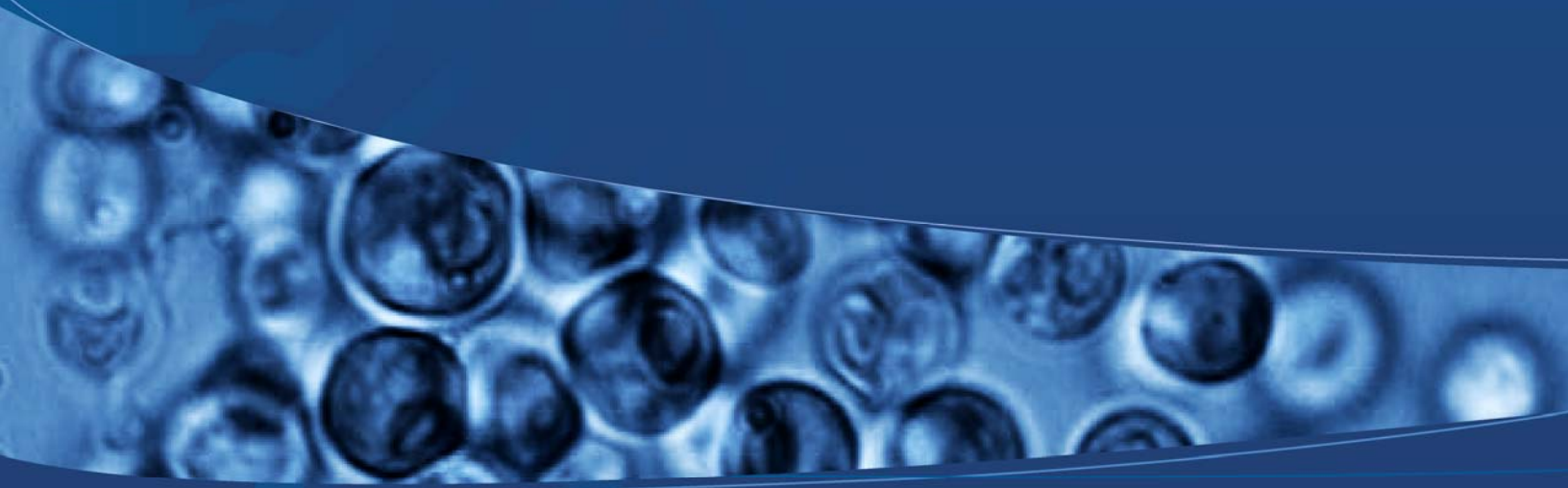


Revista de la Sociedad Mexicana de
BioTecnología
y Bioingeniería A.C.



Año 2009 Volúmen 13 Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de **BioTecnología** y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Presidenta

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
VicePresidente

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Secretaria

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
Tesorera

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia
Subsecretaria

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Vocal

I.A. Alaide Jiménez Serna
Vocal Estudiante

COORDINADOR EDITORIAL

Lic. Claudia Elydeé Cardeña Medina

FORMACION EDITORIAL

Lic. Claudia Elydeé Cardeña Medina

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Editor en Jefe
Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAMI

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

Lic. Nayeli Quinto (**SODIO NET**)

ADSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

Lic. Claudia Elydeé Cardeña Medina
Tel./Fax: (55) 5849 5859
Email: smbiotec@yahoo.com.mx

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. 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. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares.

Índice

Editorial 4

Instrucciones para autores 7

ARTÍCULOS

**Desarrollo de un Sistema Semi-paralelo de 16 Electrodo
para la Detección de Tejidos Cancerosos en Modelos
Eléctricos Empleando Métodos de Impedancimetría** 23

**Microorganismos y Virus: Herramientas Clave para el
Desarrollo de Vacunas** 37

**Estudio de la Conservación del Aceite de Amaranto
Utilizando Diversos Antioxidantes** 41

LA COMUNIDAD CIENTÍFICA SE CUBRE DE LUTO E INDIGNACIÓN.

