partir de microorganismos continúa siendo la principal fuente de nuevos antimicrobianos.

Dentro de las bacterias patógenas más frecuentes en el tracto urogenital se enumeran: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae* (Heather, 2003).

Existe una amplia investigación acerca de los probióticos, dirigida fundamentalmente hacia los problemas intestinales y en menor medida aplicados en la flora respiratoria y bucal. Pocas investigaciones y grupos de investigadores se encuentran desarrollando estudios para prevenir las enfermedades del tracto génito-urinario, causado por las diversas infecciones vaginales, de transmisión sexual y el VIH.

El propósito de este artículo, consiste en destacar la necesidad de diseñar productos farmacéuticos en base de microorganismos probióticos que favorezcan la restauración de la microflora vaginal y/o prevenga el desarrollo de infecciones del tracto genital femenino, lo cual alcanza gran importancia e impacto social en la calidad de vida de la mujer.

LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD UROGENITAL

Ecosistema urogenital

El tracto urogenital de la mujer sana es un ecosistema dinámico, ecológicamente estable y

balanceado. Las condiciones normales y el equilibrio ecológico pueden ser modificados por cambios en su estructura y composición debido a la influencia de una serie de factores tanto del huésped como exógenos. Es caracterizado por una flora microbiana compleja, cuyo equilibrio sufre numerosas fluctuaciones debido a la interrelación entre la microflora endógena y los productos metabólicos del huésped, estrógeno y pH (Burton & Reid, 2002).

Los niveles de estrógeno juegan un papel importante en la regulación de la flora vaginal ya que estimula la secreción de glucógeno (Larsen, 1993). Muchos estudios confirman que las células de la vagina son ricas en glucógeno con algunas cepas de *Lactobacillus* capaces de fermentar directamente el glucógeno e incrementar (<http://www.cientec.or.cr/equidad/seres.html>) la acidez de la vagina.

Redondo *et al.* (1990) realizaron un estudio comparativo de la microflora urogenital de mujeres en buenas condiciones de salud y de mujeres con infecciones urinarias o vaginales y demostraron claramente que los episodios infecciosos se asocian a una disminución importante, o hasta desaparición, de los lactobacilos endógenos. Debido a esto, se evidencia que los lactobacilos endógenos representan, en la prevención de las infecciones urogenitales, un papel similar al que tienen en el intestino.

Flora vaginal normal

Fue una de las primeras en ser reconocida en 1892 por Döderlein quien identificó la presencia o ausencia de bacilos Gram-positivos en la flora vaginal normal y nombró a este organismo "*Bacillus Döderlein*", actualmente conocido como *Lactobacillus acidophilus*. El glucógeno es utilizado por *Lactobacillus* spp., siendo el ácido láctico el producto final de su metabolismo que ocasiona un descenso importante del pH que inhibe muchas bacterias (Juárez *et al.*, 2003). El ambiente ácido de la vagina con pH entre 4 y 5 es un mecanismo de defensa contra la colonización de patógenos, lo cual

contribuye al restablecimiento de la flora vaginal y la prevención de infecciones urogenitales.

BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS EN EL ÁREA VAGINAL

Existe una marcada tendencia mundial acerca del empleo de productos probióticos con resultados altamente satisfactorios para la salud humana. Evidencias científicas, demuestran la efectividad de la administración de probióticos frente a situaciones clínicas o infecciones en el tracto urogenital. Su aplicación, particularmente como bioterapéuticos, ha alcanzado gran interés con vistas a diseñar productos farmacéuticos a base de microorganismos. Esto hace sumamente atractiva la búsqueda de productos naturales viables empleando la terapia con probióticos, definida como preparaciones con microorganismos vivos usadas intravaginalmente para prevenir infecciones y restaurar el balance ecológico microbiano afectado o desequilibrado. Dicha terapia se considera natural y sin efectos colaterales en contraste con los tratamientos farmacéuticos convencionales.

Las investigaciones que se han llevado a cabo en el mundo, ayudan a resolver los siguientes problemas: Favorecer la restauración de la microflora vaginal y/o prevención del desarrollo de infecciones del tracto genital femenino, incrementar la calidad de vida de la mujer favoreciendo su salud reproductiva, acortar el tratamiento farmacológico contra infecciones vaginales y disminuir patologías obstétricas y ginecológicas de importante impacto social y económico.

Lactobacilos en la vagina

Los grupos de microorganismos predominantes en el área de la vagina pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Klebanoff & Coombs, 1991). *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* son las especies de lactobacilos más prevaletentes en la vagina (Suárez *et al.*, 1998). Las bacterias lácticas, específicamente los lactobacilos (ver Fig. 1), constituyen la flora endógena y habitual siendo los más frecuentes y

predominantes en la vagina en concentraciones de 10^7 - 10^8 UFC/g lo cual representa el 50 al 90% de la

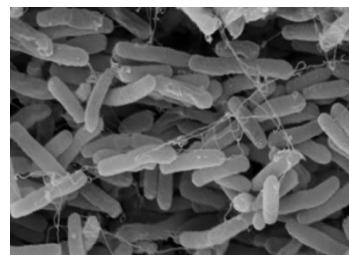


Fig. 1. *Lactobacillus*

microflora. *Lactobacillus acidophilus*, es la bacteria dominante en un ecosistema vaginal saludable (Cullins *et al.*, 1999). Alrededor de 80 especies diferentes de lactobacilos han sido identificadas (Cibley, 1991). Disminuyen el pH vaginal mediante la producción de productos ácidos, haciendo la vagina inhabitable a algunas especies bacteriales (Mardh, 1991) y mantiene la flora vaginal a pH de 3.8 a 4.2. Hawes *et al.* (1996) encontraron organismos de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que actuaron como protectores contra el desarrollo de vaginosis bacteriana, no siendo de esta manera en los no productores de H_2O_2 .

Infecciones del Tracto Vaginal

Un grupo de infecciones están involucradas en la mujer con alto porcentaje de prevalencias a nivel mundial y se destaca la frecuencia en que cada día ocurren estos trastornos. Las enfermedades que se manifiestan en esta área son: vaginosis bacteriana, candidiasis vaginal, cervicitis, de transmisión sexual e infecciones urinarias (Ferris *et al.*, 2002).

Dentro de los microorganismos productores de los distintos cuadros clínicos se encuentran *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Enterococcus faecium*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterobacterias* y estreptococos del grupo B (Atias, 1994). De éstas, la vaginosis bacteriana es la queja vaginal más común, seguida por la candidiasis y trichomoniasis (Cullins *et al.*, 1999). En la tabla 1 se muestran las enfermedades más recurrentes en

el tracto vaginal y que a continuación se brindarán detalles de las mismas.

Tabla 1. Enfermedades más frecuentes que provocan trastornos en la flora vaginal de mujeres.

Enfermedades vaginales	Microorganismo patógeno	Riesgos y causas
Vaginosis bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Disminución de lactobacilos e incremento del pH de la vagina, partos prematuros, ruptura prematura de membranas ovulares, aborto espontáneo, infección del fluido amniótico endometritis post-parto (a).
Candidiasis vaginal	<i>Candida albicans</i>	Disminución de los niveles de glucógeno en el epitelio vaginal (b).
Trichomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	En mujeres embarazadas: Ruptura prematura de las membranas de la placenta, infantes con bajo peso al nacer, además de infecciones post-quirúrgicas del tracto reproductor. Presencia de pH alcalino y disminución de los depósitos de glucógeno de la mucosa (c).

a)-Carey *et al.*, 2000

b)-Heather, 2003 (c)-Rojas *et al.*, 1998

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PROTECCIÓN CONTRA INFECCIONES UROGENITALES

Se ha discutido cuáles serían las condiciones de los microorganismos para ser usados en el tracto urogenital (McGroarty, 1993). Se agrupan un número de mecanismos por los cuales actúan estas preparaciones probióticas ejerciendo efectos positivos para la salud humana y con validez para realizar criterios de selección y ensayos “*in vitro*” con determinados organismos y cuyos mecanismos son:

1. *Presencia de microorganismos normales del área que actúa como barrera y ejerce resistencia a la colonización patógena y donde también es importante la congregación.*

Poco es conocido acerca de los mecanismos por los cuales los lactobacilos de la vagina de mujeres jóvenes saludables se adhieren a las células del epitelio vaginal, sin embargo, la variedad de estructuras superficiales en

estas bacterias implica que puede existir un espectro de los mecanismos de adherencia (Balotescu & Petrache, 2004). Además, la agregación por sí mismo puede aumentar substancialmente la colonización potencial de lactobacilos en el medio ambiente, con tiempos de residencia cortos. La adhesión puede ser detectada por reacciones de hemaglutinación (Ocaña & Nader, 2002).

2. *Producción de sustancias antagónicas y antimicrobianas tales como ácido orgánicos (ácido láctico, acético, fórmico).*

Estos ácidos orgánicos disminuyen el pH del medio y su principal mecanismo inhibitorio es la fracción no disociada de los mismos y el bajo pH del área, pues se ha considerado este mecanismo primario el papel protector contra infecciones vaginales y de dominancia ecológica. Estos ácidos generan un pH ácido en la vagina y son producidos por los lactobacilos, lo cual permite que este género resista la acidez y ocupen su predominancia en la microflora.

3. *Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y metabolitos tóxicos del oxígeno.*

Algunos lactobacilos producen metabolitos secundarios como el H₂O₂ y especies citotóxicas del oxígeno como: el ión superóxido (O₂⁻), hidrógeno, iones hidroxilos (HO) y/o amonio. Este mecanismo influye en la colonización de los lactobacilos para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, pues se ha demostrado “*in vitro*” que los lactobacilos productores de H₂O₂ inhiben y eliminan a *G. vaginalis* y *P. bivio* (Strus *et al.*, 2002).

4. *Producción de bacteriocinas, sustancias similares a éstas y antibióticos.*

Las bacteriocinas son sustancias de origen proteico que poseen una marcada actividad antimicrobiana contra un determinado grupo de microorganismos (González *et al.*, 2003). Se acepta una hipótesis sugiriendo que la acción letal tiene lugar en dos fases: la bacteriocina se absorbe a receptores específicos en la envoltura celular y posteriormente tienen lugar una serie de lesiones bioquímicas letales en la membrana (Pérez *et al.*, 2000).

5. *Producción de sustancias biosurfactantes.*

Los lactobacilos han mostrado capacidad de producir sustancias adhesivas antipatógenos, es una mezcla cruda la cual es nombrada *biosurfactante*, cuyo efecto inhibitorio

puede extenderse a un amplio rango de patógenos virulentos (Reid & Bruce, 2001). Se presume, que estos biosurfactantes proteínicos principalmente son producidos *in situ*, quizás ayudado por el bajo pH.

A través de los lactobacilos se pueden llevar a cabo estos mecanismos de acción de gran importancia para el buen funcionamiento de la flora vaginal y su ecosistema. Dentro de ellos, se le ha dado particular interés a aquellos que producen H_2O_2 por su capacidad de restaurar el equilibrio ecológico y protector, así como su efecto antagonico. Por esta razón, es necesario realizar estudios en cuanto a la producción de H_2O_2 por lactobacilos y optimización de las condiciones de producción de este metabolito.

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La formación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) depende generalmente de la ausencia o bajos niveles de catalasa. Una vez formado es de interés detectarlo y cuantificarlo para explicar el efecto antimicrobial. Existen ensayos para la liberación celular de H_2O_2 que incluyen:

-Oxidación dependiente de catalasa de formato a CO_2 , generación de productos fluorescentes debido a la reacción oxidativa mediada por el H_2O_2 , pérdida de la fluorescencia en la oxidación de escopoletina, cambio en la absorbancia en la oxidación de fenol rojo y formación de un complejo enzima-sustrato con peroxidasa, especialmente peroxidasa horseradish (HRP) (Rabe & Hillier, 2003).

Este último ensayo es el más empleado para medir H_2O_2 usando peroxidasa, los cuales son susceptibles a interferencias por reducción de co-sustratos que compite con el indicador y ha sido utilizado por diferentes autores. Dentro de los sustratos más comunes a utilizar se encuentran: benzidina, o-tolidina, o-toluidina, o-dianisidina y tetrametilbenzidina (TMB).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El estudio de selección de cepas de lactobacilos y screening productoras de H_2O_2 conlleva a emplear

métodos de detección y cuantificación selectivos, así como determinar la influencia de diferentes factores citados a continuación:

-Factores nutricionales: El nutriente esencial presente en el área de la vagina es el glucógeno, el cual constituye el principal hidrato de carbono y la glucosa está presente en el fluido vaginal en concentraciones de 100 $\mu g/mL$, mientras que las proteínas como la albúmina es otro nutriente necesario que se encuentra en una concentración de 50 $\mu g/mL$,

-Factores hormonales: En este caso, se debe tener en cuenta el estrógeno y sus niveles en la vagina, pues se plantea que los niveles de estrógeno influyen en el contenido de glucógeno en la pared vaginal "*in vivo*" jugando un papel importante en la regulación de la flora vaginal. Se sugiere por otros autores que la administración de estrógeno aumenta el contenido de glucógeno, pero también la proliferación celular por lo que la concentración de glucógeno por células permanecería constante. Además no se han reportado estudios sobre el efecto hormonal.

-Factores físico-químicos: a)-pH vaginal: El pH de esta área en condiciones saludables es entre 3.8 y 4.5. Por encima de este rango comienza un desequilibrio que propicia que se produzcan las enfermedades. Un ejemplo, es la infección de vaginosis bacterial que se manifiesta a pH 4.7. b)-Producción de ácido láctico: Crea un medio ambiente ácido que ayuda a la flora con mecanismos que permiten la colonización de los lactobacilos y no de los microorganismos patógenos.

EFFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS EN MEDICINA HUMANA

Antes de iniciar los estudios en humanos, *L. rhamnosus* GR-1 fue encontrado ser el mejor de 34 cepas de lactobacilos en cuanto a células uroepiteliales transicionales, exclusión competitiva de patógenos y producción de inhibidores del crecimiento de uropatógenos (Reid *et al.*, 1987).

Se han descubierto 5 cepas de lactobacilos capaces de producir biosurfactantes que le confieren acción probiótica contra uropatógenos (Velraeds *et al.*, 1996). *Lactobacillus acidophilus* RC-14 manifestó una variedad de proteínas con masas moleculares desde 14.4 a 140

kDa (Velraeds *et al.*, 1997). La actividad biosurfactante es resistente a tripsina y pepsina, sensible a α -amilasa y lisozima y resistente a 75°C. Se detectó un componente activo, el cual fue un colágeno unido a proteína (Heinemann *et al.*, 2000).

Estudios *in vitro* describieron la inhibición de ciertos grupos de bacterias y VIH por lactobacilos productores de H₂O₂, efecto que disminuye o se elimina por la adición de catalasa, poniendo en evidencia la acción del H₂O₂ (Klebanoff *et al.*, 1991). Un número de estudios clínicos con lactobacilos mostraron la prevención de recurrencias de Infecciones en el tracto urogenital (UTI). En pacientes con estos síntomas se realizó la inserción intravaginal y la implantación perineal de la cepa de lactobacilo GR1 semanalmente. Se obtuvo un período libre de infección de 4 semanas a 6 meses (Bruce & Reid, 1988). Otro estudio aplicado a 55 mujeres con las cepas *Lactobacillus* GR-1 y B-54, redujo la principal incidencia de UTI en un 79% (Reid *et al.*, 1995). Reid *et al.*, 1992 demostraron que la administración de lactobacilo como supositorio vaginal después del tratamiento con agentes antimicrobiales disminuyó la velocidad de recurrencia a 21% comparado con el 47% en el grupo control.

Se reporta que la administración oral de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 diariamente mejoró la flora vaginal, lo cual disminuyó el conteo de levaduras y coliformes (Reid *et al.*, 2003). Durante la ingestión oral, estos microbios pasan mediante el intestino y ascienden desde el recto hasta la vagina donde colonizan (Reid *et al.*, 2001).

Se ha realizado en mujeres el estudio comparativo sobre profilaxis de vaginitis candidiasis y vaginosis bacteriana, ambas recurrentes, entre grupos que toman yogurt enriquecido con lactobacilos productores de H₂O₂ y yogurt pasteurizado. Después de una semana de estudio el 25% de mujeres en el grupo enriquecido tuvo un episodio de vaginosis bacteriana comparado con un 50% en el grupo con yogurt pasteurizado (p=0.04). Sin embargo, la reducción en el porcentaje de mujeres con cultivos positivos de candida en ambos grupos fue el mismo, lo cual indica que quizás cultivos de yogurt no viable también tengan un efecto anticandida (Shalev *et al.*, 1996).

Hilton *et al.*, 1992 administraron lactobacilos por un período largo y estudiaron la incidencia de la infección vaginal por candida. Un grupo de pacientes consumió lactobacilos productores de H₂O₂ y otro grupo no consumió yogurt por 6 meses y entonces ambos grupos se entrecruzan mutuamente. El número de infecciones vaginales por candida fue de 0.38 por paciente en el grupo de yogurt y 2.54 durante el período de ausencia de yogurt (p=0.001).

Por otra parte, Hillier *et al.*, 1992 encontraron que la incidencia de infección vaginal en mujeres embarazadas estuvo inversamente relacionada a la presencia intravaginal de lactobacilos productores de H₂O₂.

CONCLUSIONES

Existen evidencias científicas en el mundo que indican que la administración de lactobacilos representa una alternativa interesante a las largas terapias antibióticas actualmente prescritas en presencia de trastornos infecciosos repetidos. La presencia de lactobacilos en la vagina está asociada con un reducido riesgo de vaginosis bacteriana e infecciones del tracto urinario debido a la producción de ácido láctico y H₂O₂. La introducción de este probiótico en el mercado enmarca lograr favorecer la salud reproductiva de la mujer y disminuir patologías obstétricas y ginecológicas de importante impacto social y económico.

REFERENCIAS

- Atias A (1994) Parasitología clínica. 3 ed., España: *Publicaciones Técnicas Mediterráneo*, pp. 367-373.
- Balotescu MC & Petrache LM (2004) Adherence of lactobacilli to intestinal mucosa and their antagonistic activity against pathogens. *Roumanian Biotechnol. Lett.* 9: 1737-1749.
- Bruce AW & Reid G (1988) Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. *Can. J. Microbiol.* 34: 339-343.
- Burton JP & Reid G (2002) Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J. Infect. Dis.* 186: 1770-1780.