Enrique Galindo Fentanes y Agustín López Munguía
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

El martes 27 de enero parecía un día común y corriente en la vida del Doctor **Christopher Augur**. Se encontraba una vez más en su querido México, en la UAM Iztapalapa en la que trabajó por más de 8 años comisionado por el IRD (Instituto de Investigaciones para el Desarrollo) un organismo francés para la investigación, y entre sus entrañables colegas del Departamento de Biotecnología de la UAM Iztapalapa con los que desde 1996 había establecido una relación de trabajo académico, de ese que no sólo permite publicar artículos científicos, sino al mismo tiempo entusiasmar a los estudiantes y entrenarlos en el uso del conocimiento científico en la solución de problemas apremiantes de diversos sectores del país. Dentro de los diversos proyectos que **Christopher** abordó, destaca el del procesamiento del café y más recientemente el de la problemática que representa el crecimiento descontrolado del lirio acuático, el quinto problema más grave a escala global en materia de gestión de agua.

Crear un grupo de investigación, proveerlo de infraestructura y consolidarlo con un conjunto de académicos suficientemente bien preparados como para poder contribuir al desarrollo de un tema particular de la ciencia, es una labor que toma años y muchos esfuerzos, aun en los casos en los que existe un decidido apoyo a nivel nacional. No hay muchos de estos en nuestro país, aunque ese no es el tema de esta nota. El hecho es que los hay, y que cuando estos grupos están comprometidos en la formación de recursos humanos y al mismo tiempo en abordar problemas de relevancia nacional, se crean condiciones idóneas para que espíritus como el de **Christopher Augur** florezcan. Es el caso de la comunidad biotecnológica de la UAM Iztapalapa donde **Christopher** se encontró con una herramienta: los procesos microbianos en medio sólido como tema central de investigación aplicada; encontró estudiantes ávidos de conocimiento y de deseos de contribuir a mejorar las condiciones de su país, y finalmente encontró colegas, que en muchos casos fueron también amigos, amigos que abrieron espacios para que la colaboración trascendiera lo académico y se convirtiera también en una red de complicidades para trabajar por los demás, y haciéndolo, ¿por qué no?, disfrutando la vida. **Christopher** era un académico que amaba su trabajo como amaba la buena cocina, el buen vino y

Editorial

el mejor ingrediente para ambos, el compartirlo con los amigos. Como un reflejo de su personalidad y su amor por la naturaleza, bastaría con destacar su pasión por las orquídeas.

Christopher nació en 1960 en la ciudad de Jhasi, en la India; de ascendencia angloindia, creció y se educó en Francia, país del que era ciudadano. En su tesis de doctorado trabajó sobre azúcares complejos que sirven de señal a las plantas para defenderse de infecciones microbianas, esto en el Centro de Investigación sobre Carbohidratos Complejos, afiliado a la Universidad de Georgia, en el campus de Atenas. Caminó por todo el mundo, Japón, la India, Australia, Holanda, Israel, Brasil, EUA, y desde luego México, donde desarrolló más de la mitad de su obra científica, trabajando sobre catalizadores biológicos, fermentación sólida, procesamiento del café, y en plantas del desierto de Coahuila, siempre estableciendo redes de colaboración con colegas, pero también aprendiendo recetas y degustando vinos.

El martes 27 de enero, los pasos de **Christopher** se cruzaron con otra red. Una red de maldad y de ignominia, de esas que se han establecido en nuestro país; de esas que no construyen, sino arrebatan. Arrebatan vidas, lo mismo de niños, de ancianos que de científicos, aprovechando su fragilidad, nuestra fragilidad. El individuo que disparó a **Christopher**, cuyo nombre no amerita ser citado en este espacio, fue detenido unos días después. Eso parece. Qué bien por la justicia; pero mínimo consuelo ante tan descomunal pérdida. Mínimo consuelo para su compañera, sus familiares, sus estudiantes, sus amigos y sus colegas, y para sus orquídeas. El Dr. **Gustavo Viniegra** le daba un adiós en una sentida ceremonia el pasado martes 3 de febrero en la UAM Iztapalapa, un adiós centrado en la descripción de su carácter y de su obra científica. **Christopher**, señalaba **Gustavo**, era de carácter jovial, de excelente buen humor y de mirada inquieta a la vez que tierna, de temperamento fuerte y decidido; veraz y honesto. Todo esto resuelto en sonrisas. Ya descansa en paz en Beaugency, una bella región del centro de Francia, a las orillas del Loira y cerca de sus seres queridos, a quienes abrazamos en su desconsuelo.

Aún leyendo estas líneas, el individuo que cegó su vida, no sería capaz de imaginarse lo que destruyó. No sabe como es una orquídea, ni tampoco le debe preocupar el problema que representa el lirio acuático o la contaminación ambiental; imposible imaginarlo reflexionando sobre como mejorar la vida de quienes trabajan en el procesamiento del café en México o en Centroamérica. Le debe parecer incomprensible que alguien dedique su vida a educar a los demás, que sea generoso, ofrezca su morada, comparta sus alimentos, y sus flores. Quienes lo

Editorial

conocieron saben que en el colmo de las paradojas, **Christopher**, o “**La Fundación Augur**” como él solía decir habría compartido con su verdugo, en otras circunstancias, los billetes que le costaron la vida. El atroz homicida tampoco es capaz de imaginar lo que sus balas no pueden destruir. Esto, entre una infinidad de cosas más, es su desgracia. Acabó con la frágil existencia de **Christopher Augur**, pero no con su espíritu, al que por el contrario, engrandeció; nos hizo cerrar filas, renovar afectos y solidaridades; agregó entusiasmo a las generaciones de estudiantes que formó para seguir su ejemplo y para no claudicar ante la desgracia y el sin sentido de acciones como esta. En todos los que fueron cercanos a su corazón, se aloja ya una dulce melancolía que acompañará sus vidas cada vez que encuentren la sonrisa de **Christopher** dispersa entre los colores y las caprichosas formas de las orquídeas.

Pero es importante concluir señalando que en el espíritu de nuestra comunidad hay también una infinita indignación. La mesa Directiva y los ex-presidentes de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, pagaron una inserción para poder decirle al país a través de la prensa: ¡ya basta! ***“No permitamos que nos roben la esperanza de poner el saber al servicio de todos. La comunidad científica relacionada con la Biotecnología, agremiada en su mayoría en esta asociación, se une al reclamo de las muchas voces de la sociedad mexicana que se han levantado y esperan que se detengan tantos agravios criminales que se sufren en nuestro país”.***

Los miembros de la comunidad científica agrupados en la Academia de Ciencia de Morelos, nos unimos a este reclamo y a las numerosas voces que en este país buscan poner un freno a la impunidad y a la violencia. Estamos comprometidos en la construcción de una sociedad donde prevalezca la verdad y la justicia, una sociedad basada en valores y conocimiento, trabajando cotidianamente con lo más noble de ella: su juventud. Nos solidarizamos también con nuestros colegas de la UAM Iztapalapa y les enviamos un fraternal abrazo. El espíritu de **Christopher Augur** contribuirá sin duda a darnos ánimo en esta tarea y permanecerá entre nosotros en esa su “Casa Abierta al Tiempo”.

Texto publicado en el diario La Unión de Morelos de Cuernavaca, Mor. el lunes 16 de febrero de 2009 (Año 15 No. 5446), como un mensaje de la Academia de Ciencias de Morelos A.C.

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan entre 5 y 15 páginas (de 1000 a 4000 palabras) escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de **Resultados y Discusión** pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.
2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería

Instrucciones para los autores

genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.
5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.
6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apearse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente pero de

Instrucciones para los autores

tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.
3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.
4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave**: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words**:).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente de tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente de tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.
7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribiera como sigue: “Gutiérrez *et al.* (2003), han demostrado....” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2003) han mostrado...” Si la cita es es una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá

Instrucciones para los autores

escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Para revistas:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB)*. Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Para patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Para congresos y reuniones: *Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.*

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus* HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Para citas provenientes de internet: *Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.*

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* 8: R182.

Para tesis de pre y posgrado:

Instrucciones para los autores

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la Producción de safranal. Tesis de Maestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico en la dirección smbiotec@yahoo.com.mx. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>. La publicación en línea precederá a la publicación impresa.

Desarrollo de un Sistema Semi-paralelo de 16 Electrodo para la Detección de Tejidos Cancerosos en Modelos Eléctricos Empleando Métodos de Impedancimetría

Mario Castro ^{*}1, Miguel Ángel Aguillón ¹, Adrián Martínez ².