- Carey JC, Klebanoff MA, Hauth J C, Hillier SL, Thom EA & Ernest JM (2000) Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. *New Eng. J. Med.* 342: 534-540.
- Cibley LJ (1991) Cytolytic vaginosis. *Am. J. Obst. Gynec.* 165: 1245-1249.
- Cullins VE, Dominguez L, Guberski T, Secor RM & Wysocki SJ (1999) Treating vaginitis. *Nurse Practitioner* 24: 46-60.
- Doderlein A (1892) Die scheidensekretunter suchungen. *Zentralblatt Gynakologie* 18: 10-14.
- Ferris DG, Nyirjesy P, Sobel JD, Soper D, Pavletic A & Litaker MS (2002) Over-the counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosis of vulvovaginal candidiasis. *Obst. Gynecol.* 99: 419-425.
- González BE, Gómez M & Jiménez Z (2003) Bacteriocinas de prebióticos. *Rev. Salud Pú. Nutr.* <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
- Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA & Wolner-Hanssen P (1996) Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J. Infec. Dis.* 174: 1058-63.
- Heather SJ (2003) Prevention and treatment of vulvovaginal candidiasis using exogenous *Lactobacillus*. *JOGNN* 32: 287-296.
- Heinemann C, van Hylckama Vlieg JE, Janssen DB, Busscher HJ, van der Mei HC & Reid G (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol. Lett.* 190: 177-180.
- Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ & Eschenbach DA (1992) The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 79: 369-373.
- Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K & Borenstein MT (1993) Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann. Intern. Med.* 116: 353-357
- Juárez MS, Ocaña V, Wiese B & Nader ME (2003) Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 52: 1117-1124.
- Klebanoff S & Coombs W (1991) Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus-type I: ble role in heterosexual transmission. *J. Exp. Med.* 174: 289-292.
- Larsen B (1993) Vaginal flora in health and disease. *Clin. Obst. Gynec.* 36: 107-121.
- Mardh PA (1991) The vaginal ecosystem. *Am. J. Obst. Gynec.* 165: 1163-1168.
- McGroarty J (1993) Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 6: 251-264.
- Ocaña VS & Nader ME (2002) Vaginal lactobacilli: Self- and co-aggregating ability. *British J. Biomed. Sci.* 59: 183-190.
- Pérez H, Brizuela MA, Serrano P & Iglesias I (2000) Evaluación de propiedades fisiológicas de interés tecnológico en cepas de "*Lactobacillus*", Tesis de Diploma: Universidad de la Habana Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), pp. 8-10.
- Rabe LK & Hillier SL (2003) Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3260-3264.
- Redondo V, Cook RL & Sobel JD (1990) Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. of Inf. Dis.* 12: 856-872.
- Reid G, Cook RL & Bruce AW (1987) Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract. *J. Urol.* 138: 330-335.
- Reid G, Bruce AW & Taylor M (1992) Influence of three-day antimicrobial therapy and *Lactobacillus* vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections. *Clin. Ther.* 14: 11-16.
- Reid G, Bruce AW & Taylor M (1995) Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol. Ther.* 23: 32-45.

- Reid G & Bruce A W (2001) Selection of *Lactobacillus* for urogenital probiotic applications. *J. Infect. Dis.* 183: 77-80.
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heininamm C, Owen J & Henning B (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30: 49-52.
- Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beurman D & Poehner R (2003) Oral use of *Lactobacilli* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized placebo controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35: 131-4.
- Rojas L, Sarria C, Sariego I, Goicolea A & Morales E (1998) Trichomonosis en pacientes con patología de cuello uterino. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 45: 177-180.
- Shalev E, Battino S, Weiner E, Colodner R & Keness Y (1996) Ingestion of yogurt containing *Lactobacilli* acidophilus compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch. Fam. Med.* 5: 593-596.
- Strus M, Malinowska M & Heczko PB (2002) In vitro antagonistic effect of *Lactobacillus* on organisms associated with bacterial vaginosis. *J. Reprod. Med.* 47: 41-46.
- Suárez BS, Vasquez JE & Barbes C (1998) Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens", *Infec. Immun.* 66: 1985-1989.
- Velraeds MC, van der Mei HC, Reid G & Busscher HJ (1996) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1958-1963.
- Velraeds MM, van der Mei HC, Reid G & Busscher H.J (1997) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid substrate by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*. *Urology*, 49: 790-794.

Efecto de la Fermentación Postcosecha en la Capacidad Antioxidante de Miel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811

Elizabeth Pérez-Pérez¹, Antonio Rodríguez-Malaver² y Patricia Vit³

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Fac. de Ciencias,

² Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina,

³ Apiterapia y Bioactividad, Depto. de Ciencia de los Alimentos, Fac. de Farmacia y Bioanálisis;

Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. E-mail: vit@ula.ve

Palabras clave: Capacidad antioxidante, miel, fermentación, radicales libres, *Tetragonisca angustula*.

Keywords: Antioxidant capacity, fermentation, honey, free radicals, *Tetragonisca angustula*.

RESUMEN

Luego de su cosecha, las mieles tropicales de abejas sin aguijón producen espuma debido a su elevado tenor de humedad respecto a mieles de *Apis mellifera*. En este trabajo se midió la capacidad antioxidante de miel de *Tetragonisca angustula* recién cosechada (26.2 g agua/100 g miel) y conservada a dos temperaturas, refrigerada a 4°C y ambiente a 30°C, en intervalos de cinco días hasta alcanzar un mes. Se utilizaron controles de pasteurización y miel artificial, también conservados a 4°C y 30°C. Los indicadores antioxidantes fueron el porcentaje de inhibición de la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y del radical hidroxilo (OH^{\bullet}) así como la degradación de benzoato, conocida como actividad antioxidante (AOA). También se monitoreó la concentración de proteínas, azúcares totales y etanol durante un mes. El aumento gradual en el contenido de etanol sólo ocurrió en la miel conservada a 30°C (8.7 a 29.3 mg/kg miel), acompañada de una disminución de azúcares totales (81.5 a 31.7 g/100 g miel), indicando que la miel fermenta. La concentración de proteínas disminuyó ligeramente (207 a 197 mg/100 g de miel), mientras que los indicadores de capacidad antioxidante se incrementaron (anión superóxido, 69.1 a 94.8%; radical hidroxilo, 62.2 a 90.5%; AOA, 0.58 a 0.89 mM), a lo largo del proceso fermentativo. La fermentación aumentó la bioactividad antioxidante de la miel de *T. angustula*. Este hecho podría explicar la reputación de las propiedades medicinales de abejas sin aguijón, conferidas desde los Mayas, porque podría disminuir el deterioro oxidativo de radicales libres en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, generador de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionan complicaciones biológicas degenerativas.

ABSTRACT

After harvest, stingless bee tropical honey produce froth due to the higher water content than *Apis mellifera* honey. In this work, the antioxidant capacity of fresh *Tetragonisca angustula* honey with 26.2 g water/100 g honey was stored at two temperatures, refrigerated at 4°C and environmental at 30°C, was measured every five days up to a month. Artificial and pasteurized honey also kept at 4°C and 30°C were the controls. The antioxidant indicators were the inhibition percentage of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}), and the benzoate degradation known as antioxidant activity (AOA). Concentrations of proteins, total sugars and ethanol were also monitored for one month. A gradual increase of ethanol only occurred in the honey kept at 30°C (8.7 to 29.3 mg/kg), besides a total sugar decrease (81.5 to 31.7 g/100 g honey), indicating honey fermentation. Protein concentration showed a low decrease (207 to 197 mg/100 g honey), while the antioxidant capacity indicators increased (superoxide anion, 69.1 to 94.8%; hydroxyl radical, 62.2 to 90.5%; AOA, 0.58 to 0.89 mM) along with the fermentative process. Fermentation increased the antioxidant bioactivity of *T. angustula* honey. This fact could explain the reputed medicinal properties of stingless bee honey, dating back to the Mayas, by reducing the oxidative damage to lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids generating reactive oxygen species (ROS) causing biological degenerative complications.

INTRODUCCIÓN

La abeja *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 es una abeja sin aguijón. Se conoce con este nombre a un grupo de abejas tropicales y subtropicales ubicadas sistemáticamente en la subfamilia Meliponini y en la misma familia de la conocida *Apis mellifera*, Apini (Silveira *et al.*, 2002). Coloquialmente, *T. angustula* recibe diversos nombres: angelita (Venezuela), doncellita (Guatemala), jataí (Brasil), señorita (Brasil), por mencionar algunos países donde se produce (Vit *et al.*, 2004).

La fermentación se considera inaceptable en los estándares de calidad de miel de *A. mellifera* (Ruoff & Bogdanov, 2004); sin embargo, es un proceso característico en las mieles de abejas sin aguijón, las cuales suelen tener mayores contenidos de humedad y de acidez. Este proceso ocurre en forma espontánea en las botijas donde las abejas almacenan el néctar, pero también se permite luego de la cosecha y antes de su comercialización para mejorar los atributos medicinales de la miel (Vit *et al.*, 2004).

Un amplio espectro de fuentes de radicales libres producidos durante exposiciones diarias a diversos factores exógenos (humo, alcohol, insecticidas, radiación, productos de limpieza, sol, etc.) y endógenos (consumo de frituras, ejercicio extremo, estrés, etc.), es causa de numerosas enfermedades degenerativas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Por un lado, se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en daños hepáticos y renales de consumidores crónicos de etanol (Huerta Bustamante, 2003), ya que el etanol produce estrés oxidativo en las células (Saldaña-Balmori *et al.*, 2003); por otro, bajas concentraciones de etanol se utilizan en la preparación de soluciones hidroalcohólicas para disolver principios activos en los elixires farmacéuticos (Trillo, 1993).

Los antioxidantes son efectivos en bajas concentraciones y ayudan a inactivar los radicales libres; por eso se estudia la capacidad antioxidante de los alimentos y de los medicamentos. Los polifenoles participan en el sistema antioxidante de la miel (Dailey & Imming, 1999; Frankel *et al.*, 1998), reforzado por la vitamina C y la catalasa (Gheldof, 2002).

Conociendo que la miel de abejas sin aguijón es un alimento medicinal utilizado desde los Mayas, se decidió

seleccionar la miel producida por la especie *T. angustula* para estudiar el efecto que produce su fermentación postcosecha en tres indicadores de capacidad antioxidante:

1. Inhibición de la formación de anión superóxido.
 2. Inhibición de la formación del radical hidroxilo.
 3. Degradación del benzoato.
- Para tal fin, se comparó la miel natural con controles de miel pasteurizada (con levaduras inactivadas), y de miel artificial (sin levaduras), tanto a temperatura ambiente (30°C) como a temperatura de refrigeración (4°C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de miel

La miel de *T. angustula* se recolectó de una colmena racional (Fig. 1) en la ciudad de Mérida (N 8° 33.25' W 71°

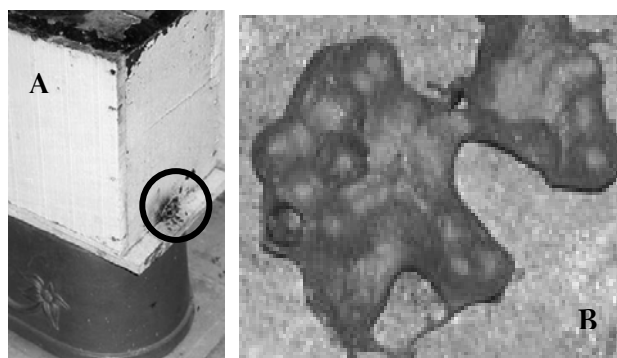


Fig. 1. Piquera (A) y botijas de miel (B) en colmena de *T. angustula* 12.64' por prensado puesto que las botijas de esta especie son muy pequeñas. La miel artificial se utilizó como control y se preparó con 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 g de sacarosa (Taormina *et al.*, 2001).

Fermentación controlada

Para evaluar el efecto de la fermentación en la capacidad antioxidante de la miel, se organizaron tres grupos de miel: 1. Sin tratamiento. 2. Pasteurizada. 3. Miel artificial. Las mieles se colocaron en un cuarto de temperatura controlada a 30°C durante 30 días. Cada cinco días se tomaron muestras de cada uno de los tratamientos y se les determinó la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles, concentración de proteínas, contenido de azúcares reductores y concentración de etanol, según los procedimientos explicados abajo.

Composición química de las mieles

El contenido de humedad se midió por refractometría siguiendo las normas de miel de abejas nacionales (Comisión Venezolana de Normas Industriales, 1984) e internacionales (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2001). Las proteínas se determinaron con el método de Lowry *et al.* (1951). La concentración de azúcares se midió con el método de Nelson-Somogyi (1952). El etanol se determinó con un método enzimático, usando la enzima alcohol deshidrogenasa (Pérez Bendito & Valcárcel Cases, 1984).

Evaluación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se evaluó utilizando tres métodos: la formación del radical hidroxilo se midió con el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.* (1987), anión superóxido se midió con el método de Rice-Evans *et al.* (1991) y la degradación del benzoato (AOA) con el método de Koracevic *et al.* (2001).

RESULTADOS

El contenido de humedad de la miel resultó ser 26.2 g agua/100 g miel, el cual es un valor elevado para la miel de abejas. En la Fig. 2 A y B, se presentan las variaciones en el contenido de azúcares totales y de etanol de la miel. Puede apreciarse que el

contenido de azúcares es similar en todas las mieles al inicio del experimento y disminuye paulatinamente en la miel de *T. angustula* sin pasteurizar conservada a 30°C, pero se mantiene en los demás tratamientos. El contenido de etanol de la miel de *T. angustula* es

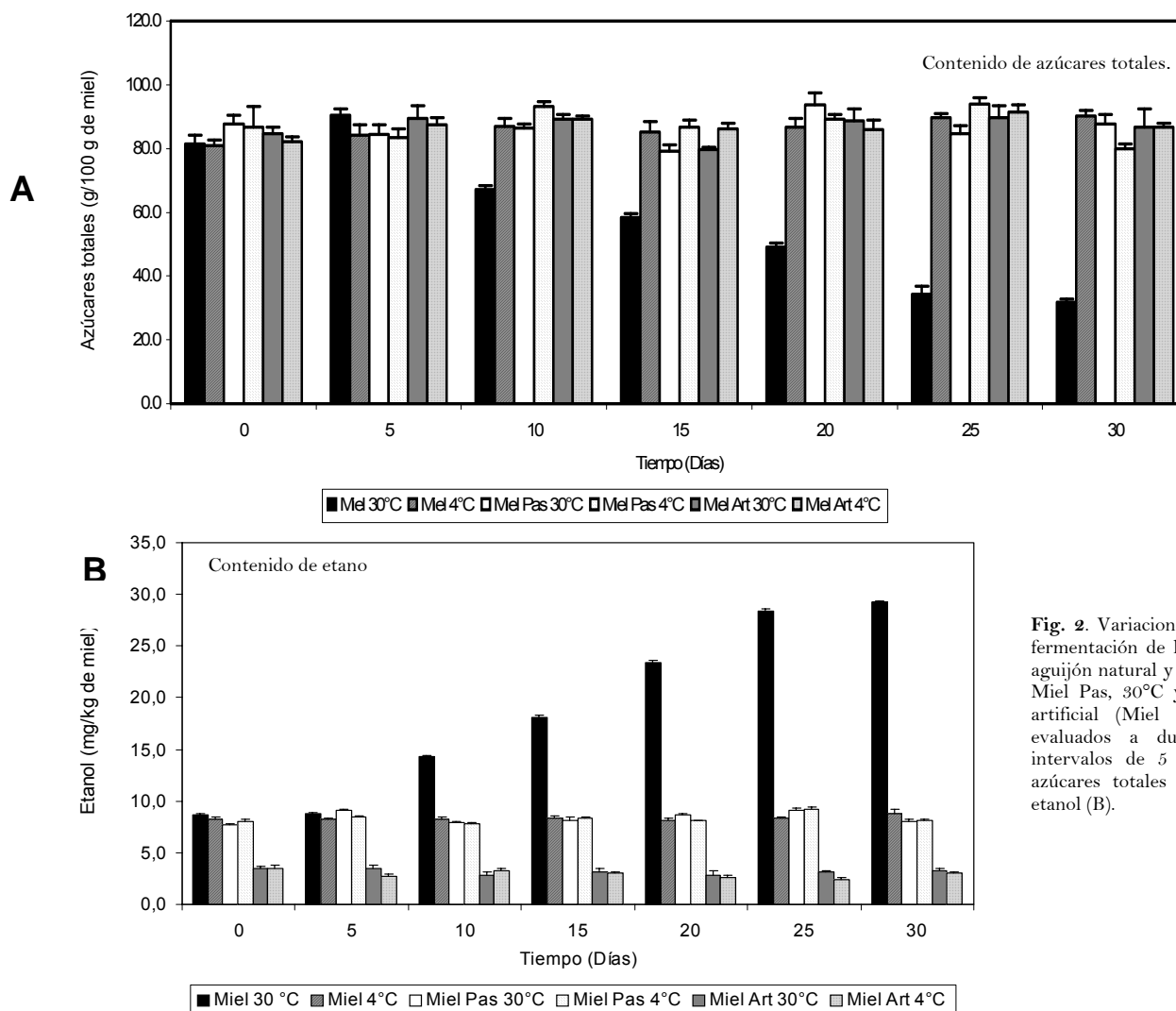


Fig. 2. Variaciones de indicadores de fermentación de la miel de abejas sin aguijón natural y pasteurizada (Miel y Miel Pas, 30°C y 4°C) y de la miel artificial (Miel Art 30°C y 4°C), evaluados a durante un mes en intervalos de 5 días: Contenido de azúcares totales (A) y contenido de etanol (B).

mayor que en la miel artificial y aumenta únicamente en la miel natural de *T. angustula* conservada a 30°C. Puede observarse que la fermentación, evaluada como disminución de azúcares y aumento de etanol, sólo ocurre en la miel no pasteurizada conservada a una temperatura ambiente de 30°C.

En la Fig. 3 se presenta el efecto de la fermentación de la miel de *T. angustula* en tres indicadores de capacidad antioxidante: 1.- Inhibición de la formación del anión superóxido. 2.- Inhibición de la formación del radical hidroxilo. 3.- Degradación del benzoato. Puede observarse que la capacidad antioxidante sólo varía en las mieles fermentadas y no cambia en los tratamientos donde no ocurrió la fermentación (miel a 4°C, mieles pasteurizadas y mieles artificiales). A los 25 días se alcanza un máximo de capacidad antioxidante medida como porcentaje de inhibición de formación de anión superóxido y del radical hidroxilo, el cual se mantiene a los 30 días. La degradación del benzoato, para evaluar actividad antioxidante, también alcanza su máximo a los 25 días, pero presenta una tendencia a disminuir a los 30 días.

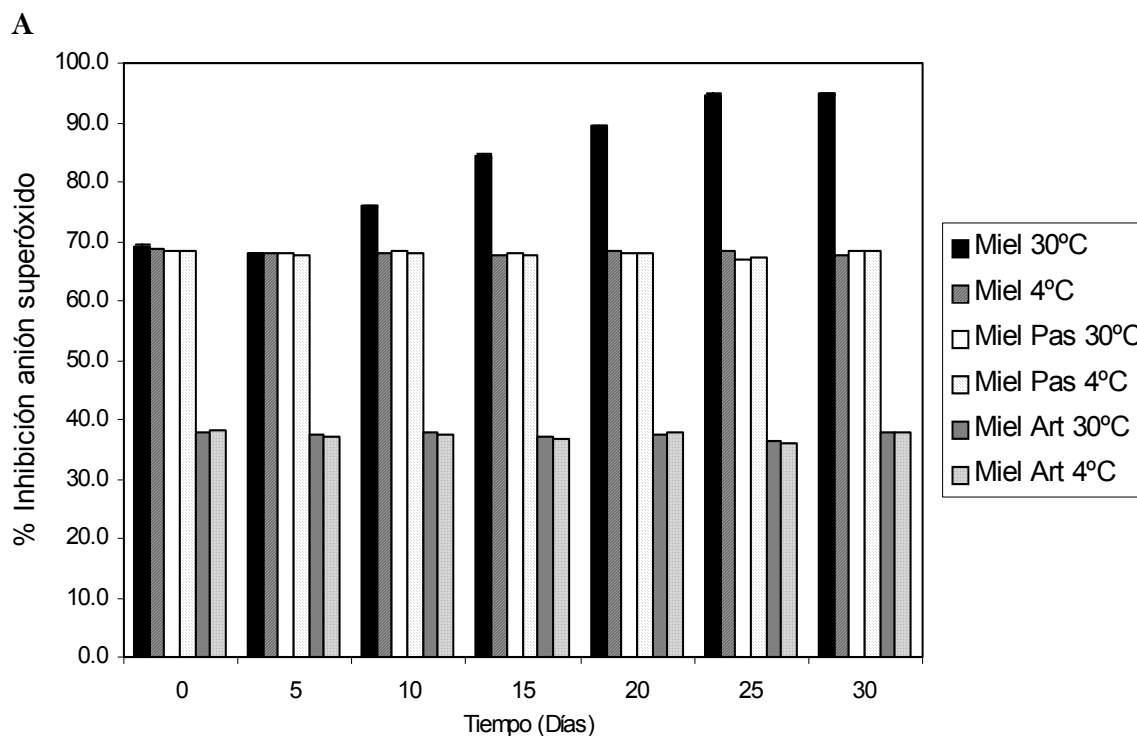
Los resultados de proteínas no presentaron variaciones con el tiempo, por lo que se descartan procesos de proteólisis.