¹Laboratorio de Bioingeniería, ²Laboratorio de Neurofisiología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Calzada México-Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, México, D.F., C.P. 14370. E-mail: castrog@imp.edu.mx

Palabras clave: impedancia, semi-paralelo, fantom, inyección polar.

RESUMEN

Se ha desarrollado un sistema semi-paralelo de 16 electrodos para la detección de tejidos cancerosos en modelos eléctricos (fantom) empleando métodos de impedancimetría, con el objetivo de tener un método de diagnóstico no invasivo, sencillo de utilizar y de bajo costo. Este sistema consta de un generador de onda sinusoidal a 100 kHz. y una fuente de corriente constante de 1.5 mA., que es conmutada a 16 electrodos de inyección, en varios modelos que fueron construidos, basados en las propiedades eléctricas de tejidos biológicos, uno simula un tejido completamente sano (homogéneo) y en otro fueron introducidos cambios en su impedancia simulando áreas cancerosas (heterogéneo). La reconstrucción se realizó por medio del método de retroproyección y visualizadas con el sistema de procesamiento de datos Khoros a través de Cantata, un lenguaje visual de flujo de datos expresado gráficamente, el cual provee un ambiente de programación visual dentro del sistema Khoros. Nuestros resultados muestran que la mejor estrategia es la de inyección polar y tomando 2000 muestras de cada punto de adquisición para su amplificación, rectificación y conversión A/D, formándose así una matriz de 16x16 para la reconstrucción de la imagen. Se visualizaron cada uno de los modelos en distintos mapas de colores para una comparación con sus respectivos modelos físicos.

Key words: impedance, semi-parallel, fantom, polar injection.

ABSTRACT

A semi-parallel system of 16 electrodes for the cancerous tissues detection in electrical models (fantom) has been developed using impedancimetry methods, like method of alternative diagnosis non-invasive, simple to use and of low cost. This system consists of a generator of sine wave to 100 kHz. With a source of constant current of 1.5 mA., that is exchanged to 16 electrodes of injection, in several models that were constructed, based on the electrical biological weave properties, one simulates a

healthy weave completely (homogenous) and in another one cancerous areas were introduced changes in their impedance simulating (heterogenous). The reconstruction was processed by the method of backprojection and visualized with the system of data processing Khoros through Cantata, a visual language of data flow expressed graphically, which provides an atmosphere with visual programming within the Khoros system. Our results show that the best strategy is of polar injection and taking 2000 samples from each point of acquisition, for its later amplification, rectification and conversion A/D, forming therefore a matrix of 16x16 for the reconstruction of the image. Each one of the models in different color maps for a later comparison with their respective physical models were visualized.

INTRODUCCIÓN

La impedancimetría o la Tomografía por Impedancia Eléctrica (TIE) es una técnica para formar imágenes del interior de un objeto o del cuerpo, basado en mediciones hechas por electrodos colocados en la superficie del mismo. Pequeñas corrientes eléctricas son aplicadas al objeto en estudio a través de un arreglo de electrodos, estos son utilizados en la medición de voltaje. Algoritmos computacionales son usados para la reconstrucción de imágenes sobre la distribución de las impedancias eléctricas del interior del mismo. Debido a que los diversos órganos de nuestro cuerpo están conformados por distintas propiedades eléctricas, las imágenes resultantes a partir de las impedancias internas del mismo pueden permitirnos hacer un análisis anatómico, además de que algunos tejidos varían su impedancia de acuerdo con su funcionalidad. Estos tipos de cambios en las propiedades eléctricas pueden dar información sobre la función de un órgano, tal como lo puede ser el bombeo de sangre del corazón.

Las imágenes creadas por TIE son de baja definición y reproducen pequeños detalles anatómicos. Esto es porque el problema de

resolución en TIE es considerablemente más complejo y difícil, que la reconstrucción de imágenes por resonancia magnética, por rayos X, etc. La razón de esta complejidad es el flujo de corrientes que atraviesan el cuerpo por muchas rutas, además de que la densidad de corriente fluye por la ruta de menor impedancia. Por lo tanto los algoritmos de reconstrucción deben de considerar estas rutas de corrientes como desconocidas. A pesar de estas dificultades se reconocen las imágenes formadas, y estudios clínicos han ido determinando lo conveniente de la técnica. Comparándolo con otras técnicas de obtención de imágenes médicas, TIE ofrece varias ventajas: los instrumentos son ligeros, portátiles y pueden ser usados a un lado de la cama, es relativamente barato y no requiere habilidades especiales por parte del operador. La impedancia eléctrica es una modalidad que ofrece información que no está disponible por las otras técnicas, como lo es el conocimiento de la impedancia de tejidos específicos.

El objetivo general de este trabajo es la obtención de un prototipo para la Tomografía por Impedancia Eléctrica (TIE) de uso en la detección de tejidos dañados (cancerosos) y que se disponga de un documento de referencia para plantear otras alternativas.

Análisis de estructuras eléctricas sencillas

El primer objeto que analizamos es el disco conductor por adaptarse a la geometría que se pretende medir al hacer una tomografía de impedancias. De hecho, un cilindro se adapta mucho mejor a la situación real de medidas en seres humanos, pero la complejidad es un poco mayor (Barber & Brown, 1986, Barber & Seagar, 1987, Gisser *et al.*, 1987, Seagar *et al.*, 1987). Pero se realiza una aplicación algebraica para el caso homogéneo, comparándolo posteriormente con un caso sencillo no homogéneo.

La solución algebraica obtenida por el método de separación de variables para un disco conductor de radio R_0 y conductividad σ_0 , cuando la inyección de corriente a lo largo de toda la periferia $I(\theta)$ es antisimétrica respecto al eje X es (Fig. 1):

$$\Phi(r, \theta) = \sum_{n=1}^{\infty} C_n r^n \text{sen} n\theta \quad (1)$$

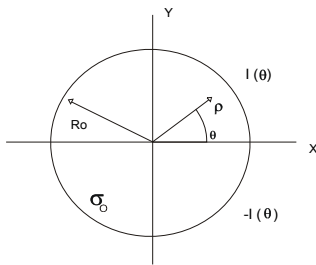


Fig. 1. Disco conductor

Los coeficientes C_n están determinados por las condiciones de contorno a través de:

$$-\sigma_0 \frac{\delta\phi(r, \theta)}{\delta n} = I(\theta) \quad (2)$$

Para $r=R_0$ siendo n la normal a la superficie.

Si desarrollamos $I(\theta)$ en serie de Fourier, y como se ha impuesto la condición de simetría respecto a $\theta=0$, se obtiene:

$$-\sigma_0 \sum_{n=1}^{\infty} C_n n R^{n-1} \text{sen} n\theta = \sum_{n=1}^{\infty} I_n \text{sen} n\theta \quad (3)$$

Donde:

$$I_n = \frac{2}{\pi} \int_0^{\pi} I(\theta) \text{sen}(n\theta) d\theta \quad (4)$$

Por lo cual

$$C_n = \frac{I_n}{\sigma_0 n R^{n-1}} \quad (5)$$

Siendo la solución para el potencial:

$$\Phi(r, \theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{I_n r^n}{\sigma_0 n R^{n-1}} \text{sen} n\theta \quad (6)$$

Los voltajes en la periferia vendrán dados por:

$$V(\theta) = \phi(R_o, \theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{I_n R_o}{\sigma_o n} \text{sen } n\theta \quad (7)$$

Cuando el disco incluye una zona central de conductividad distinta (Fig. 2), es fácil deducir, por el método de separación de variables e imponiendo las condiciones de contorno en la frontera entre los dos medios de distinta conductividad, por lo tanto, la expresión del potencial en el contorno es:

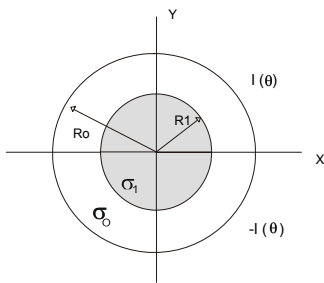


Fig. 2. Disco conductor con una zona central de distinta conductividad.

$$V(\theta) = \phi(R_o, \theta) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{I_n R_o}{\sigma_o n} \frac{1 + \mu R^{2n}}{1 - \mu R^{2n}} \text{sen } n\theta \quad (8)$$

Donde:

$$R = \frac{R_1}{R_o} \quad \mu = \frac{c-1}{c+1} \quad c = \frac{\sigma_1}{\sigma_o} \quad (9)$$

A partir de estas dos ecuaciones del potencial en el contorno (8, 9) se puede observar que la información estructural es la contenida en la expresión:

$$\frac{1 + \mu R^{2n}}{1 - \mu R^{2n}} \quad (10)$$

La ecuación (8) la podemos interpretar como el producto de la transformada de

Fourier angular de la corriente por la información "estructural". Al considerar la periodicidad angular de las corrientes en la periferia, la transformada es una serie discreta.