DISCUSIÓN

El elevado contenido de humedad de la miel de *T. angustula*, 26.2 g agua/100 g miel, comparado con el máximo permitido de 20.0 g agua/100 g. miel de *A. mellifera* (Codex Alimentarius Commission, 2001), ocasiona la fermentación espontánea de la miel porque las levaduras se encuentran en un sustrato favorable.

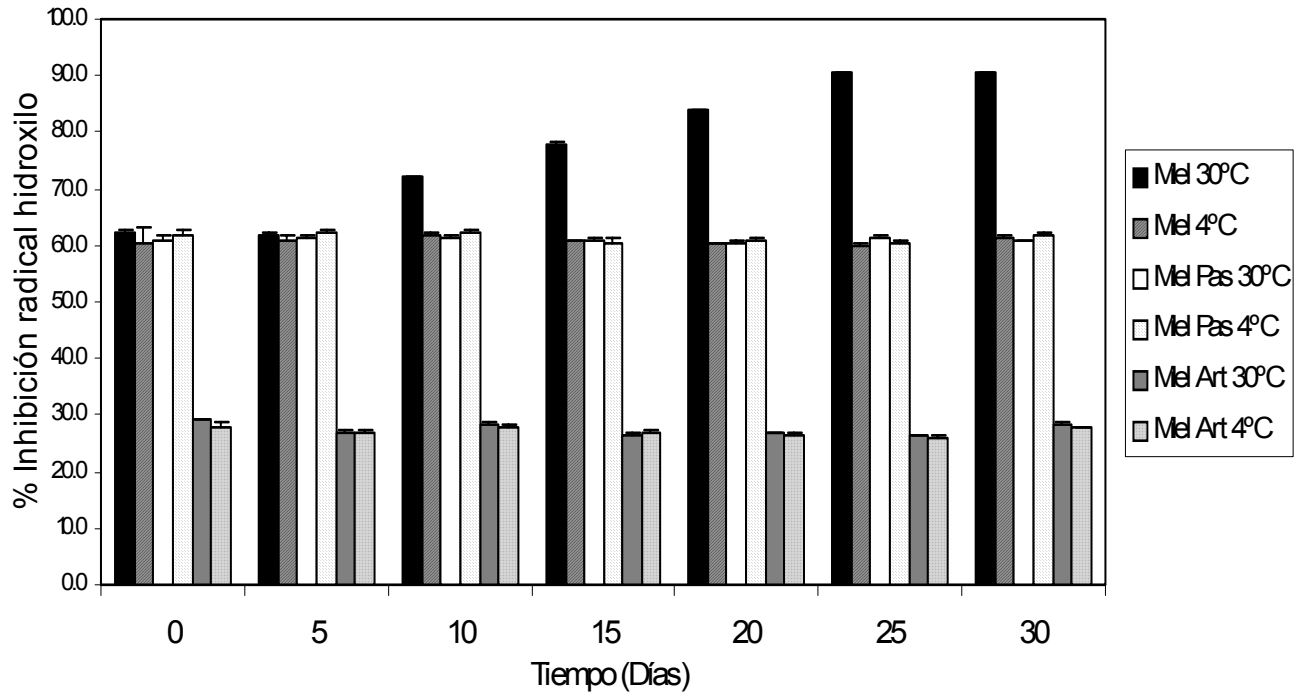
La fermentación de miel de *T. angustula* no ocurrió en mieles pasteurizadas y tampoco en la miel natural pasteurizada a 4°C; por ello se recomienda refrigerar la miel de abejas sin aguijón para conservar los estándares de calidad que descalifican mieles fermentadas. No obstante, la miel de *T. angustula* aumenta su capacidad antioxidante con la fermentación ocurrida en la miel natural conservada a 30°C; lo cual justifica conservar la miel a temperatura ambiente para mejorar su capacidad antioxidante, si se confiere un uso medicinal. Este

Efecto de la fermentación de la miel en la inhibición de la formación del anión superóxido



B

Efecto de la fermentación de la miel en la inhibición de la formación del radical hidroxilo.



Efecto de la fermentación en el valor de AOA.

C

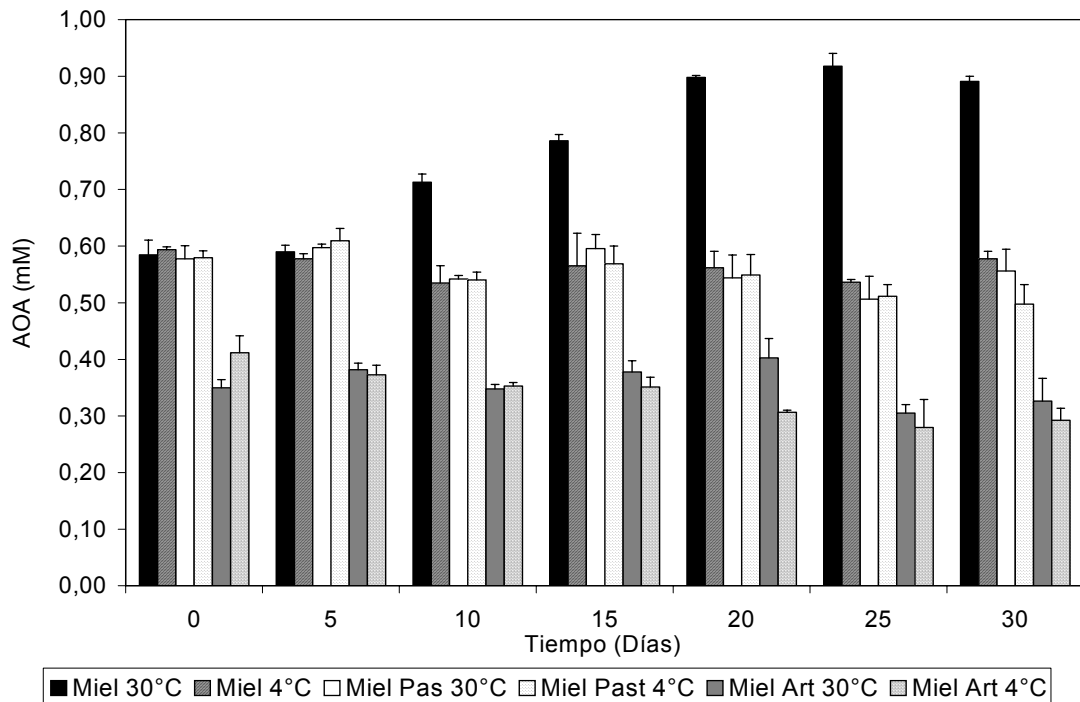


Fig. 3. Efecto de la miel de *Tetragonisca angustula* en la capacidad antioxidante medida de la fermentación de la miel como la formación del radical superóxido (A), la inhibición del radical hidroxilo (B) y la degradación del benzoato (C).

estudio se limitó a 30 días, pero es necesario conocer el comportamiento de anaquel durante un tiempo no menor de 6 meses. Los tratamientos postcosecha combinados (Vit, 2002) podrían permitir la fermentación de la miel fresca hasta aumentar su capacidad antioxidante, junto con el envasado adecuado y la refrigeración para extender su vida útil.

Al observar la Fig. 3, puede apreciarse que la pasteurización no alteró la capacidad antioxidante de la miel natural y que los azúcares de la miel artificial poseen actividad en los sistemas oxidativos estudiados. Podría afirmarse que los azúcares confieren aproximadamente un 50% de la actividad antioxidante de la miel.

En un estudio con miel fresca de *A. mellifera* producida en Galicia (España) se reportan variaciones entre 13.5 y 50.1 mg etanol/kg miel y una excepción de 141.8 mg etanol/kg miel (Huidobro *et al.*, 1978), pero en este estudio no se evaluó capacidad antioxidante. El aumento de capacidad antioxidante causado por el incremento del contenido de etanol en la miel de abejas no había sido reportado previamente. En el presente estudio, el contenido de 8.7 mg/kg miel fresca de *T. agustula* resultó menor que en el estudio de las mieles gallegas.

Desde un punto de vista medicinal, las pequeñas cantidades de etanol presentes en las mieles podrían ser beneficiosas al semejar a una bebida alcohólica suave (Trevithick *et al.*, 1999), en contraposición con su uso como indicador de deterioro de la calidad de la miel consumida como edulcorante natural (Codex alimentarius Commission, 2001; Ruoff & Bogdanov, 2004). En tal sentido, la fermentación postcosecha de la miel de *T. angustula*, considerada hasta ahora como un defecto, puede convertirse en un atributo medicinal ya que el etanol producido mejoró su capacidad antioxidante. Es necesario resaltar que en este trabajo se realizó una fermentación controlada, la cual podría ser reproducible o no en las condiciones de campo, donde las temperaturas ambientales pueden superar los 30°C, lo cual justifica continuar con este estudio.

AGRADECIMIENTO

La identificación entomológica fue gentilmente realizada por el Prof. JMF Camargo, Depto. Biología,

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

REFERENCIAS

- Codex Alimentarius Commission (2001). CODEX STAN 12-1981. *Revised Codex Standard for Honey*. CAC, Rome.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (1984). *Miel de Abejas. Métodos de Ensayo*, COVENIN 2136-84. Fondonorma, Caracas.
- Dailey LA & Imming P (1999) 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 6: 389-398.
- Frankel S, Robinson GE & Berenbaum MR (1998) Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apicult. Res.* 37: 27-31.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1987) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Calendon Press, Oxford, UK.
- Halliwell B, Gutteridge JMC & Aruoma O (1987) The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219.
- Huerta Bustamante PA, Henríquez Huerta PA, Castillo Peñaloza RL, Carrasco Loza RA Orellana M & Rodrigo Salinas MA (2003) Estudio comparativo del estudio crónico de vino tinto sobre la expresión y la actividad del citocromo P₄₅₀ en hígado y riñón de rata. *Med UNAB* 6: 4-9.
- Huidobro JF, Rea ME, Branquinho de Andrade PC, Sánchez MP, Sancho MT, Muniategui S & Simal-Lozano J (1994) Enzymatic determination of primary normal alcohols as apparent ethanol content in honey. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1975-1978.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S & Cosic V (2001) Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Pathol.* 54: 356-361.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Pérez Bendito MD & Valcárcel Cases M (1984) *Métodos Cinéticos de Análisis*, Publicaciones del Monte de Piedad, Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Rice-Evans C, Diplock A & Symons M (1991) Techniques in Free Radicals Research. In Burdon RH & Van Knippenberg PH (eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular*

- Biology*, Vol. 22. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Holland.
- Ruof K & Bogdanov S (2004) Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta* 38: 317-327.
- Saldaña-Balmori Y, Ramírez-González & Delgadillo-Gutiérrez H (2003) Acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos sobre la lipoperoxidación hepática inducida por etanol. *Rev. Cubana Inv. Bioméd.* 22: 16-24.
- Silveira FA, Melo GAR & Almeida EAB (2002) *Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação*, Fundação Araucária, Belo Horizonte.
- Somogyi N (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Taormina PJ, Niemira BA & Beuchat LR (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 217-225.
- Trevithick CC, Vinson JA, Caulfield J, Rahman F, Derksen T, Bocksch L, Hong S, Stefan A, Teufel K, Wu N, Hirst M & Trevithick JR (1999) Is ethanol an important antioxidant in alcoholic beverages associated with risk reduction of cataract and atherosclerosis? *Redox Report* 4: 89-93.
- Trillo F (1993) *Tratado de Farmacia Galénica*, Ediciones Luzan, Madrid.
- Vit P (2002) *Apuntes de Tecnología de Alimentos*. Ed. Fac. Farmacia ULA, Mérida, Venezuela.
- Vit P, Medina M & Enriquez ME (2005) Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World* 85: 2-5.

Transglutaminasas: de Importante Papel Fisiológico en los Seres Vivos al Desarrollo Novedoso de Tecnología de Alimentos

Hugo Palafox Carlos y Fernando García Carreño

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo 195. La Paz. BCS. México. Tel & Fax +52 612 1238401. E-mail: hpalafox@cibnor.mxT y fgarcia@cibnor.mx

Palabras clave: Trasglutaminasa (TGasa), funcionalidad de proteínas, entrecruzados covalentes, agentes gelificantes.

RESUMEN

La transglutaminasa (TGasa) ha sido estudiada intensamente en las últimas décadas, ya que esta se encuentra en una gran variedad de tejidos donde participa en diversos mecanismos filológicos de importancia. La TGasa (EC 2.3.2.13) esta relacionada principalmente en la formación de coágulos sanguíneos, reparación de tejidos, enfermedades neurológicas, y recientemente se ha identificado involucrada en fotosíntesis. Además, en los últimos años se ha generado un enorme interés tanto para científicos y tecnólogos en alimentos debido a la habilidad única de la transglutaminasa (TGasa) de modificar la funcionalidad de las proteínas por entrecruzamientos covalentes. Actualmente la TGasa es una herramienta de utilidad en la aplicación de tecnologías innovadoras para la producción de alimentos a base de proteína (animal o vegetal). Entre las tecnologías y aplicaciones principales se encuentran su uso como agente gelificante de alta

estabilidad, unión en frío, gelificación sin cocción, texturizante y espesante.

Key words: Transglutaminase (TGase), protein functionality, covalent cross-linking, gelling additive.

ABSTRACT

The TGase has been studied intensely in the last decades because its relation to important physiological mechanisms in a great variety of tissues. The unique ability of transglutaminase (TGase) to modify protein functionality by covalent cross-linking has generated enormous interest to food scientists and technologist. TGase (EC 2.3.2.13) catalyses the post-translational modification of proteins by transamidation of available glutamine residues by the formation of covalent cross-links between glutamine and lysine residues in proteins. The TGase is a useful tool for innovative technology applications to produce innovative dairy products. The main technological applications are as a gelling additive with high stability, cold binding, gelling without heating, etc.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS TRANSGLUTAMINASAS (TGasas)

La mayoría de las enzimas utilizadas en los procesos de la industria alimentaria, como lo son amilasas, proteasas y lipasas, contribuyen principalmente a la ruptura de los componentes alimenticios. La habilidad única de las transglutaminasas (TGasas) de modificar la funcionalidad de las proteínas debido a entrecruzados covalentes ha generado un enorme interés. (Kamath *et al.*, 1992; Haard and Simpson, 2000; Tang *et al.*, 2005). Las TGasas son tranferasas, las cuales tienen el nombre sistemático de proteína-glutamina γ -glutamyltransferasa

(EC 2.3.2.13). Esta enzima cataliza la reacción de transferencia entre los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina en proteínas, péptidos y en varias aminos primarias. Cuando un grupo ϵ -amino de lisina actúa como receptor de grupos acil, resulta en una polimerización y un entrecruzado molecular de las proteínas vía formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina. Esto ocurre a través del intercambio de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina por amonio en el grupo carboxiamida del residuo de la glutamina en la molécula de proteína (s) (Fig. 1). En la ausencia de aminos primarias, el agua puede tomar el papel del aceptor de grupos acil, resultando en la desaminación de los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina para

formar ácido glutámico. Los aminoácidos conservados que forman el sitio catalítico de la TGasa son la Cys, His y Asp (Blaskó *et al.*, 2004).

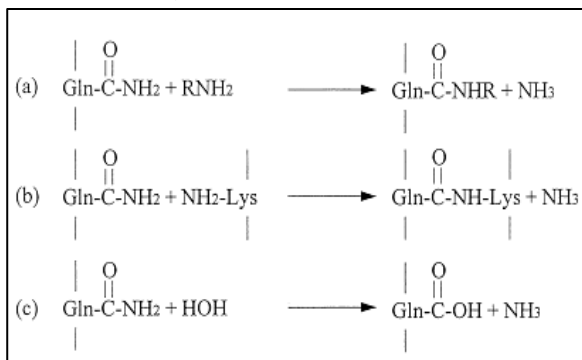


Fig. 1.- Reacción catalizada por las transglutaminasas (TGasas): (a), reacción de acyl-transferencia; (b), reacción de entrecruzado entre los residuos de Gln y Lys de proteínas o péptidos; (c) deaminación. La presencia de Ca²⁺ es un prerrequisito para la reacción en la mayoría de TGasas. (Motoki & Seguro, 1998)

La formación de enlaces covalentes entre proteínas es la base de la habilidad de las TGasas para modificar las propiedades funcionales de las proteínas de alimentos (Motoki & Seguro 1998; Dvorcakova *et al.*, 2002). Por otra parte, las transglutaminasas ligan extensivamente polímeros insolubles de proteínas. Estos polímeros biológicos son imprescindibles para el organismo para crear barreras y las estructuras estables. Los ejemplos son coágulos de sangre (factor de coagulación XIII) así como piel y pelo. La reacción catalítica es irreversible. Se cree que las TGasas están relacionadas con algunas enfermedades. Investigaciones reciente indican que las víctimas de enfermedades neurológicas como lo son Huntington, Parkinson y Alzheimer tienen niveles inusualmente altos de transglutaminasas (Dvorcakova *et al.*, 2002). Actualmente la TGasa para uso industrial es producida por el microorganismo *Streptovorticillium morbarraense* en cantidades comerciales y es utilizada en una variedad de procesos, incluyendo la producción de productos carnicos y pesqueros procesados. Puede ser utilizado como agente adhesivo para mejorar la textura de novedosos alimentos abundantes en proteínas, como el tipo surimi o jamón (Oddur, 1997; Motoki & Seguro, 1998), los cuales abordaremos mas adelante .

FUNCIÓN

Las TGasas forman un gran familia de enzimas intracelulares y extracelulares que catalizan modificaciones proteicas y dicha catálisis es dependiente de

Ca²⁺ (Esposito & Caputo, 2005). Las TGasas se distribuyen extensamente en la mayoría de los tejidos animales, vegetales y fluidos corporales (Tabla 1) y están implicadas en varios fenómenos biológicos, tales como coagulación de la sangre, sanación de heridas, queratinización epidérmica, y rigidez de la membrana de los eritrocitos (Aeschlimann, 1994). Las TGasas según se ha reportado, es la responsable de la regulación del crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Las TGasas

Tabla 1. Algunos ejemplos de la presencia y distribución de TGasas en seres vivos (AJINOMOTO FOODS DEUTSCHLAND, © 1999-2005).