En la ecuación (10), al ser $R < 1$ la alteración más importante del potencial de contorno se dará $n=1$, que puede interpretarse como la frecuencia angular fundamental de la inyección de corriente establecida por las condiciones de contorno.

Obsérvese que para un caso tan sencillo como éste, para conocer cuál es el radio y la conductividad de la zona central es necesario poder medir, como mínimo, el efecto para dos de las componentes de la frecuencia angular ($n=1, n=2$).

Cuando la inyección de corriente se realiza a través de dos electrodos puntuales, se puede resolver el problema directo utilizando una transformación conforme (Barber & Seagar, 1987). Para un disco tangencial al eje X e inyección de corriente por los puntos de la abscisa $x=a$ y $x=-a$, la transformación apropiada, para pasar del plano $x-y$ al $u-v$, es:

$$u + jv = \frac{\ln(x + jy + a) + \ln(x + jy - a)}{2a} \quad (11)$$

Cuando a tiende a cero, electrodos infinitamente juntos, la transformación es: $u + jv = 1/(x + jy)$. Esta transformación es utilizada frecuentemente, por su sencillez, para obtener la solución del problema directo (Rosell J, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo electrónico

La parte básica del sistema esta integrado por el circuito ICL8038 de INTERSIL, el cual genera una señal sinusoidal de 100 kHz., capaz de proporcionar una corriente máxima efectiva de 1.5 mA. En nuestro caso sólo aplicamos 800 μ A. que es controlada por una fuente de corriente constante, la cual es demultiplexada a través de dos circuitos de 1:16 canales analógicos (CD4067B-Texas Instruments), posteriormente adquirir los voltajes desarrollados. El software que tenemos nos provee de un control total de los puntos de inyección, permitiéndonos inyectar esta corriente de diferentes maneras: método polar, método de los vecinos, entre otras.

Fantom: modelos de simulación

En este trabajo se incluye el desarrollo de dos modelos que simulan las propiedades eléctricas de tejidos sanos y cancerosos, utilizando circuitos RC de montaje de superficie (Kejariwal & Kaster, 1993). Cada una de las ramas que componen el modelo de tejido, esta formado por un elemento resistivo y un elemento capacitivo conectados en forma paralela (RC), tal como se muestra en la Fig. 3.

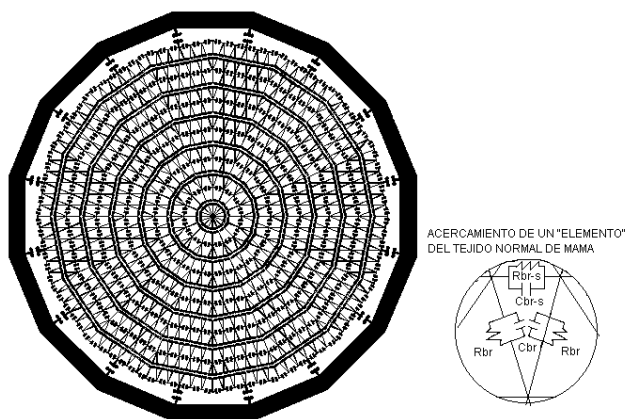


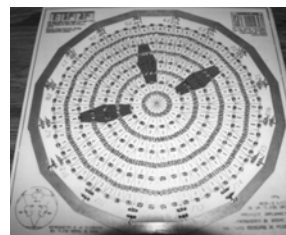
Fig. 3. Modelo de prueba.

Se construyó un modelo totalmente homogéneo, como el que se muestra en la figura 4a. Este modelo consta de 256 elementos triangulares, los cuales tienen los mismos valores RC en toda el área del modelo. Cada uno de estos elementos triangulares forman el 0.39% del área total del modelo.