Tipo de Fuente	Especie	Tejido
Mamíferos	Humanos, cerdo, reses, ovejas, conejos	Hígado, corazón, riñón, sangre
Aves	Pollo, paloma	Molleja, sangre
Peces	Atún, macarela, salmón	Músculo, hígado
Plantas	alfalfa, chícharos, brócoli, espinacas	Hojas
Otros	Camarón, ostras, almejas	Músculo

también han sido descubiertas en las plantas (Ickson *et al.*, 1987), pescado (Araki *et al.*, 1993) y en los microorganismos (Ando *et al.*, 1989; Klein, 1992). El rol fisiológico de las TGasas en el plasma de mamíferos superiores (también referido como fibrinolisasa o factor XIII) ha sido bien establecido como el entrecruzado de las fibrinas coagulantes durante la hemostasis. La proenzima del factor XIII es activado por proteasas trombinas, otro componente del plasma que además induce la coagulación del fibrinogeno (Pardekooper, 1998). De manera similar, en los hemocitos del cangrejo japonés *Tachypleus tridentatus*, al detectar endotoxinas de bacterias invasoras, activa, una proenzima edotoxinasensible, provocando una cascada de reacciones que eventualmente activaran a las TGasas pro-coagulantes. Las TGasas activadas subsecuentemente convierten al coagulogeno soluble en forma de gel de coagulina insoluble, el cual actúa como barrera contra los microorganismos invasores (Tokunaga *et al.*, 1993)

En las hojas de plantas, la alta toma de energía de poliaminas en los cloroplastos por la luz, parece estimular la actividad de TGasas. La enzima, de esta

manera parece participar en la fotosíntesis, probablemente modificando ribulosa-bis-fosfato carboxilasa o oxigenasa (Kuehn *et al.*, 1991; Falcone *et al.*, 1993). Según Dvorcakova *et al.* (2002), la presencia de las TGAsas ha sido observada en varias glándulas endocrinas como la glándula pituitaria humana que ha sido investigada por métodos inmunohistoquímicos usando anticuerpos específicos, a su vez en el tracto genital de ratones machos se logró aislar y caracterizar dos tipos de TGAsas. Los roles fisiológicos de TGAsas de muchas otras fuentes, aun permanecen en espera de ser elucidadas (Falcone *et al.*, 1993).

TRANSGLUTAMINASAS Y SU PASO A TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

A principios de los 1980's la posibilidad de modificar las propiedades funcionales de las caseínas de leche y las globulinas de soya fue demostrada utilizando TGasa obtenida de hígado de cerdo (Ikura *et al.*, 1992) y plasma bovino (Kurth *et al.*, 1984). Fue esa misma década cuando Motoki & Seguro (1998), realizaron importantes investigaciones donde utilizaron como sustrato para TGasa (proveniente de hígado de cerdo) soluciones con alta concentración de proteínas de alto peso, actomiosina de res, puerco, pollo y pescado, donde demostraron que todas podían ser gelificadas por esta enzima. Posteriormente ellos evidenciaron que se mejoraba la solubilidad, retención de agua y estabilidad térmica de proteínas para alimentos aplicando TGasa. Por otra parte mezclas de agua, aceite y proteína podrían ser gelificadas utilizando esta enzima. También se observó que los sistemas proteicos generados por la acción de TGAsas son altamente estables en su conformación donde la acción catalítica de proteasas endógenas del sustrato utilizado es baja. Sin embargo la aceptabilidad y uso de los extractos de hígado de cerdo como fuente de TGasa fue desfavorable (Motoki & Seguro, 1998). Por otro lado, estudios sobre surimi derivado de algunas especies de pescado (*Theragra chalcogramma*, *Sardinops melanostictus* y *Micropogon undulatus*), llevaron al descubrimiento de que una TGasa endógena era la responsable de la gelificación espontánea de las pastas de surimi a bajas temperaturas (5-40°C). Este descubrimiento ha promovido investigaciones sobre el contenido de TGAsas endógenas en organismos marinos,

así como la evaluación de TGAsas provenientes de otras fuentes para ser aplicadas en el desarrollo de productos y procesos tecnológicos en alimentos (kamath *et al.*, 1992; Seki *et al.*, 1990; Tsukamasa *et al.*, 1993). De tal manera que todos estos resultados indicaban que las TGasa eran potencialmente útiles por sus nuevas y únicas propiedades funcionales. Es a partir de entonces cuando la producción masiva de TGAsas se volvió la principal meta a alcanzar. Por lo tanto era necesario encontrar una fuente abundante de esta enzima (Motoki & Seguro, 1998). Después de evaluar varias fuentes de TGasa (hígado, músculo, sangre, etc.) de tejidos de animales (Wilson, 1992) y probar con varias cepas de microorganismos con diferentes estrategias metodológicas (Bishop *et al.*, 1990; Takehana *et al.*, 1994; Washizu *et al.*, 1994), pero no fue sino hasta la participación de la compañía farmacéutica Amano (Nagoya, Japón), cuando fueron encontrados microorganismos con importantes síntesis de enzimas tipo TGasa (Ando *et al.*, 1989). Finalmente el microorganismo tipo para la producción de TGasa resultó el *Streptoverticillium mobaraense*, el cual es capaz de producir la enzima por un proceso fermentativo tradicional (Nonaka *et al.*, 1989, Washizu *et al.*, 1994). Desde ese momento la aplicación por excelencia que se le dio a la TGasa, incluso hasta la fecha, es en la formación de geles y reconstrucción de productos carnicos. Sin embargo, las aplicaciones de esta enzima en tecnologías alimentarias son muy variadas y versátiles (Özrenk, 2006; Motoki & Seguro, 1998).

APLICACIONES EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Como ya se ha comentado, la proteína de carne es el principal sustrato utilizado para las TGAsas. Utilizando TGasa se puede producir carne reestructurada uniendo "pedazos" de carne a bajas temperaturas (10°C) durante toda la noche. Tal capacidad de unir pedacera de carne y formar una sola pieza con todas las propiedades organolépticas de un filete original, es llamada unión en frío (*cold binding*), la cual es empleada exitosamente utilizando carne de res, puerco, pollo y pescado (Fig. 2). El *cold binding* es considerado actualmente como las aplicaciones más características para las TGAsas y es de

las más prometedoras para aumentar el valor agregado de productos cárnicos (Oddur, 1997; Ikura *et al.*, 1992 AJINOMOTO FOODS DEUTSCHLAND, © 1999-2005; Motoki & Seguro, 1998).

Se ha desarrollado el sistema que regenera la carne usando simultáneamente TGasa y caseinato. Cuando la materia prima es tratada con caseinato y TGasa, esta se vuelve un sistema viscoso lo cual ayuda a actuar como pegamento que unen a los trozos de carne (Kuraishi, 1996). Incluso carne molida puede ser unida en una sola pieza o filete sin usar cloruro de sodio ni fosfatos, lo cual lo vuelve en un producto “saludable” (Kuraishi *et al.*, 1996; Motoki & Seguro, 1998).

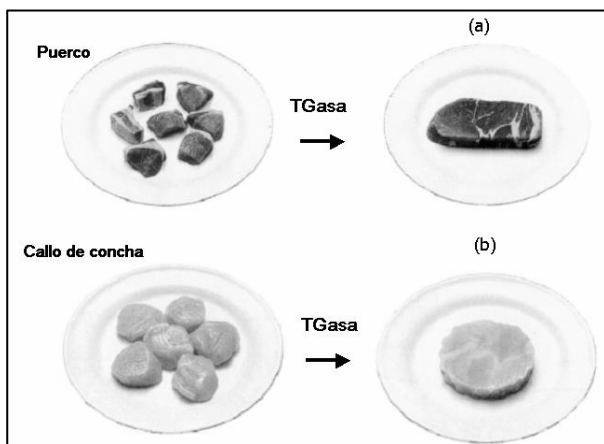


Fig. 2. Aplicación de transglutaminasa. (a), filete reestructurado a partir de carne de puerco. (b) nuevo tipo de marisco a partir de callo de concha (Modificado de Motoki & Seguro, 1998).

Para el caso del pescado procesado, se encontró que la TGasa provocaba una gelificación espontánea en pasta de carne de pescado la cual se llamo “suwari”, donde se producía una pasta rígida de proteína a bajas temperaturas a partir de entrecruzamientos (Seki *et al.*, 1992). La TGasa microbiana se ha aplicado en preparaciones de surimi (de varias especies de pescado) y se ha observado que mejora la fuerza del gel significativamente durante la cocción, incluso a pesar de que el surimi había sido almacenado 2 días en hielo (Ramírez *et al.*, 2000; Wu, 1992; Maruyama *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997).

Proteínas de soya como las globulinas 11S y la 7S son buenos sustratos para las TGasa. El “Tofu”, un producto a partir de soya, es producido por la coagulación de las proteínas de soya por la adición de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Sin

embargo, no es sencillo producir un Tofu de larga vida de anaquel ya que su suavidad y consistencia se ve afectada por procesos de esterilización. Con el uso de TGasa es posible mantener las características organolépticas a pesar de los procesos térmicos (Özrenk, 2006; Tang *et al.*, 2005; Motoki & Seguro, 1998).

En estudios realizados por Zakamoto *et al.* (1996), se demostró que aplicando TGasa en la elaboración de *noodles* y pastas a partir de harina de trigo, es posible prevenir el deterioro de la textura después de la cocción y mejorar la resistencia del producto, incluso cuando la cantidad de harina utilizada fuera en poca.

En productos como caseína de leche, la cual no tiene buena capacidad de formar geles, ni siquiera aplicando calor, fue posible generar sistemas gelificados con buena resistencia térmica después de someterla a una reacción enzimática con TGasas. Un ejemplo de esto puede ser el yogur, que es un tipo de gel de leche formado por la fermentación ácida por iniciadores lácticos. Sin embargo, puede sufrir una separación de fases de proteínas y agua con cambios de temperatura e impacto físico. Esto puede ser solucionado aplicando TGasa, la cual favorece la estabilidad térmica del gel y su capacidad de retención de agua. Por otra parte es posible producir productos a base leche como los helados cremosos y quesos bajos en grasas (Özrenk,

2006). Vale la pena pensar que TGasa es capaz de introducir muchas funciones nuevas a gelatinas y colágenos, en la manera de modificar sus puntos de fusión y la fuerza de geles dependiendo de la cantidad de TGasa. Sistemas proteicos en la elaboración de productos tipo salchicha, pueden ser mejorados con complejos de gelatina/colágeno tratados con TGasa, ya que se ha observado la buena estabilidad térmica que estos aportan al producto sin la aplicación de reactivos químicos (Ikura *et al.*, 1992; Kuraishi *et al.*, 1996). Por otro lado, Watanabe *et al.* (1994) reportaron que el tratamiento con TGasa reduce la alergeneidad en las harinas de trigo. Los tratamientos de con TGasa podrían ser una solución para las personas que sufren de alergias por consumo de ciertos alimentos. Algunas otras aplicaciones y los productos a los cuales estan dirigidos son mencionados en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunos otros ejemplos de los usos y aplicaciones de las TGasas en diferentes productos y procesos de

Fuente	Productos Dirigidos	Efecto Principal	Referencia
Carne	Geles de res Geles de puerco Productos cárnicos	Mejoramiento en retención de agua y parámetros de textura Efecto sobre el color y retención de agua Mejoramiento estructural de textura, apariencia y propiedades de unión	Pietrasik & Li Chan, 2002 Jarmoluk & Pietrasik, 2003 Wilson, 1993
Pescado	Surimi, análogos de mariscos	Mejoramiento en la calidad y capacidad de formación de geles	Tsai <i>et al.</i> , 1996; Jiang <i>et al.</i> , 2000
Trigo	Pastas, productos horneados, pasteles, Croissant	Mejoramiento de propiedades funcionales y mecánicas, mejoramiento en la elevación y calidad sensorial e incremento de vida de anaquel	Tellez <i>et al.</i> , 2002; Gerrard <i>et al.</i> , 2000; Hozova <i>et al.</i> , 2003
Soya	Tofu y productos de cuajados	Mejoramiento de la textura y prolongación de vida de anaquel	Yildirim <i>et al.</i> , 1995, 1996; Kwan & Easa, 2003
Frutas y vegetales	Cereales	Conservación	Takagaki <i>et al.</i> , 1991
Proteína	Entrecruzados proteicos	Mejoramiento en la composición de aminoácidos	Ikura <i>et al.</i> , 1981
Lana	Entrecruzados proteicos	Incremento del hilado y fuerza de la tela	Cortez <i>et al.</i> , 2004
Proteínas de leche	Emulsión Leche tratada Geles	Mejoramiento en estabilidad, floculación fuerte Características de cuajo mejoradas Incremento en fuerza de corte, retención de agua Formación de microestructura más fina.	Færgemand <i>et al.</i> , 1998 Lorenzen, 2000 Nonaka <i>et al.</i> , 1992; Færgemand & Qvist 1997 Imm <i>et al.</i> , 1999

CONCLUSIÓN

El interés por la TGasas inició debido a su relación con importantes roles fisiológicos en los seres vivos. Gracias a las investigaciones realizadas se sabe de la capacidad única de la transglutaminasa de formar entrecruzados covalentes entre los residuos de glutamina y lisina, afectando dramáticamente la funcionalidad de las proteínas. Esto resultó en el desarrollo de tecnologías innovadoras para modificar y manipular la funcionalidad de ingredientes proteicos en la elaboración de alimentos. A su vez, aplicaciones de TGasas están surgiendo a la orden del día y la aplicación de la misma pretende ser producción de una gran diversidad de alimentos.

REFERENCIAS

ACTIVA-AJINOMOTO's Transglutaminase. Copyright © 1999-2005 AJINOMOTO FOODS DEUTSCHLAND GMBH. www.ajinomoto.de
Aeschlimann D & Paulsson M (1994). Transglutaminase: protein cross-linking enzyme in tissues and body fluids. *Thromb. Haemost.* 71: 402-415.

Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M & Nihon nōgei K (1989) Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2613-2617.
Araki H & Seki N (1993) Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish cctomyosin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59: 711-716.
Blaskó B, Mádi A, Fésüs I (2004) Structural elements responsible for transglutaminase activity of protein disulphide isomerases and thioredoxins. *J. Biol. Reg. Homeos. Ag.* 18 (1):1-8.
Bishop PD, Teller DC, Smith RA, Lasser GW, Gilbert T & Seale RL (1990) Expression, purification, and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 29: 1861-1869.
Cortez J, Bonner PLR & Griffin M (2004) Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme Microb. Tech.* 34: 64-72.

- Dvorcakova M, Maecejoval D, Pallet V, Higuieret P, Vasson MP, Rock E, Brtko J. (2002) Transglutaminases and endocrine system. *Endocrine Reg.* 36: 31-36.
- Esposito C & Caputo I (2005) Mammalian transglutaminases: Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J.* 272: 615-631.
- Færgemand M, Otte J & Qvist KB (1998) Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *Int. Dairy J.* 8: 715-723.
- Færgemand M & Qvist KB (1997) Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloid* 11: 287-292.
- Falcone P, Serafini-fracassini D & Del Duca S (1993) Comparative studies of transglutaminases activity and substrates in different organs of *Heliantus tuberosus*. *J. Plant Physiol.* 142: 265-273.
- Gerrard JA, Newberry MP, Ross M, Wilson AJ, Fayle SE & Kavale S (2000) Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.* 65: 312-314.
- Hozova B, Kukurova I & Dodok L (2003) Application of transglutaminase and fermyzyme for sensory quality improvement of pastry. *Nahrung/Food* 47: 171-175.
- Icekson I & Apelbaum A (1987) Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* 84: 972-974.
- Ikura, K., Sasaki, R. & Motoki, M. (1992) Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. *Comments Agric. & Food Chem.* 2: 389-407.
- Ikura K, Yoshikawa M, Sasaki R & Chiba H (1981) Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2587-2592.
- Imm JY, Lian P & Lee CM (1999) Gelation and waterholding capacity of transglutaminase-treated skim milk. IFT Annual Meeting 79A-12. Rhode Island: Food Science and Nutrition, University of Rhode Island.
- Haard Norman F. and Simpson K. *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, Inc. Transglutaminases in seafood processing. Isaac N. A. Ashie & Tyre C. Lanier (2000); Part II. Chapter 6. 147- 167.
- Jarmoluk A & Pietrasik Z (2003) Response surface methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and *k*-carragenan on pork batter gel properties. *J. Food Eng.* 60: 327-335.
- Jiang ST, Hsieh F, Ho ML & Chung YC (2000) Combination effects of microbial transglutaminase, reducing agent, and protease inhibitor on the quality of hairtail surimi. *J. Food Sci.* 65: 241-245.
- Kamath G, Lanier T, Foegeding E & Hamann DD (1992) Nondisulfide covalent crosslinking of myosin heavy chain in setting of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. *J. Food Biochem.* 16:151-172.
- Klein JD, Guzman E & Kuehn GD (1992) Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J. Bacteriol.* 174: 2599-2605.
- Kuehn G, Sotelo M, Morales T, Carver Bruce MR, Guzman E & Margosiak SA (1991) Purification and properties of transglutaminases from *Medicago sativa* L (alfalfa). *FASEB J* 5:A1510.
- Kuraishi C, Sakamoto J & Soeda T (1996) The usefulness of transglutaminase for food processing. biotechnology for improved foods and flavors (ACS Symposium Series 637), American Chemical Society, pp. 29-38.
- Kurth L & Rogers PJ (1984) Transglutaminase catalyzed crosslinking of myosin to soya protein, casein and gluten. *J. Food Sci.* 49: 573-576.
- Kwan SW & Easa AM (2003) Comparing physical properties of retort-resistant glucono- δ -lactone tofu treated with commercial transglutaminase enzyme or low levels of glucose. *LWT/ Food Sci. Tech.* 36: 643-647.
- Lee HG, Lanier TC, Hamann DD & Knopp JA (1997) Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62: 20-24.
- Lorenzen PC (2000) Renneting properties of transglutaminasetreated milk. *Milchwissenschaft* 55: 433-437.
- Maruyama N, Nozawa H, Kimura I, Satake M & Seki N (1995) Transglutaminase-induced polymerization of a mixture of different fish myosin. *Fish Sci* 61: 495-500.
- Motoki M & Seguro K (1998) Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci.Tech.* 9: 204-210.
- Nonaka M, & H & Motoki . (1989) Polymerization of several proteins by Ca²⁺- independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2619-2623.
- Nonaka M, Sakamoto H, Toiguchi S, Kawajiri H, Soeda T & Motoki M (1992) Sodium caseinate and skim milk gels

- formed by incubation with microbial transglutaminase. *J. Food Sci.* 57: 1214–1218.
- Oddur V (1997) The state of enzyme biotechnology in the fish processing industry. *Trends Food Sci. Tech.* 8: 266–270.
- Özrenk E (2006) The use of transglutaminase in dairy products. *Int. J. Dairy Tech.* 59: 1–7
- Pardekooper Ernst JC (1998) Composite meat product and method for the manufacture thereof. *U.S. patent* 4,741,906.
- Pietrasik Z & Li-Chan ECY (2002) Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, k-carragenan and microbial transglutaminase addition. *Food Res. Int.* 35: 91–99.
- Ramírez JA, Santos IA, Morales OG, Morrissey MT & Vázquez M (2000) Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3: 21–28.
- Sakamoto H, Yamazaki, Kaga C, Yamamoto Y, Ito R & Kurosawa Y (1996) Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during chinese noodle processing. *J. Japanese Soc. Food Sci. Tech.* 43: 598–602.
- Seki N, Uno H, Lee NH, kimura I, Toyoda K, Fujita T & Arai K (1992) Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakk* 56:125–132.
- Takehana S, Washizu K, Koikeda S, Takeuchi K, Matsui H, Motoki M & Takagi H (1994) Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverlicillium* and Its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 88–92.
- Takagaki Y, Narakawa K & Uchio R (1991) Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. *Japan Kokai Tokkyo Koho JP* 03272639.
- Tang CH, Wu H, Yu HP, Li l, Chen Z & Yang X-Q (2005) Coagulation and gelation of soy protein isolates induced by microbial transglutaminase. *J. Food Biochem.* 30: 35–55.
- Tellez- LS, Uresti RM, Ramirez JA & Vazquez M (2002) Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *J. Sci. Food Agric.* 82: 953–959.
- Tokunaga F, Yamada M, Miyata T, Ding YL, Hiranaga M & others (1993) Limulus hemocyte trasglutaminase. Its purification and characterization, and identification of the intracellular substrates. *J. Biol. Biochem.* 268: 252–561.
- Tsai GJ, Lin SM & Jiang ST (1996) Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. *J. Food Sci.* 61: 1234–1238.
- Tsukamasa Y, Sato K, Shimizu Y, Imain C, Sugiyama M, Minegishi Y, & Kawabata M (1993) ϵ -(γ -glutamyl) lisien crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.* 58:785–787.
- Washizu K, Koikeda S, Hirose S, Matsuura A, Takagi M (1994) Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovercillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 82–87.
- Watanabe M, Suzuki T, Ikezawa Z & Arai S (1994) Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hyperallergenic flour. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2725–2731.
- Wilson SA (1992) Modifying meat proteins via enzymatic crosslinking. Proceedings of the 27th Meat Industry Research Conference, Hamilton, Sep. 11, 92' in Meal Industry Research Institutes of New Zealand, Mirinz, pp. 247–277.
- Wilson SA (1993) Cross-linking of meat proteins for restructured products. *Food Technol.* 23: 36–38.
- Wu MC (1992) Manufactured of surimi-based products. In TC Lanier, & C M Lee, eds. *Surimi Technology*. NY, Marcel Dekker, pp 245–272.

Evaluación de una Vacuna de DNA contra la Infección del Virus de la Parotiditis Humana (MuV).

Emma del Carmen Herrera Martínez y Blanca Lilia Barrón.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Carpio y Plan de Ayala S/N, Casco de Santo Tomás, México D.F. 11340, México.

E mail.: blue_emma79@hotmail.com; blbr49@yahoo.com

Palabras clave: vacuna de DNA, parotiditis, HN

Keywords: DNA vaccine, mumps, HN

RESUMEN

La parotiditis o “paperas” es un síndrome causado por el virus de la parotiditis humana (MuV), este virus pertenece al género *Rubulavirus* familia Paramixoviridae. Es un virus envuelto que mide de 100 a 600 nm, su material genético es RNA de cadena sencilla que codifica para siete proteínas virales. La proteína HN es el principal determinante antigénico del virus y además es la responsable de reconocer al receptor celular (ácido sialico) y de prevenir la autoagregación de la progenie viral. Hasta el momento se reconoce un solo serotipo de MuV, sin embargo, se han encontrado al menos diez genotipos en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína viral SH. En los últimos años se ha presentado un aumento en el número de casos de parotiditis, principalmente por la falla en la aplicación de los esquemas completos de inmunización y cocirculación de diferentes genotipos en poblaciones vacunadas y no vacunadas. Además, se han asociado algunos casos de meningitis y encefalitis con los virus de las cepas vacunales. Ante esta situación se buscan nuevas opciones de vacunación, como pueden ser las vacunas de DNA. El presente proyecto plantea desarrollar una vacuna de DNA que contenga el gen de la proteína HN, la cual es indispensable para la infección viral. La secuencia que se eligió del gen HN para el desarrollo de esta vacuna proviene de una zona muy conservada entre los distintos genotipos de MuV. Esta construcción transfectada en células Vero expresó una proteína que fue reconocida por un suero hiperinmune anti-paperas, la cual mostró también actividad de hemaglutinina y de neuraminidasa. Bajo estas consideraciones, actualmente estamos evaluando la capacidad inmunogénica de esta vacuna de DNA, utilizando el modelo de infección de paperas en hamster.

ABSTRACT

Mumps is an illness caused by the mumps virus (MuV), which belongs to the *Rubulavirus* genus, Paramixoviridae family. It measures 100 to 600 nm and contains a single stranded negative RNA, which codifies seven viral proteins. The HN protein is the main antigenic determinant and also responsible of cellular binding protein recognition (sialic acid) and prevention of viral progeny aggregation. Nowadays, only one serotype has been recognized, nevertheless it has been classified in ten genotypes based on amino acids sequence from the SH viral protein. In the last years there has been an increase in the number of mumps cases, mainly due to incomplete vaccine schedule application and probably to cocirculation of different genotypes in vaccinated and unvaccinated population. In addition, some cases of meningitis and encephalitis are related to the viral vaccine strains. In order to solve these problems it is necessary to look for new mumps vaccine. The aim of this project is to develop a DNA vaccine based on expression of the mumps HN gene, which is necessary for a successful viral infection. The HN gene sequence was analyzed and a highly conserved region among different genotypes of MuV was chosen and amplified. The transfected construction in Vero cells expressed a protein that was recognized by a hyperimmune anti-mumps serum. In addition it showed haemagglutinin and neuraminidase activities. Due to these results, nowadays we are assessing the immunogenic properties of this DNA vaccine, by using a hamster model for mumps viral infection.

INTRODUCCIÓN

En el año 460 AC Hipócrates en su libro “Sobre las epidemias ” describió a la parotiditis como “la intumescencia pre-auricular unilateral o bilateral no supurativa del cuello, que se presenta en niños y jóvenes que concurren al gimnasio” (Laval, 2005). Actualmente se define a la parotiditis o “paperas” como la inflamación de las glándulas salivales que se encuentran en la parte inferior del oído; éstas presentan una consistencia blanda, están agrandadas y tienen un color marrón rojizo; microscópicamente el intersticio glandular está edematoso con infiltración de histiocitos, linfocitos y células plasmáticas (Robins, 1998). La parotiditis puede causar varias complicaciones entre ellas: sordera, pancreatitis, orquitis, ooforitis y miocarditis (*Wkly epidemiol report*, 2005). En el sistema nervioso central (SNC) las complicaciones más importantes son la encefalitis y la meningitis viral (www.who.int/el) y afortunadamente la mayoría de estos casos se resuelven sin secuela.

La naturaleza contagiosa de la enfermedad se describió en el siglo XVIII por Langhi y Mangor y fue hasta 1945 que Habel aisló el virus que produce dicha enfermedad (Laval, 2005). El virus de la parotiditis humana (MuV) pertenece a la familia Paramyxoviridae género *Rubulavirus*. Es un virus envuelto que mide de 100 a 600 nm, su material genético es una hebra simple de RNA con sentido negativo que contiene siete genes en el siguiente orden, *N-P-M-F-SH-HN-L*, los cuales codifican para las proteínas virales de nucleocápside, fosfoproteína, matriz, fusión, SH, hemaglutinina-neuraminidasa y la subunidad mayor de la polimerasa, respectivamente (Carbone *et al.*, 2001; Robins, 1998)

La proteína HN es el determinante antigénico más importante del virus y se le han asignado tres funciones principales: a) Hemaglutinina (HA), para el reconocimiento del receptor (ácido siálico) que se encuentra en la membrana celular, b) Neuraminidasa (NA), para la remoción del ácido siálico de la progenie viral para prevenir la autoaglutinación y c) participación activa en la fusión del virus a la célula (Crennell *et al.*, 2000). Sin esta proteína no existiría la unión del virus a la célula y por lo tanto no se llevaría a cabo la infección viral. Además de los dominios de HA y NA, posee un

dominio transmembranal con el cual se ancla a la membrana viral.

El virus se disemina a través de las gotitas de saliva de las personas infectadas, se replica en la nasofaringe y presenta un periodo de incubación de 18 a 21 días que puede extenderse hasta 35 días (<http://gsbs.utmd.edu/microbook>). Durante este tiempo el virus se multiplica en las vías respiratorias altas, se disemina a los nódulos linfáticos cercanos y provoca una viremia (Carbone *et al.*, 2001), que afecta a tejidos glandulares, nerviosos y diversos órganos (<http://gsbs.utmd.edu/microbook>). Después de este periodo de incubación se presenta la etapa aguda de la infección, donde aparecen los síntomas y signos característicos del síndrome de parotiditis. El único hospedero que se le conoce al MuV es el hombre, se calcula que en poblaciones no vacunadas existen brotes de esta enfermedad cada 5 a 10 años (Carbone *et al.*, 2001; John, 2004; Reyes *et al.*, 2002), infecta preferentemente a los varones ya que estos representan el 63.5% del total de los casos (Kanra *et al.*, 2004)

EL MuV es un virus de distribución mundial (Carbone *et al.*, 2001) y hasta la fecha se considera que hay un solo serotipo, pero con base en la secuencia de aminoácidos de las proteínas SH y HN, se ha clasificado en diversos genotipos. A estos genotipos se les ha designado con letras de la A a la L, basándose en la posición de los aminoácidos 28, 29 y 30 de la proteína SH (Jin *et al.*, 1999; Love *et al.*, 1985; Palacios *et al.*, 2005) y de la A a la D con base en diferentes combinaciones de aminoácidos en la proteína HN (Teclé *et al.*, 2002; Yates *et al.*, 1996). La coexistencia de los diversos genotipos de MuV es un fenómeno bien documentado en muchos países, por ejemplo en Dinamarca se han reportado los genotipos D, H, G, E, C, F, B, I, A y J (Teclé *et al.*, 2001), en Japón los subtipos B, D, G, J, K y L (Inou *et al.*, 2004) y en Inglaterra los genotipos B, C, D, F, G, H, J y K (Savage *et al.*, 2005).

El tratamiento que se sigue para la infección por este virus es sintomático; es decir, solo se tratan los síntomas de la enfermedad; es por ello, que la mejor opción para evitar esta infección es la vacunación de la población para así detener la diseminación del virus (www.dgepi.salud.gob.mx).

La vacunación en contra del MuV se ha practicado desde 1970 utilizando diversas cepas virales. En el año 2000 por ejemplo, 106 países reportaron el uso de vacunas contra este virus. Sin embargo, en algunas regiones solo unos cuantos países poseen un esquema de vacunación formal. Por ejemplo en África, solo Egipto tiene este tipo de esquemas; mientras que en Asia, solo Singapur y Tailandia (www.who.int/el). Países como Polonia en donde en el 2002 informaron de 39,978 casos de parotiditis (Janaszek-Seydlitz *et al.*, 2005) y la India con 301 casos de parotiditis entre 1999 a 2003 en el distrito de Calcuta, han expresado la necesidad de vacunar a su población (Geeta & Kumar, 2004).

Algunas de las cepas vacunales que se han desarrollado hasta el momento se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, no todas las cepas son adecuadas para su uso como vacunas, por ejemplo la cepa vacunal Rubini posee un rango de seroconversión del 6.3% por lo que la OMS no la recomienda para los esquemas nacionales de inmunización (Wkl epidemiol report, 2001).

Tabla 1. Cepas vacunales contra el virus de la parotiditis humana.

Cepa	Año de introducción	País de origen	Área de distribución	Rango de seroconversión
Jeryl Lynn	1977	EU	Mundial	63 – 91 % ¹
Leningrado-3	1980	USSR	Rusia	89 – 98 % ²
L-Zagreb	1988	Croacia	Mundial	> 90 % ²
Urabe AM9	1979	Japón	Mundial	84 – 97 % ¹

¹(Bonnet *et al.*, 2006) ² (Wkl epidemiol report, 2001)

El empleo de estas cepas vacunales se ha asociado con la presentación de brotes de meningitis y encefalitis. Por ejemplo, en la aplicación de la cepa L-Zagreb se presentaron 49 casos de meningitis por 100,000 dosis aplicadas; con la cepa Urabe 7 casos de meningitis por 100,000 dosis; mientras que la Jeryl-Lynn presenta 0.1 casos/100,000 dosis aplicadas (Bonnet *et al.*, 2006). Si bien con la aplicación de la cepa vacunal Jeryl-Lynn se han presentado el menor número de casos de meningitis (Schlegel *et al.*, 1999), su inconveniente es su costo, ya que hasta el año 2004 el precio de la vacuna con dicha cepa era de 2.50 dólares por dosis (Bonnet *et al.*, 2006;

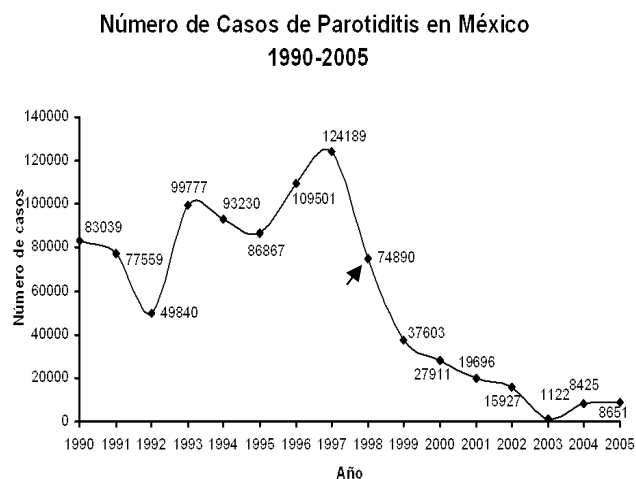
Fullerton & Reef, 2002), lo que representa un egreso alto para los países en vías de desarrollo.

A pesar de la aplicación de estas vacunas aun se presentan casos de parotiditis en todo el mundo y de hecho ha habido un aumento en los últimos años. La OMS reportó en el año 2002 un total de 477,079 casos de parotiditis a nivel mundial; para 2003 un total de 334,063 y para 2004 un total de 654,216 (Wkl epidemiol report, 2005). El aumento en el número de casos de parotiditis está relacionado con deficiencias en la aplicación de los esquemas completos de vacunación. Entre el año 2004 y el 2005 Inglaterra y Wales reportaron un total de 56,390 casos en personas cuyas edades estaban comprendidas entre los 15 y 25 años, las cuales no recibieron el refuerzo de la vacuna contra este virus (MMWR, 2006). Un caso similar se presentó en Escocia en las primeras 24 semanas del 2005 donde se reportaron 1,241 casos en adolescentes. Al igual que en el Reino Unido, estos casos están relacionados con la falta de una segunda dosis de la vacuna (Donaghy *et al.*, 2006).

Por otro lado, debido a la circulación de diferentes genotipos en la población vacunada y a la existencia de brotes asociados a un solo genotipo, se ha sugerido que las vacunas no originan la misma protección contra los diversos genotipos de MuV (Rubin *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 2005; Teclé *et al.*, 2001). En Estados Unidos (EU) se reportó un brote de parotiditis en 10 estados, con un total de 2,597 casos hasta mayo del año 2005. Al realizar la genotipificación de doce de estos virus provenientes de seis estados, se identificó que los virus causantes de estos brotes son del genotipo G (MMWR, 2006), cabe destacar que la vacuna que se utiliza en EU es del genotipo A.

En nuestro país la vacuna triple viral (MMR) que contiene a la vacuna contra la parotiditis se aplica desde el año 1998 (www.salud.gob.mx) y desde entonces los casos de parotiditis han descendido considerablemente (Fig. 1). En esta figura se muestran los números de casos en los últimos quince años; la flecha indica el año de 1998, año en el que se inició la aplicación de la vacuna triple viral (sarampión, rubéola y paperas) dentro del esquema nacional de vacunación (www.dgepi.salud.gob.mx). Sin embargo, en el año 2005

México reportó 8,653 casos de parotiditis en todo el país (Fig. 2) (www.dgepi.salud.gob.mx). Es importante señalar que en el caso de la parotiditis en nuestro país no existe una genotipificación de los virus circulantes, o un análisis del impacto de la vacunación contra este virus.



A pesar de que la parotiditis no es una enfermedad cuyos síntomas y signos sean mortales, es importante resaltar que en términos de horas-hombre, las paperas constituyen una pérdida de ingresos importantes. Tan solo en EU se menciona que por cada dólar gastado en las campañas de vacunación se ahorran 26 dólares asociados a cuidados médicos (Bonnet *et al.*, 2006). Hasta el momento la vacunación sigue siendo la mejor opción ante la infección de MuV y la ONU menciona que la elección de las cepas vacunales dependerá de los estudios costo-beneficio de cada país y se tomando en cuenta la posibilidad de que las cepas vacunales puedan o no ser la causa de casos de meningitis viral (Bonnet *et al.*, 2006).

Debido a las complicaciones vinculadas a la vacunación contra el virus de la parotiditis humana, así como también a la falta de certeza de que una cepa vacunal pueda proteger contra todos los genotipos del MuV que circulan, se buscan nuevas opciones para inmunizar a la población y así erradicar los casos de parotiditis, meningitis y encefalitis asociadas a la infección por este virus. Una de estas opciones podría ser una vacuna no constituida por el virus completo atenuado, sino utilizando la vacunación con un DNA que codifique para las proteínas virales relacionadas con la inducción de la respuesta inmune protectora contra el virus de la parotiditis, ya que se ha mostrado que las

vacunas de DNA inducen tanto la respuesta celular como la respuesta humoral en el organismo, además de ser termoestables y con un costo de producción bajo (Reyes & Pinto, 2002).



Fig. 2. Distribución de casos de parotiditis en México, 2005. Los casos totales reportados en el país fueron 8,653. (www.dgepi.salud.gob.mx)

El uso de estas vacunas representaría una ventaja para los países en vías de desarrollo en donde las condiciones para el mantenimiento de la cadena fría que requieren las vacunas de virus atenuados no siempre es posible.

En el caso particular de la parotiditis, el desarrollo de una vacuna de DNA podría resolver el problema de los casos de meningitis y encefalitis asociados a la vacunación con las cepas que actualmente se utilizan, así como también los generados por la infección con las cepas silvestres, las cuales puede ser de genotipos diferentes a la cepa vacunal empleada.

Ante esta problemática, el presente proyecto busca desarrollar una vacuna de DNA que codifique para la proteína HN del MuV, que es la proteína viral indispensable para el inicio de la infección (reconocimiento del receptor celular) y es el principal blanco contra el que se desarrolla la respuesta inmune protectora. Para ello, se eligió la región del gen de la hemaglutinina que está altamente conservada entre los diferentes genotipos de MuV, este DNA fue introducido en el vector de expresión pcDNA3.1(+). La construcción al ser transfectada en células Vero expresa un péptido que es reconocido por un anticuerpo policlonal anti-paperas y además conserva las propiedades de hemaglutinar glóbulos rojos de cobayo y

de neuraminidasa, lo que significa que el péptido tiene dos de las funciones importantes de la HN viral (reconocimiento de ácido siálico y neuraminidasa).

Basándonos en estas evidencias proponemos que este péptido es capaz de estimular al sistema inmune y por lo tanto inducir la protección contra la infección del virus de la parotiditis humana. Para cumplir con este objetivo se llevará a cabo la estandarización del modelo de infección del MuV en hámster, debido a que se ha demostrado que en muchos aspectos la patogénesis de la infección del MuV en el modelo de hámster neonato es parecida a lo que se presenta en infantes (Wolinsky *et al.*, 1976). En este modelo se probarán diversos esquemas de inmunización para así evaluar la eficacia de la vacuna frente al reto con el MuV.