Así mismo se construyó otro modelo en el cual se introdujeron cambios en los valores RC en tres áreas distintas, como se puede apreciar en la Fig. 4b. El área que representa una de estas tres partes es del 2.34 % del área total del modelo.



a)



b)

Fig. 4. En (a) se muestra el modelo homogéneo y en (b) el modelo heterogéneo

Rectificación y condicionamiento de señales

La rectificación y condicionamientos de las señales fueron hechas en paralelo por medio de 16 amplificadores (LF347 National Instrument) y de 16 rectificadores de media onda que detectan, amplifican y rectifican los voltajes en todos los puntos de medición.

Conversión A/D

Para realizar la conversión A/D, se utilizó una tarjeta comercial (PCL-812PG) con 12 bits de resolución y un tiempo de conversión de 35 μ s. El promedio de muestras fue de 2000 por cada punto de lectura a una velocidad de muestreo de 16 kHz. El sistema eléctrico completo se muestra en la Fig. 5.

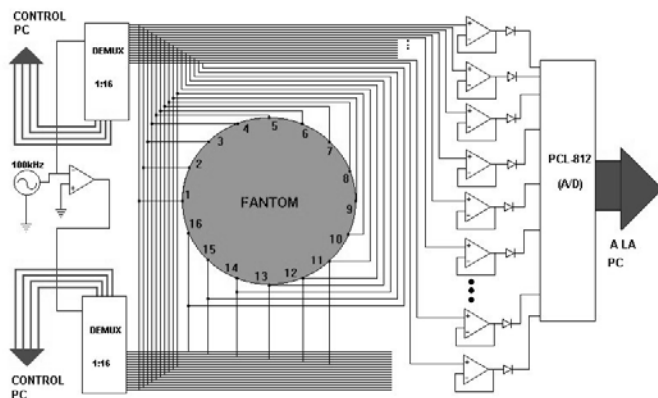


Fig. 5. Sistema eléctrico semi-paralelo

Adquisición, procesado y presentación de datos

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

Señal de entrada:

- Señales de corriente continua (C.D.)
- Rango de voltaje de 0-10 Voltios.
- Nivel de ruido: 12mV p-p.

No. de canales: 16

Método de inyección de corriente: Polar

Método de lectura de voltaje: Referencial (sentido anti-horario)

Se programó un algoritmo que controla la selección del par de electrodos que inyectan la señal de corriente constante en los 16 pares posibles, para proceder a la adquisición secuencial de los voltajes en los puntos de colocación de los electrodos.

Usando los 16 canales analógicos de entrada y configurando la tarjeta (PCL812) se logró una adquisición A/D a 16 KHz. de muestreo por canal para la medición de los potenciales en los electrodos de adquisición. Además de utilizar y programar 4 salidas digitales para seleccionar el canal de drenado de corriente y 4 salidas digitales más para seleccionar el canal de inyección de corriente.

Método de reconstrucción

El objetivo del método de reconstrucción es obtener una distribución de impedancia, en la sección del cuerpo que se está estudiando, que sea coherente con las medidas realizadas. En principio hay una limitación teórica: sólo se dispone de M medidas y no existe ningún conocimiento previo del objeto, por lo que se podrá estimar M variables independientes. Si N es el número de electrodos, las medidas independientes serán: $N*(N-1)/2$, ya que de todas las agrupaciones posibles de los N electrodos en pares ($N*(N-1)$) sólo son independientes la mitad, según se desprende del teorema de la reciprocidad (Lehr, 1972).

Por ejemplo, para 16 electrodos el número de medidas independientes posibles es de 120, por lo cual solo se podría conocer la conductividad de 120 subdivisiones del objeto (pixels). Además, para el caso de inyección por electrodos adyacentes, hay dos medidas que son a dos hilos y se desprecian. Por lo cual, las medidas independientes serán 104. Esta limitación generalmente se supera gracias un conocimiento previo del objeto, como por

ejemplo el hecho de que no existan cambios bruscos de impedancia o se aleje lo menos posible de una distribución uniforme.