REFERENCIAS

- Bonnet MC, Dutta A, Weinberger C & Plotkin SA (2006) Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine*, 24: 7037-7045.
- Carbone K & Wolinsky S. (2001) Mumps virus. In Knipe D & Howley P (eds), *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott- Williams & Wilkins, pp. 1381-1400.
- Crennell S, Garman E, Laver G, Vimr E & Taylor G (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* 7: 1068-1074.
- Donaghy M, Cameron JC & Friederichs V (2006) Increasing incidence of mumps in Scotland: options for reducing transmission. *J. Clin. Virol.* 35: 121-129.
- Fullerton KE & Reef SE. (2002) Commentary: Ongoing debate over the safety of the different mumps vaccine strains impacts mumps disease control. *Int. J. Epidemiol.* 31: 983-984.
- Geeta MG & Kumar PK. (2004) Mumps-need for urgent action. *Indian Pediatr.* 41: 1181-1182.
- Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, Uejima H, Yuri K, Kamada M, Kumagai T, Sakiyama A, Miyata H, Ochiai T, Ihara T, Okafuji T, Okafuji T, Nagai E, Suzuki K, Shimomura Y, Ito Y & Miyazaki C (2004) Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J. Med. Virol.* 73: 97-104.
- Janaszek-Seydlitz W, Bucholtz B, Gorska P & Slusarczyk J (2005) Mumps in Poland since 1990 to 2003; epidemiology and antibody prevalence. *Vaccine*, 23: 2711-2716.
- Jin L, Beard S & Brown DW. (1999) Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J. Infect. Dis.* 180: 829-33.
- John TJ. (2004) An outbreaks of mumps in Thiruvananthapuram district. *Indian Pediatr.* 41: 298-300.
- Kanra G, et al. (2004) Complementary findings in clinical and epidemiologic features of mumps and mumps meningoencephalitis in children without mumps vaccination. *Pediatr. Int.* 46: 663-668.
- Laval RE. (2005) Notes about epidemic parotitis mumps). *Rev. Chilena Infectol.* 22: 282-284.
- Love A, et al. (1985) Hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein as a determinant of pathogenicity in mumps virus hamster encephalitis: analysis of mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 53: 67-74.
- MMWR Morb Mortal Wkly Rep (2006) Update: multistate outbreak of mumps-United States. 55: 559-563.
- MMWR Morb Mortal Wkly Rep. (2006) Mumps epidemic-United kingdom, 2004-2005. 55: 173-175.
- Palacios G, et al. (2005) Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis, *J Clin Microbiol.* 43: 1869-1878.
- Reyes A & Pinto A. (2002) Vacunas de DNA. En: Rocha-Gracia. R. del C., Martínez-Laguna, I. y López-Olguín, J. F. (Eds.). 2002. Temas de Actualidad en Microbiología, Ambiente y Salud. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México, pp. 327-342
- Reyes J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Ramírez H, Vallejo V & Zenteno E (2002) Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje bioquímico* 26: 99-127.
- Robins SL (1998) Patología estructural y Funcional. 5 ed. 1998, México: Mc Graw Hill., pp. 1442-1443.

- Rubin S, Mauldin J, Chumakov K, Vanderzanden J, Iskow R & Carbone K (2006) Serological and phylogenetic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains. *Vaccine*, 24: 2662-2668.
- Savage E, Ramsay M, White J, Stuart Beard S, Lawson H, Hunjan R & Brown D (2005) Mumps outbreaks across England and Wales in 2004: observational study. *BMJ*. 330: 1119-1120.
- Schlegel M, Osterwalder JJ, Galeazzi RL & Vernazza PL (1999) Comparative efficacy of three mumps vaccines during disease outbreak in Eastern Switzerland: cohort study. *BMJ* 319: 352.
- Teclé T, Bottiger B, Orvell C & Johansson B (2001) Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. *J. Gen. Virol.* 82: 2675-2678.
- Teclé T, Mickiene A, Johansson B, Lindquist L & Orvell C (2002) Molecular characterization of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Arch. Virol.* 147: 243-53.
- Wkly Epidemiol Rec.* (2001) Mumps virus vaccines. 76: 346-55.
- Wkly Epidemiol Rec.* (2005) Global status of mumps immunization and surveillance. 80: 418-424.
- Wolinsky JS, Klassen T & Baringer JR (1976) Persistence of neuroadapted mumps virus in brains of newborn hamsters after intraperitoneal inoculation. *J. Infect. Dis.* 133: 260-267.
- Yates PJ, Afzal MA & Minor PD (1996) Minor, Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J. Gen. Virol.* 77: 2491-2497.

Identificación de Genotipos de Rotavirus Bovino Prevalcientes en México como Herramienta par el Desarrollo de una Vacuna Recombinante

William A. Rodríguez-Limas, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares,
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa Cuernavaca, Mor. 62210, México.
E-mail: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Diarrea neonatal bovina, Rotavirus, Pseudopartículas virales, Vacuna recombinante

Keywords: Neonatal Calf Diarrhea, Rotavirus, Virus-like particles, Recombinant vaccine

RESUMEN

Existe una gama diversa de enfermedades asociadas al ganado, dentro de las cuales aparece la diarrea en la que las principales víctimas son las crías de bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. La infección por rotavirus es la principal causa de enfermedad diarreica en neonatos de bovinos y porcinos. A pesar de que existen vacunas con virus atenuados o inactivados, éstas son frecuentemente ineficientes e inseguras, pueden contener contaminantes patógenos para los animales a inmunizar y presentar reversión de la atenuación o una deficiente inactivación, lo que desencadena el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, en muchos casos no contienen los genotipos presentes en la región. Este artículo muestra la incidencia de rotavirus en el ganado bovino y presenta herramientas útiles para el diseño de una vacuna veterinaria que sea eficiente en el territorio mexicano.

ABSTRACT

The cattle industry is often affected by neonatal diarrhea, mostly caused by rotavirus, of which calves, piglets, young ovines, and goats are victims. This disease causes serious economic losses. Although vaccines based on attenuated or inactivated virus are available, they often are inefficient and unsafe, as they may revert to virulent forms, be inefficiently inactivated, contain pathogens, or lack of the relevant genotype in the region of interest. In Mexico, the rotavirus genotypes relevant for bovine cattle are unknown, which impedes the design of an efficient vaccine. This paper reviews the importance of rotavirus in bovines, and presents useful tools for the design of an efficient veterinary vaccine for Mexico.

DIARREA NEONATAL BOVINA

La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial compleja de los terneros. Clínicamente suele presentarse desde las 12 h posparto hasta los primeros 35 días de vida y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y, en casos severos, muerte en pocos días (Fig. 1).



Fig. 1. Becerro muerto por diarrea

En Latinoamérica, la diarrea neonatal de los terneros es grave y frecuente, provocando importantes pérdidas económicas por morbilidad y mortalidad. La repercusión económica es importante ya que su elevada incidencia (superior al 60%) implica tratamientos veterinarios, demanda de tiempo y mano de obra. Además, los porcentajes de mortalidad pueden llegar a ser importantes (hasta el 20%), así como el retraso en el desarrollo corporal que manifiestan los animales afectados (Odeón, 2001).

Los agentes etiológicos involucrados son variados, siendo los virus los más importantes. La acción de los virus suele actuar como factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias. Los virus causan destrucción y atrofia de las células intestinales, provocando disfunción intestinal y mala absorción de nutrientes, con acumulación de leche parcialmente digerida en la luz intestinal y aumento de la presión osmótica que favorece el proceso diarreico.

Entre los agentes virales, el **rotavirus bovino Grupo A** se encuentra ampliamente distribuido, habiéndose demostrado como el principal agente causal de diarrea neonatal en ranchos de cría (Reynolds *et al.*, 1986; Parwani *et al.*, 1994; Saif & Fernández, 1996). El diagnóstico etiológico de la diarrea neonatal bovina se basa en la detección del agente en materia fecal de terneros diarreicos y/o a partir de muestras de intestino obtenidas en necropsias.

En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina, INTA, se encontró que el 44.6% de las crías enfermas estaban afectadas por rotavirus tipo A y que éste participaba en coinfecciones con *Cryptosporidium* y *Salmonella* spp. (Fig. 2).

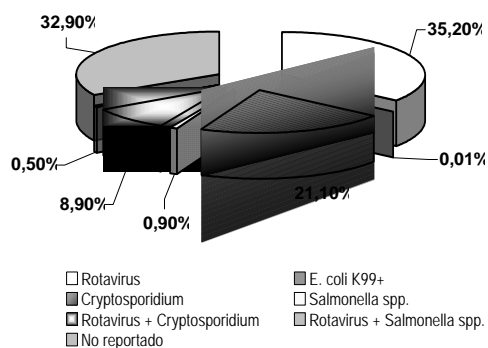


Fig. 2. Agentes etiológicos asociados a la diarrea neonatal bovina. Datos tomados de: www.inta.gov.ar

ROTAVIRUS

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y posee 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Estructuralmente está formado por dos capas proteicas internas VP2 (102 kDa) y VP6 (44 kDa) y dos proteínas de cápside exteriores, VP4 (88 kDa) y VP7 (38 kDa), además de VP1 y VP3 que están unidos al dsRNA (Fig. 3) (Estes, 1996).

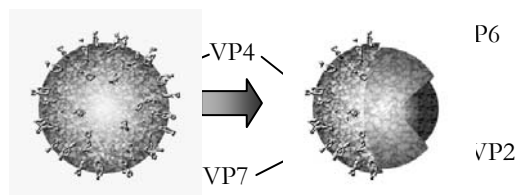


Fig. 3. Esquema estructural del rotavirus.

Las propiedades antigénicas del rotavirus (grupo, subgrupo y serotipo) están determinadas por las proteínas de cápside VP6, VP7 y VP4. La especificidad de grupo y subgrupo está determinada por la proteína VP6, la cual clasifica los rotavirus en siete grupos (A a G); de éstos el grupo A es de importancia patológica. Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, pero muy pocos rotavirus de grupos diferentes al A han podido propagarse en cultivo celular (Shinosaki *et al.*, 1996; Estes, 1996).

Para los rotavirus del grupo A se han definido diferentes subgrupos (SG). Dicha clasificación se basa en la presencia o ausencia de distintos epítopes de VP6 inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales. Se conocen así el SG I, SG II, SG I+II, SG no-I y no-II, según sean reactivos o no a anticuerpos monoclonales específicos. El SG II es el más frecuente entre las cepas humanas mientras que el SG I es más frecuente entre las cepas de origen animal (López *et al.*, 1994).

Las proteínas virales de la cápside externa VP7 y VP4 definen los serotipos G y P, respectivamente. VP4 es una proteína sensible a proteasa, mientras que VP7 es una glicoproteína. Así, la clasificación de los rotavirus es un sistema binario que distingue distintos serotipos de las proteínas VP7 y VP4 y son determinados por reactividad con antisueros policlonales o monoclonales (Estes, 1996).

La poca disponibilidad de anticuerpos y antisueros que reconocieran los serotipos de la proteína VP4 llevó a la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del segmento 4 del genoma de rotavirus. Así pues, la genotipificación es una alternativa que se ha preferido para sustituir la serotipificación. Hasta la fecha, se han caracterizado 15 genotipos G y 26 genotipos P de rotavirus (Cardoso *et al.*, 2000; Estes, 1996; Liprandi *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2006; Mc Neal *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2000; Sereno *et al.*, 1994). De los 26 genotipos P conocidos, solo 16 corresponden a serotipos conocidos. En cambio, para el caso de VP7 existe una relación muy clara entre genotipo y serotipo.

Dentro de cada serotipo G, la homología a nivel de secuencias de aminoácidos es bastante alta (91-100%). En cambio, entre cepas de diferentes serotipos es bastante menor, llegando a encontrarse homologías entre el 55 y 82%. En el caso del gen de VP4, el grado de homología existente entre secuencias nucleotídicas pertenecientes al mismo genotipo es superior al 89%. (Cao *et al.*, 1999; Estes, 1996; Gentsch *et al.*, 1996; Sereno *et al.*, 1994).

La mayoría de los genotipos de rotavirus parecen estar restringidos entre especies, pero también se han encontrado transmisiones inter-especies (Khamrin *et al.*, 2006). El virus completo puede ser transferido de animales a humanos y viceversa, pero en raras ocasiones produce manifestaciones clínicas severas en el nuevo huésped (Rahman *et al.*, 2005). En el caso de rotavirus A en bovinos, se han identificado por lo menos 10 genotipos G (G1-G4, G6-G8, G10, G11 y G15) y 5 genotipos P (P1, P5, P11, P17 y P21). De acuerdo a informes previos, los genotipos G6 y G10 y más recientemente los genotipos G8, P1, P5 y P11 han sido frecuentemente encontrados en las muestras fecales de terneros con diarrea a través del mundo (Alfieri *et al.*, 2004; Barreiros *et al.*, 2004; Falcone *et al.*, 1999; Fukai *et al.*, 2002; Gulati *et al.*, 1999; Suzuky *et al.*, 1993; Wani *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconocen cuales son los genotipos bovinos prevalentes en México.

GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS

Estudios epidemiológicos realizados alrededor del mundo han demostrado que los genotipos G y P de

rotavirus bovino presentan distribuciones geográficas y temporales diversas. De allí se deriva la importancia de realizar una vigilancia epidemiológica de las cepas de rotavirus presentes en el ganado, que suministre información importante para el desarrollo e implementación de una vacuna de rotavirus bovino y que sea efectiva para el ganado mexicano. A continuación se resumen algunas estrategias utilizadas para genotipificación de rotavirus bovino.

El primer paso consiste en la identificación de muestras donde el rotavirus tipo A se encuentre presente. Para ello se realizan muestreo de animales con síntomas de diarrea, cuyas edades oscilen entre las 12 horas y 35 días posparto. Las muestras pueden ser obtenidas de materia fecal o a partir de muestras de intestino extraídas en necropsias. La detección de rotavirus tipo A se realiza por diferentes metodologías, entre las que se encuentran la hemaglutinación con látex, las pruebas de ELISA y los inmunoensayos cromatográficos (Fig. 4).



Fig. 4. Dispositivo comercial para detección de Rotavirus A

A las muestras positivas para rotavirus tipo A se les extrae el RNA viral utilizando métodos químicos (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) o *kits* de extracción de RNA viral, los cuales utilizan columnas de sílica gel para capturar el RNA y dejar pasar los contaminantes de la muestra. La concentración de dsRNA de rotavirus puede ser determinada por absorbancia a 260 nm y se utiliza para cuantificar la cantidad de RNA que será usada en el proceso de genotipificación.

Para identificar los genotipos G de las muestras obtenidas en la etapa anterior, se realizan tres pasos: i) Transcripción reversa del RNA genómico aislado, utilizando un par de *primers* genéricos (Bov9Com5 y

Bov9Com3) ii) Primera amplificación por PCR del gen de VP7 y iii) Segunda amplificación por PCR (*Multiplex* PCR), utilizando un *primer* genérico (Bov9Com5) y un cóctel de *primers* de tipificación específicos (G6, G8 y G10) (Tabla 1). Ya que los *primers* específicos utilizados se localizan a diferentes distancias del extremo 5' del gen, el tamaño de los productos del segundo PCR indican el genotipo G de cada una de las muestras analizadas. Los tamaños de cada uno de los productos de la segunda amplificación se esquematizan en la Fig. 5. Los productos amplificados deben ser identificados por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 1. *Primers* usados para amplificar el gen completo de VP7 y para genotipificación tipo G de rotavirus (Isegawa *et al.*, 1993)

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Bov4Com5	5'>TTCATTATTGGGACGATTCACA< 3'
Bov4Com3	5'>CAACCGCAGCTGATATATCATC< 3'
P1	5'>TTAAATTCATCTCTTAGTTCTC< 3'
P5	5'>GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC< 3'
P11	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'
Con3	5'>TGGCTTCGCTCATATACAGACA< 3'
Con2	5'>ATTTTCGGACCATTTATAACC< 3'
Con(P1)	5'>CGAACGCGGGGTGGTAGTTG< 3'
Con(P5)	5'>GCCAGGTGTCGCATCAGAG< 3'
Con(P11)	5'>GGAACGTATTCTAATCCGGTG< 3'

una combinación de las dos metodologías. La primera estrategia denominada estrategia BOV usa un juego de *primers* genéricos (Bov4Com5 y Bov4Com3) que amplifica un fragmento de 856 pb del segmento 4 del genoma de rotavirus y un juego de tres *primers* de tipificación para P1, P5 y P11. La segunda estrategia, denominada estrategia CON, utiliza como *primers* genéricos Con2 y Con3 y como *primers* de tipificación los *primers* Con(P1), Con(P5) y Con(P11) (Tabla 2). Una tercera estrategia propuesta por nuestro grupo (HIBR) utiliza simultáneamente los *primers* genéricos Bov4Com3 y Con3, que amplifican un segmento de 1919 pb y los *primers* de tipificación de la estrategia CON. Los productos esperados de las amplificaciones de las tres estrategias se esquematizan en la Fig. 6.

Tabla 2. *Primers* usados para amplificar un fragmento del gen de VP4 y para genotipificación tipo P de rotavirus (Gouvea *et al.*, 1994, Isegawa *et al.*, 1993)

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Bov9Com5	5'>TGTATGGTATTGAATATACCAC< 3'
Bov9Com3	5'>TCACATCATACTAATCT< 3'
G6	5'>CTAGTTCCTGTGTAGAATC< 3'
G8	5'>CGGTTCCGATTAGACAC< 3'
G10	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'

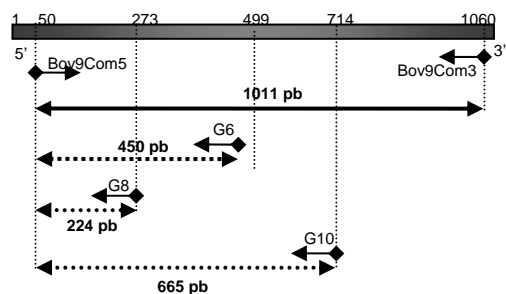


Fig. 5. Esquema del segmento 9 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los *primers* y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

Para la genotipificación P, se realizan básicamente los mismos tres pasos descritos para los genotipos G. Se han reportado dos estrategias en la literatura para genotipificación del segmento 4 de rotavirus (Gouvea *et al.*, 1994; Isegawa *et al.*, 1993) y se ha propuesto hacer

CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para corroborar los resultados obtenidos en el proceso de genotipificación, los productos del multiplex PCR de cada uno de los genotipos encontrados deben secuenciarse para confirmar que los productos de amplificación correspondan al gen que se está analizando. El análisis de datos de las secuencias obtenidas se puede realizar visualizando las secuencias con diferentes tipos de *software*. El paquete Chromas (Technelysium Pty, Ltd) se encuentra disponible en línea y puede ser utilizado para dicho fin. Para observar homologías de secuencia se realiza un análisis de similitud de secuencias “BLAST” (Altschul *et al.*, 1997).

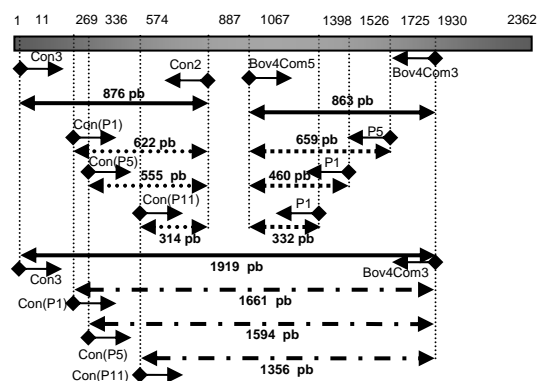


Fig. 6. Esquema del segmento 4 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los *primers* y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

VACUNAS CONTRA ROTAVIRUS BOVINO

Las dificultades presentadas por la aplicación de vacunas con genotipos no presentes en la zona radica en que la protección entre genotipos puede ser deficiente o incluso nula (www.usda.gov).

Una vez que se conocen los genotipos presentes en la región, es posible desarrollar una vacuna *ad hoc* para la zona de interés.

A pesar de que existen vacunas para rotavirus producidas de manera tradicional, estas son frecuentemente ineficientes e inseguras. Desde el punto de vista de obtención a gran escala, la producción de virus puede constituir un riesgo. Primero, la infraestructura necesaria para producir virus potencialmente patógenos es muy compleja y requiere de un estricto control. Además, el producto terminado no está exento de riesgos, ya que existe la posibilidad de reversión de los virus atenuados o de una deficiente inactivación, lo que puede resultar en la transmisión de la enfermedad. Otro problema es la contaminación con otros virus que pueden estar presentes en el sistema de producción. Un ejemplo es la contaminación con pestivirus, causantes de enfermedades graves en cerdos, ovejas, vacas y cabras (Organización Mundial de Sanidad Animal, www.oie.int).

En bovinos se han administrado vacunas comerciales que contienen la cepa de rotavirus NCDV (P1, G6) a vacas gestantes para proveer inmunidad a los terneros recién nacidos (Barreiros *et al.*, 2004). Aunque algunos autores describen protección heterotípica, en la práctica,

la diarrea provocada por rotavirus del grupo A ocasionalmente ocurre en terneros cuyas madres habían sido vacunadas. (Barreiros *et al.*, 2004). Además, las vacunas tradicionales puede presentar alta reactogenicidad y estar asociadas a casos de invaginación intestinal, lo que repercute en retraso en el desarrollo de los animales (Holland, 1990).

En la actualidad, en México se utiliza la vacuna Scourguard® (Pfizer), la cual es utilizada en los ranchos para la producción de carne y leche. Esta vacuna es de tipo multipropósito y contiene cepas inactivadas de rotavirus, coronavirus y *E. coli* K99, además está formulada con toxoide de *C. Perfringens* tipo C y gentamicina como conservador. (www.scourguard.com).

LAS PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES (PPV) COMO ALTERNATIVA DE VACUNACIÓN

Las PPV han sido utilizadas para inmunizar contra otros virus. Ensayos clínicos han demostrado que PPV ensambladas de la proteína estructural L1 del papilomavirus (VPH) pueden reducir la incidencia de la infección del VPH y el cáncer cervical (Koutsky *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2005), siendo la vacuna Gardasil® (Merck & Co. Inc.), la primera vacuna recombinante humana basada en pseudopartículas virales aprobada por la FDA (8 de junio de 2006, <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEW/2006/NEW01385.html>). Otras enfermedades que son objetivo de las vacunas basadas en PPV incluyen gastroenteritis, hepatitis C y malaria (Pattenden *et al.*, 2005).

Para el caso de rotavirus, las PPV son producidas al expresar las proteínas estructurales del virus en un sistema recombinante, generalmente usando el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV). Estudios previos han demostrado que la estructura tridimensional de las PPV logra una excelente respuesta inmune humoral y celular de forma segura (Jiskoot *et al.*, 1997). Para el caso de PPV de rotavirus bovino se ha demostrado que los títulos de anticuerpo que se obtienen en calostro o leche después de vacunar a vacas preñadas son incluso mayores que aquellos obtenidos al vacunar con virus inactivados (Fernández *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Otra ventaja adicional es que pueden obtenerse estructuras polivalentes, que protejan simultáneamente

contra varios genotipos, de forma versátil y sencilla (Kim *et al.*, 2002).

SISTEMA CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS (CI-BV)

La producción de PPV para rotavirus requiere la expresión simultánea de varias proteínas virales y el complejo proceso de ensamble para formar la estructura viral. Dentro de los sistemas más utilizados se encuentra el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV), que consiste en infectar un cultivo de células de insecto con un baculovirus recombinante que contenga el gen o genes de interés, usualmente bajo el promotor *polh* (Palomares *et al.*, 2006). Este sistema tiene varias ventajas: es un sistema eucariótico superior altamente productivo, capaz de producir proteínas muy similares a las de los mamíferos, y la construcción de nuevos vectores recombinantes es sencilla. Sin embargo, el cultivo *in vitro* de células de insecto tiene limitaciones importantes ya que las células de insecto, al igual que otras células de eucariotes superiores, son muy frágiles, son sensibles a metabolitos generados en los cultivos y tienen requerimientos nutricionales complejos (Palomares *et al.*, 2002).

En el sistema de CI-BV es posible obtener diferentes estructuras de PPV de rotavirus, dependiendo de las proteínas expresadas. Estas estructuras pueden ser de una sola capa (expresión de VP2) o multicapa (VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4) (Crawford *et al.*, 1994; Labbé *et al.*, 1991), pero pueden obtenerse estructuras incompletas o con diferente morfología. Dentro de los estudios de ensamblaje, se ha encontrado que la formación de la primera esfera de proteína constituida por VP2 es un paso importante para la formación de partículas estables. Luego, debe ensamblarse VP6, que es indispensable para la unión de VP7 y VP4. VP4 puede unirse a la estructura VP2/VP6 sin necesidad de VP7 y viceversa (Crawford *et al.*, 1994).

Uno de los parámetros más determinantes en el sistema CI-BV es la multiplicidad de infección (MDI) la cual se define como el número de partículas infecciosas que se adiciona por célula de insecto en el cultivo. Una MDI de 1 ufp/cél significa que se adicionó una partícula infecciosa por cada célula de insecto del cultivo. Al realizar manipulación de la MDI de cada baculovirus y

hacer diferentes combinaciones de las MDI, se puede optimizar y manipular la composición de las PPV. Es necesario coexpresar las diferentes proteínas con una relación estequiométrica correcta, ya que un exceso o sobreexpresión de una o más proteínas sería económica y energéticamente ineficiente.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han conllevado a encontrar condiciones de expresión de VP2 y VP6 a diferentes MDI que pueden ser utilizadas como punto de partida para el análisis del ensamblaje de las PPV completas (Palomares *et al.*, 2002; Mena, 2004; Mena *et al.*, 2006). Es necesario conocer el comportamiento de VP4 y VP7 de los genotipos escogidos, a fin de establecer los mecanismos y condiciones adecuadas para dar una composición y arquitectura consistentes de las PPV de la futura vacuna. Esta arquitectura será el principio activo de la vacuna que se pretende formular y la cual podrá proteger eficientemente al ganado bovino mexicano, mejorando la calidad de vida de los animales y las ganancias económicas de los productores.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo en muestreo de campo por la compañía BIOZOO S.A. de C.V. Apoyo técnico por Vanessa Hernández. Apoyo económico proyecto 2004-c01-103 financiado por SAGARPA-CONACyT.

REFERENCIAS

- Alfieri AF, Alfieri AA, Bacellar MA, Gagliardi JP & Richtzenhain LJ (2004) G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet. Microbiol.* 99: 167-173.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.
- Barreiros MA, Alfieri AF, Médici KC (2004) G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *J. Vet. Med.* B51: 104-109.
- Cao XR, Akihara S, Fang ZY, Nakagomi O & Ushijima H (1999) Genetic variation in the VP4 and NSP4

- genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Microbiol. Immunol.* 43: 171-175.
- Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MPS, Leite JPG, Munford V & Racz ML (2000) Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J. Health. Popul. Nutr.* 18: 39-43.
- Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou Y-J & Estes MK (1994) Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68: 5945-5952.
- Estes MK (1996) Rotaviruses and their replication. In: Fields virology. Knipe DM & Howley PM (eds). Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, pp. 1747-1785.
- Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A & Tollis M (1999) Determination of Bovine Rotavirus G and P Serotypes in Italy by PCR. *J. Clin. Microb.* 37: 3879-3882.
- Fernández FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Estes MK & Saif LJ (1998) Passive immunity in newborn calves supplements from with recombinant to bovine rotavirus fed colostrum cows immunized SAll rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 16: 507-516.
- Fukai K, Maeda Y, Fujimoto K, Itou T & Sakai T (2002) Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrhoeic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Vet. Microbiol.* 86: 343-349.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK & Glass RI (1996) Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174: S30-S36.
- Gouvea V, Santos N & Timenetsky MC (1994) VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1333-1337.
- Gulati B, Nakagomi O, Koshimura, Nakagomi T & Pandey R (1999) Relative frequencies of g and p types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. *J. Clin. Microb.* 37: 2074-2076.
- Holland RE (1990) Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microb. Rev.* 3: 345-375.
- Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S & Ueda S (1993) Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Molec. Cell. Probes*, 7: 277-284.
- Jiskoot J, Kersten GA & Beuvery EC (1997) Vaccines. In: Pharmaceutical Biotechnology. Crommelin DJA & Sindelar RD (Eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 255-275.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S & Ushijima H (2006) Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J. Med. Virol.* 78: 986-994.
- Kim Y, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO & Saif LJ (2002) Lactogenic antibody response in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccine. *Vaccine* 20: 1248-1258.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM & Jansen KV (2002) A controlled trial of a human papillomavirus tipe 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1645-1651.
- Labbé M, Charpiliene A, Crawford S, Estes MK & Cohen J (1991) Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 65: 2946-2952.
- Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, Lopez JA, Pujol H, Ludert JH, Joelsson DB & Ciarlet MA (2003) Novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virol.* 315: 373-380.
- López S, Espinosa R, Greenberg HB & Arias CF (1994) Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virol.* 204: 153-162.
- Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Cavalli A, Elia G, Decaro N, Terio V, Bozzo G, Camero M & Buonavoglia V (2003) Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virol.* 314: 358-370.
- Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A & Buonavoglia V (2006) Identification of

- a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*. 346: 310-311.
- McNeal MM, Sestak K, Choi AHC, Basu M, Cole MJ, Aye PP, Bohm RP & Ward RL (2005) Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J. Virology*. 79: 944-954.
- Mena JA (2004) Estudio del ensamble de pseudopartículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena JA, Ramírez OT & Palomares LA (2006) Designing infection strategies for the simultaneous production of two proteins by insect cells: A flow cytometry study. *J. Biotechnology*. (Sometime).
- Odeón A (2001) Diarrea neonatal de los terneros. Etiopatología, tratamiento y control. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_dig/diarreaneon.htm
- Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K & Urasawa S (2000) New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J. Med. Virology*. 60: 63-69.
- Palomares LA & Ramírez OT (2002) Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 635-644
- Palomares LA, Estrada S & Ramírez OT (2006) Principles and applications of the insect cell baculovirus expression vector system. *In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications* (Ozturk SS & Hu WS (eds). Taylor and Francis, New York, pp. 627-692.
- Parwani AV, Tsunemitsu H & Saif LJ (1994) Current research in bovine groups A and C rotaviruses. *Curr. Top. Vet. Res.* 1: 115-32.
- Pattenden LK, Middelberg APJ, Nielbert M & Lipin DI (2005) Towards the preparative large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotech.* 23: 523-529.
- Rahman M, Matthijssens, J, Nahar S, Podder G, Sack DA, Azim T & Ranst MV (2005) Characterization of a novel P[25], G11 human Group A rotavirus. *J. Clin. Microb.* 43: 3208-3212.
- Rao CD, Gowda K & Reddy BS (2000) Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*. 276: 104-113.
- Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG & Bunch KJ (1986) Microbiology of calf diarrhoea in Southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- Saif LJ & Fernández FM (1996) Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 174: S98-S106.
- Sereno MM & Gorziglia MI (1994) The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology*. 199: 500-504.
- Shinosaki K, Yamanaka T, Tokieda M, Shirasawa H & Shimizu, B (1996) Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *J. Med. Virology*. 48: 48-52.
- Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima k, Matsuda Y & Nakagomi O (1993) Relative Frequencies of G (VP7) and P (VP4) Serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microb.* 31: 3046-3049.
- Villa LL, Costa R, Petta C, Andrade R, Ault K, Giuliano A, Wheeler C, Koutsky L, Malm C & Lehtinen M (2005) Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6: 271-278.
- Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM & Ashrafi MA (2004) Determination of bovine rotavirus G genotypes in Kashmir, India. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 23: 931-936

Metabolitos Antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS: Influencia de la Fuente de Carbono en la Síntesis

Alina Frias, Pilar María Villa, Esmérida Torres

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca # 804 esq. Carretera Central. San Miguel del Padrón. Ciudad de La Habana. Cuba Apartado Postal 4026.

E-mail: alinafrias2001@yahoo.es

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, metabolitos antimicrobianos, fermentación, fuente de carbono.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial metabolites, fermentation, carbon sources

RESUMEN

Considerable atención ha recibido el uso de metabolitos de *Pseudomonas* para el control de fitopatógenos. Las bacterias pertenecientes a este género producen una amplia variedad de metabolitos antimicrobianos y la obtención de éstos por métodos biotecnológicos está altamente influenciada por parámetros fermentativos. En el presente trabajo se estudió la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de dichos compuestos en *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. Los mejores resultados se obtuvieron con glicerol y ácido glutámico como fuentes de carbono, demostrando la alta influencia de este factor sobre la producción de metabolitos antimicrobianos.

ABSTRACT

Considerable attention has received the use of metabolites from *Pseudomonas* as plant pathogens control. Bacteria belonging to the *Pseudomonas* genus produce a wide diversity of antimicrobial metabolites and its production by biotechnological methods is strongly influenced by fermentative parameters. In this work the influence of carbon sources over antimicrobial metabolites synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* PSS strain, was studied. The best results were obtained with glycerol and glutamic acid as carbon sources, which showed a remarkable influence on antimicrobial metabolites production.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la tendencia mundial es hacia la disminución del uso de plaguicidas químicos, en el control de plagas y enfermedades que atacan los cultivos agrícolas; por lo que se buscan métodos alternativos, entre los que se encuentran los biológicos, con el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos para el tratamiento de enfermedades provocadas por fitopatógenos, con vistas a la protección ambiental y aumentar la productividad en la agricultura. (Pérez, 2004; Stefanova *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1995)

Entre los microorganismos empleados en el control biológico, se destacan las especies del género *Pseudomonas*, por su gran versatilidad de producir metabolitos secundarios antimicrobianos, como: sideróforos y antibióticos, los cuales pertenecen a grupos de compuestos químicamente definidos y con funciones biológicas específicas, contra hongos fitopatógenos como: *Alternaria alternata*, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Alemany, 2002; De Souza *et al.*, 2003;

Villa, 1999; Duffy & Défago, 1997; Stefanova *et al.*, 1995; Thomashow & Weller, 1998; Howie & Suslow, 1991; Gutterson, 1990).

Estos metabolitos son producidos durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano y su producción depende de las condiciones de cultivo, siendo los parámetros nutricionales de gran importancia, reconociéndolos como la llave para incrementar los niveles de producción de los metabolitos (Alemany, 2002; Frias, 2003; Duffy & Défago, 1999; Ownley *et al.*, 1992), con el fin de obtener productos comerciales, por lo que para lograr un proceso industrial económicamente factible, el medio de producción debe ser menos complejo y viable, con vistas a abaratar los costos de obtención del producto.

Dado estos antecedentes, en este trabajo se presentan resultados del estudio de la influencia de la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos empleados

Pseudomonas aeruginosa cepa PSS y *Alternaria alternata*, procedentes de la colección de cultivos del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y del Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) respectivamente.

Medios y condiciones de cultivo

P. aeruginosa cepa PSS, fue conservada por liofilización y en placas de King B Agar (King *et al.*, 1954) a 27°C, mientras que el hongo fue crecido sobre placas de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Difco, Detroit, MM1) a 27-30°C.

Influencia de la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos

Para ello se evaluaron 9 fuentes de carbono de orígenes diferentes a una concentración de 10 g L⁻¹, las cuales se relacionan a continuación: Glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, glutámico, glicerol, maltosa, soya y Biopla (Medio residual en la producción de melagenina) (Fernández, 1998). Como fuente de nitrógeno se empleó urea (0.85 g L⁻¹) y como fuente de fósforo el K₂HPO₄ (0.56 g L⁻¹) (Villa, 1999). Todos los medios fueron ajustados con NaOH (0.1N) a pH 7 al inicio de la fermentación.

Desarrollo del inóculo

De un cultivo de 24 h crecido sobre Placa Petri con King B agar, se tomaron 10 colonias y se transfirieron a un matraz de 250-mL con invaginación que contenía 50 mL de King B caldo, el cual se incubó en zaranda rotatoria durante 8 h a 30°C y 175 rpm para desarrollar las células (Villa, 1999; Frias, 1997). Finalmente se empleó como inóculo, otro matraz de igual capacidad conteniendo 90 mL de King B caldo inoculado en una relación de 1:10 e incubado 18 h a 175 rpm y 30°C (Frias, 1997).

Condiciones de Fermentación

El inóculo fue transferido en una relación de 1:10 a matraces invaginados de 250-ml de capacidad que

contenían 90 ml de los medios con las distintas fuentes a estudiar. Se incubaron por triplicado en zaranda rotatoria durante 24 h a 30°C pH 7 y 175 rpm (Frias, 1997).

Análisis realizados

Crecimiento: Mediante densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro OPTON PM 2^a.

pH: Las determinaciones de pH se realizaron en pH metro Pacitronic MV 870.

Sideróforos: Se determinaron por un método espectrofotométrico, conociendo el coeficiente de absorción molar E=2000 L M⁻¹ cm⁻¹ (Villa *et al.*, 1995).

Determinación de azúcares por cromatografía de fase reversa (HPLC)

Las muestras del caldo fermentado (100 mL) se centrifugaron, filtraron e inyectaron directamente al sistema cromatográfico. Los perfiles cromatográficos se obtuvieron en un cromatógrafo líquido isocrático con un detector de índice de refracción. Se empleó una columna cromatográfica SUPERCOSIL LC-NH₂, 5 μm, 250 x 4.5, con una pre-columna SUPERCOSIL LC-NH₂, 5 μm y válvula de inyección RHEODYNE, con lazo de 20 μl. Como fase móvil se empleó acetonitrilo:agua 80:20, con flujo de 2 ml min⁻¹. La concentración de los azúcares se calculó mediante el programa BIOCROM por el método estándar externo.

Determinación de consumo de glicerol y glutámico

Estos compuestos se determinaron por cromatografía de fase reversa (HPLC), según la técnica desarrollada en el ICIDCA por Villa *et al.* (1999).

Producción, extracción y actividad antifúngica del crudo

El caldo final (24 h) obtenido por fermentación (100 mL) se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm. Del sobrenadante se tomaron 8 mL y fueron llevados hasta pH 3 con HCl 1N y extraídos 3 veces con 1.4 mL de acetato de etilo cada vez. Se centrifugó y la fracción orgánica se evaporó hasta sequedad en estufa al vacío a 45°C para cuantificar el principio activo en base a peso seco (mg L⁻¹) (Villa, 1999).

Ensayos in vitro

Se llevaron a cabo mediante ensayos de actividad antibiótica por la técnica del envenenamiento del medio

de cultivo en Agar Papa Dextrosa (PDA); frente al hongo fitopatógeno *A. alternata*. Se determinó el por ciento de inhibición del crecimiento micelial comparado con un testigo y las mediciones se realizaron a las 48 h (Frias, 2003; Villa, 1999; Bagnasco *et al.*, 1998).

Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron procesados por el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows, versión 5.0, Copyright by Statistical Graphics Corp.1994-2000.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la obtención de metabolitos antimicrobianos a partir de *P. fluorescens*, la fuente de carbono juega un importante emplear en el medio en que éstas se van a desarrollar, por lo que todo estudio relacionado con su efecto es indispensable para la producción de los mismos en condiciones de cultivo (Frias, 2003; Villa *et al.*, 2002, 2001; Duffy & Défago, 1997; Slininger *et al.*, 1996).

El efecto que ejercen las diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento celular y la velocidad específica de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PSS, se presentan en la Fig. 1. En la misma se observa que la fase estacionaria se alcanza a las 8 h para los medios glutámico y glicerol y para la glucosa a las 10 h, mientras que los medios Biopla, soya, sacarosa, lactosa, almidón y maltosa apenas propiciaron el crecimiento de la cepa PSS.

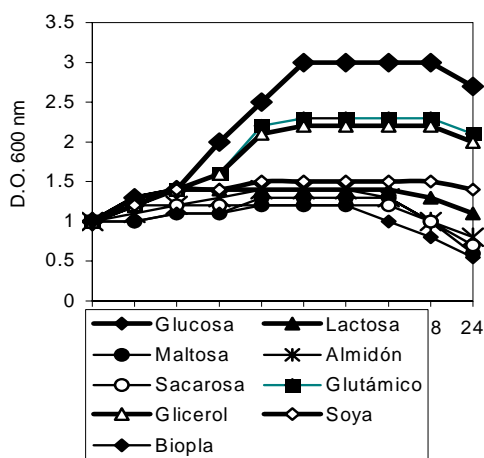


Fig. 1. Dinámica de crecimiento de la cepa PSS de *P. aeruginosa* con las 9 fuentes de carbono evaluadas, 30°C, 175 rpm (n= 3, desviación estándar= 0.03).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Villa (1999), Fernández (1998) y Frías (1997), con la misma cepa en los medios con glucosa, glutámico y Biopla.

Las fuentes de carbono estudiadas influyen sobre el crecimiento de la cepa de modo diferente, alcanzando la máxima velocidad específica de crecimiento en el medio con glucosa ($\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$), seguido de los medios glutámico y glicerol con una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$ y $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, sustratos como: soya, sacarosa, lactosa, almidón, maltosa y el medio residual de melagenina denominado Biopla (Tabla 1), reportan los valores más bajos ($\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$).

Tabla 1. Resultados de la influencia de las fuentes de carbono sobre el pH y la velocidad específica de crecimiento (μ) en *P. aeruginosa* cepa PSS.

Fuentes de Carbono	pH	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Glucosa	3.4	0.30
Lactosa	8.6	0.06
Maltosa	8.7	0.05
Almidón	8.5	0.05
Sacarosa	8.6	0.06
Glutámico	8.9	0.22
Glicerol	7.9	0.20
Soya	8.7	0.05
Biopla	8.8	0.05

Según el análisis de varianza (ANOVA), las fuentes de carbono estudiadas influyen significativamente sobre el crecimiento celular para un nivel de confianza del 99% (Datos no mostrados). Por su parte, el test de Duncan evidenció la diferencia significativa existente entre las fuentes de carbono, destacándose los medios con glucosa, glutámico y glicerol para un $\mu = 0.05$ (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono y el crecimiento microbiano

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glucosa	2.70	A
Glutámico	2.10	B
Glicerol	1.90	B
Maltosa	1.39	C
Soya	1.39	C
Lactosa	1.33	C
Almidón	1.21	C
Sacarosa	1.12	C
Biopla	1.10	C

(n= 3) ($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no difieren significativamente)

Estos resultados indican que la cepa PSS logra un mayor crecimiento al emplear un azúcar simple como la glucosa, siendo fácilmente asimilable por los microorganismos, según el principio de economía celular (Fernández, 1998).

Los niveles medio de crecimiento obtenidos con glutámico como fuente de carbono, se justifican al ser convertidos los aminoácidos a α -ceto ácidos mediante desaminación oxidativa, siendo incorporados directamente al ciclo de Krebs, así como el glicerol se fosforila y oxida a dihidroxiacetona fosfato, que a su vez se isomeriza a gliceraldehído-3 fosfato, siendo éste un compuesto intermediario que se encuentra tanto en la vía glicolítica como en la gluconeogénica (Stryer, 1995).

Por otra parte, los bajos niveles de crecimiento obtenidos con disacáridos como fuente de carbono, así como el Biopla y la harina de soya, pudieran estar relacionados con su asimilación. Debido a la complejidad de su estructura, éstos requieren de una previa hidrólisis enzimática, llevándolos a unidades individuales de monosacáridos para ser transportados al interior de la membrana citoplasmática (Doudoroff & Palleroni, 1984).

La Fig. 2 muestra la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de metabolitos sideróforos, donde el valor máximo alcanzado se produjo en el medio glutámico con $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguido de glicerol ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$). Los niveles de producción en las restantes

fuentes no sobrepasan los $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. En los medios donde se empleó lactosa, almidón, maltosa sacarosa, la síntesis de sideróforos fue baja, coincidiendo con lo reportado por Slininger *et al.* (1996) y en el que contiene glucosa, se reporta el nivel más bajo de producción de sideróforos, lo que confirma lo planteado por Villa (1999).

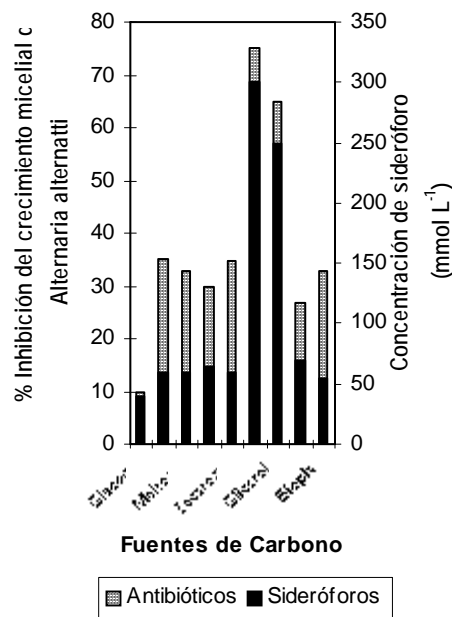


Fig. 2. Influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de metabolitos sideróforos y antibióticos en *P. aeruginosa* cepa PSS a las 48 h. (n= 3, desviación estándar= 1.16)

El análisis de varianza realizado a las fuentes de carbono sobre la producción de sideróforos muestra la diferencia significativa para un 99% de confianza entre los componentes (Datos no mostrados).

El test de Duncan refleja coincidencias entre grupos como son los casos de lactosa-maltosa-Biopla-sacarosa soya-almidón, siendo los medios glutámico, glicerol y glucosa los que mayor diferencias significativas presentaron para un $\alpha= 0.05$ (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono sobre la producción de sideróforos.

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glutámico	300.0	a
Glicerol	250.0	a
Almidón	61.6	b
Soya	61.6	b
Lactosa	53.3	b
Maltosa	51.6	b
Biopla	51.6	b
Sacarosa	50.0	b
Glucosa	36.6	b

(n= 3)($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no presentan diferencias significativas)

Estudios realizados por Nowak-Thompson *et al.* (1994), plantean que la glucosa favorece o desfavorece, según el metabolito a obtener. Particularmente, la cepa PSS prefiere un combustible fácilmente fermentable como la glucosa para su crecimiento, sin favorecer la producción de metabolitos sideróforos, posiblemente por la formación de ácido glucónico (Lehninger, 1981), si tenemos en cuenta que el pH final de la fermentación alcanza valores bajos (3.4), mientras que con las restantes fuentes de carbono, se mantuvo entre 7.9 y 8.9 (Tabla 1). Otros autores plantean que la síntesis de metabolitos antimicrobianos es sensible a pH ácidos, mostrando una pronunciada dependencia de éste parámetro (Díaz de Villegas, 1999; Budzikiewicz, 1997; Torres *et al.*, 1986 y Meyer & Abdallah, 1978). Otros plantean que los sideróforos pueden indirectamente estimular la biosíntesis de otros compuestos antimicrobianos (Leeman *et al.*, 1996).

En trabajos realizados por Slininger & Shea-Wilbur (1995) con la cepa *Pseudomonas fluorescens* 2-79 se obtuvo un rango de pH entre 7 y 8 como óptimo para el ácido 1-carboxilo fenacina en el medio glucosa con urea. Sin embargo, en nuestro trabajo con *P. aeruginosa* PSS, no se incrementa el pH como sucede con las otras fuentes, confirmando que la cepa PSS sólo utiliza la glucosa para

su crecimiento y como resultado del metabolismo produce ácido, que no inhibe el crecimiento del hongo, por lo que no es un sustrato para obtener metabolitos con fines fitosanitarios.

Por otra parte, estudios realizados por Duffy & Défago (1999), plantean que la producción de sideróforos como el piochelin es incrementada en medios con glucosa como fuente de carbono, así como, el ácido salicílico por glicerol y glucosa, afirmando que la fuente de carbono juega un papel importante en la obtención de dichos metabolitos. Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron los mejores resultados con ácido glutámico y glicerol, coincidiendo ambos medios con los resultados obtenidos en la producción de metabolitos antibióticos tal como se observa en la Fig. 2, donde se llega a alcanzar una inhibición del crecimiento micelial del hongo *A. Alternata* del 75-65% respectivamente.

Al realizar el análisis de varianza de los resultados (ANOVA), se comprobó que en la producción de metabolitos antibióticos, influye significativamente la fuente de carbono empleada, para un 99% de confianza (Datos no mostrados).

Según el test de Duncan, las fuentes de carbono muestran diferencias significativas, donde los medios glutámico y glicerol, registran los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo *A. alternata* (Tabla 4) (Fig. 2).

Tabla 4. Resultados del Test de Duncan entre la influencia de la fuente de carbono sobre la producción de metabolitos antibióticos.

Fuentes de Carbono	Medias	Grupos
Glutámico	75.3	a
Glicerol	65.5	a
Lactosa	35.3	b
Sacarosa	35.3	b
Maltosa	32.6	b
Biopla	32.6	b
Almidón	31.3	b
Soya	28.6	b
Glucosa	10.6	c

(n= 3)($\alpha= 0.05$) (Letras iguales no difieren significativamente)

Entre los factores que incrementan la producción de metabolitos sideróforos y antibióticos está el suplemento de aminoácidos al medio, encontrando que el ácido glutámico es una de las fuentes de carbono más empleadas al aportar carbono y nitrógenos al medio (Frias, 2003; Slininger & Shea Wilbur, 1995; Casida, 1992).

En términos regulatorios, la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios es positivamente controlada por el sistema de dos componentes GacS/GacA (Heeb & Haas, 2001). Este sistema de regulación consiste en una proteína sensor quinasa alrededor de la membrana (GacS) y una proteína reguladora de la respuesta citoplasmática (GacA). El modelo propuesto es que GacS reconoce una estimulación ambiental específica y activa a GacA disparando la expresión del gen específico (Pernestig *et al.*, 2001; Appleby *et al.*, 1996). Muchos elementos pueden estar involucrados en la regulación de genes para la biosíntesis de antibióticos, formando un complejo regulatorio en cascada, con el par *gacS/gacA* ejerciendo control a alta jerarquía (Blumer & Haas, 2000; Chancey *et al.*, 1999; Sarniguet *et al.*, 1995). Se ha reportado que las mutaciones en *gacS* o *gacA* eliminan la producción del 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pioluterion (PLT), pirrolnitrin (PRN) y fenacina (PHZ) (De Souza & Raaijmakers, 2002).

Finalmente, es conocida la gran versatilidad metabólica que presenta el género *Pseudomonas*, que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono sustratos muy variados para la producción de compuestos antimicrobianos, por ejemplo: trabajos realizados por Shanahan *et al.* (1993), observaron que la síntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol en *Pseudomonas* sp. cepa F113, fue estimulada por manitol o sacarosa, pero no por glucosa. Otros autores plantean que la síntesis de pioluterin por *P. fluorescens* Pf-5, está disminuida en presencia de glucosa y en *P. fluorescens* HV-37^a, la producción de oomicina está presente cuando la glucosa es la fuente de carbono (Kraus & Loper, 1995). Sin embargo, Alstrom (1987) y James & Gutterson (1986), plantearon que los microorganismos frecuentemente prefieren una fuente de carbono específica para la producción de un metabolito secundario en particular.

En este estudio con la cepa *P. aeruginosa* PSS, se demostró la influencia significativa que ejerce la fuente de carbono en la síntesis de metabolitos antimicrobianos tales como sideróforos y antibióticos, donde los mejores resultados fueron obtenidos con los medios glicerol y glutámico. Todo lo cual brinda una alternativa importante en la obtención de medios de producción de metabolitos más económicos.

REFERENCIAS

- Alemaný J (2002) Caracterització de metabòlits produïts per soques de "*Pseudomonas fluorescens*" efectives en el control biològic de fongs fitopatògens. Tesis de grado de Doctor en Ciències. Universitat de Girona. España.
- Alstrom S (1987) Factors associated with determinant effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant Soil*. 102: 3-9.
- Appleby JL, Parkinson JS & Bourret RB (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845-848.
- Bagnasco P, De La Fuente L, Gualtieri G, Noya F & Arias A (1998) Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1317-1322.
- Blumer C & Haas D (2000) Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Microbiol.* 146: 2417-2424.
- Budzikiewicz H (1997) Siderophores from fluorescent *Pseudomonas*. In: Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman B.V (ed), Vol. 19, Elsevier Science, pp. 793-835.
- Casida LEJR (1992) Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2 a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 32-37.
- Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Banger G & Kim DS (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4197-4201.
- Chancey ST, Wood DM & Pierson III LS (1999) Two-component transcriptional regulation of N-acyl-

- homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2294-2299.
- De Souza JT, Weller DM & Raaijmakers J (2003) Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in dutch take-all decline soils. *Phytopathol.* 93: 54-63.
- De Souza JT & Raaijmakers JM (2002) Polymorphisms within the *prnC* and *pltD* genes of pyrrolnitrin and pyoluteorin producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 21-34.
- Díaz de Villegas ME (1999) Evaluación de la producción de sideróforos por cepas de *Pseudomonas* spp. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Doudoroff M & Palleroni NJ (1984) Gram-negative aerobic rods and cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Part 7. Eight Edition. Cowan ST, Holt JG, Liston J, Murria RGE, Niven CF, Ravin AW & Stanier RY (Eds). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 217-223.
- Duffy BK & D'efago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.
- Duffy BK & D'efago G (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium crown* and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathol.* 87: 1250-1257.
- Fernández Y (1998) Evaluación de diferentes medios para la producción de metabolitos secundarios a partir de dos cepas de *Pseudomonas* sp. Trabajo de grado de Licenciada en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Frias A (2003) Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en la síntesis de metabolitos antimicrobianos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS y su aislamiento. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Frías A (1997) Evaluación de diferentes factores que influyen en la producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas fluorescentes* para su uso en el control biológico. Trabajo de grado de Licenciada en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Gutterson N (1990) Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanism. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 69-91.
- Heeb S & Haas D (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1351-1363.
- Howie WJ & Suslow TV (1991) Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399.
- James DW & Gutterson NI (1986) Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37 and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1183-1189.
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kraus J & Loper JE (1995) Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 849-854.
- Leeman M, Den Ouden FM, Van Pelt JA, Dirks FPM, Steijl H, Bakker PAHM & Schippers B (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* 85: 149-155.
- Lehninger AJ (1981) Rutas metabólicas y de transferencia de energía. Panorámica del metabolismo intermediario. En Bioquímica. Capítulo 14 (Edición Pueblo y Educación) Ciudad de La Habana, Cuba., pp. 371-392.
- Meyer JM & Abdallah MA (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*. Biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Nowak-Thompson BS, Gould J, Kraus J & Loper JE (1994) Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by

- the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.* 40: 1064- 1066.
- Ownley BH, Weeler DM & Thomashow LS (1992) Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* 82: 178-184.
- Pérez CN (2004) Control biológico de patógenos vegetales. *En: Manejo Integrado de Plagas.* García Marrero A (ed). Editorial CEDAR, Cuba., pp. 231-354.
- Pernesting A-K, Melefors O & Georgellis D (2001) Identification of *uvrY* as the cognate response regulator for the *barA* sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 225-231.
- Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM & Loper JE (1995) The sigma factor σ^s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12255-12259.
- Shanahan P, Glennon JD, Crowley JJ, Donnelly DF & O'Gara F (1993) Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. *Anal. Chim. Acta* 272: 271-277.
- Slininger PJ, Van Cauwenberger JE, Bothast RJ, Weller DM, Thomashow LS & Cook RJ (1996). Effect of growth culture physiological state, metabolites, and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 391-398.
- Slininger PJ & Shea-Wilbur MA (1995) Liquid-culture, pH, temperature and carbon (not nitrogen) source regulated phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 994-800.
- Stefanova M, Muiño B, Espino M & Pérez I (1995) Efecto de un biopreparado de *Pseudomonas* sp. sobre patógenos foliares en tabaco, papa, tomate y pimiento. *En: Avances en biotecnología moderna II.* Arrieta J (ed). Editorial Elfos Scientiae. Habana' 95, Cuba., p. 37.
- Stryer L (1995) Bioquímica. Cuarta Edición, Tomo II. Capítulo 24. Editorial Reverté S.A. Barcelona., pp. 606-607.
- Thomashow LS & Weller DM (1998) Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170: 3499-3508.
- Torres L, Pérez-Orten JE, Tordera V & Beltrán JP (1986) Isolation and characterization of an Fe(III)-chelating compound produced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 157-160.
- Villa P, Alfonso I & Frías A (2002) Efectividad del producto biológico GLUTICID en el control de hongos fitopatógenos *Curvularia senegalensis* y *Curvularia gudauskasii* que atacan las semillas botánicas de la caña de azúcar. *Memorias de Diversificación 2002.* Tomo I Roselló S, Infante L, Martín A & García A (eds). Editorial ICIDCA, Cuba., pp.114-118.
- Villa P, Diaz de Villegas ME, Stefanova M & Michelena G (2001) Proceso biotecnológico para la producción de un fungicida a partir de *Pseudomonas* sp, cepa PSS. *Primer Concurso Latinoamericano en Innovación de tecnologías ecológicas para el agro.* Gomero L & Tazza M (eds). Lima, Perú., pp.64 -74.
- Villa PM (1999) Producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas* fluorescentes para su uso en el control biológico de hongos fitopatógenos. Tesis de grado de Máster en Microbiología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Villa P, Díaz de Villegas ME, Stefanova M & Zayas O (1995) Obtención de un biopreparado efectivo contra hongos fitopatógenos a partir de *Pseudomonas* sp. cepa PSS como agente de control biológico. *Avances en Biotecnología Moderna II.* Arrieta J (ed). Editorial Elfos Scientiae, Habana' 95, Cuba., p. 41.



**La Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería, A.C**

Invita al

**XII Congreso Nacional de
Biotecnología y Bioingeniería**

**Que para celebrar nuestro
XXV aniversario
se llevará a cabo del
25-29 de junio de 2007
en Morelia, Michoacán.**



Mayores informes en:
www.smbb.com.mx



Índice

EDITORIAL	2
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	3

Artículos

LACTOBACILOS PROBIÓTICOS: SUSTANCIAS NATURALES BIOACTIVAS PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES UROGENITALES	6
EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN POSTCOSECHA EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MIEL DE <i>Tetragonisca angustula</i> LATREILLE, 1811	14
TRANSGLUTAMINASAS: DE IMPORTANTE FUNCIÓN FISIOLÓGICA EN LOS SERES VIVOS AL DESARROLLO NOVEDOSO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS	21
EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE DNA CONTRA LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA PAROTIDITIS HUMANA (MuV)	28
IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE ROTAVIRUS BOVINO PREVALECIENTES EN MÉXICO COMO HERRAMIENTA PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE	34
METABOLITOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PSS: INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA SÍNTESIS	42