Métodos de retroproyección

El método de retroproyección entre líneas equipotenciales (Barber & Brown, 1987) se basa en la aproximación lineal de la ecuación de Poisson para pequeñas variaciones de la resistividad respecto a una distribución conocida. El sistema lineal es el siguiente:

$$\nabla^2 U_p = \nabla R \cdot \nabla U_u \quad (12)$$

Donde U_p es el potencial conocido para la conductividad inicial. U_u es la perturbación de este potencial y R es el logaritmo neperiano de la conductividad. El problema de este método es que sólo se conoce el gradiente del potencial (∇U_u) en la superficie. La cantidad que se retroproyecta entre cada par de electrodos siguiendo la zona equipotencial esta definida por (ver Fig. 6a):

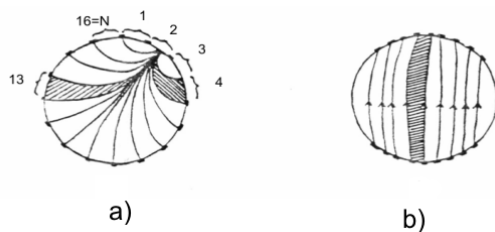


Fig. 6. Métodos de retroproyección: (a) líneas equipotenciales y (b) líneas de corriente (Barber *et al.*, 1987).

$$\Delta\sigma = \log(U_u / U_p) \quad (13)$$

La reconstrucción por retroproyección es muy rápida pues no requiere de gran potencia de cálculo. Existe una mejora de este método basado en una iteración a partir del error de reconstrucción, calculado mediante la matriz de sensibilidades (Santosa & Vogelius, 1988).

Algoritmo

Posterior a la configuración de la tarjeta, el procedimiento de control de selección, activación de los canales de inyección y adquisición de los potenciales a medir, se organizó una estructura iterativa en donde cada iteración realiza los siguientes procesos:

- a) Selección de los electrodos de inyección de corriente mediante el uso de las primeras 8 salidas digitales, que están a su vez conectadas a los multiplexores analógicos del prototipo.
- b) Pausa de tiempo de 450 milisegundos para esperar a que desaparezca el transitorio debido a la conexión de la fuente de corriente con el modelo eléctrico de prueba.
- c) Inicio el proceso de adquisición de los potenciales referenciales en los 16 electrodos (sentido anti-horario), a una tasa de muestreo de 16 kHz. por cada canal a la vez.
- d) Filtrado de ruido. Para minimizar el ruido que contiene la señal, se toma un total de 2000 muestras por punto de lectura (electrodo), para la obtención del promedio aritmético de las mismas y al final poder convertir a su correspondiente valor de voltaje.
- e) Por último los 256 datos de voltaje filtrado se registran en un archivo ASCII agrupados a manera de una matriz de

Artículos

tamaño 16x16 para pasar a su análisis y reconstrucción.

El algoritmo fue programado en C++ y está constituido de 3 funciones importantes: 1) función principal de control general, 2) función de configuración de la tarjeta y 3) función de control de inyección y adquisición las señales.

Estructura de datos

Las medidas adquiridas se almacenan en matrices de 16x16 enteros (Tabla 1). Las filas corresponden a cada una de las inyecciones efectuadas y las columnas a las salidas de los electrodos de detección de voltaje en los 16 electrodos. De estas matrices, se generan todos los datos: valores a retroproyectar para la reconstrucción de la imagen.

Tabla 1. Datos adquiridos de voltaje que forma una matriz de 16X16.

9.996	5.6744	3.4118	2.3158	1.9021	1.3648	1.1182	0.8705	0.2961	0.8193	1.1015	1.4043	1.6560	2.2721	3.3206	6.1369
7.0613	9.996	7.2219	4.4863	3.4075	2.4472	1.9979	1.7470	1.7501	0.3463	1.4181	1.8067	1.9931	2.4178	3.0076	4.2730
4.2845	7.3776	9.996	8.0519	4.5770	2.9766	2.2679	1.8711	1.9286	1.3649	0.7219	1.3368	1.5775	1.9147	2.3093	3.0294
2.9755	4.5035	7.9844	9.996	7.3824	4.1049	2.8455	2.1707	2.0881	1.5761	1.1951	0.8199	1.1615	1.5405	1.8332	2.2682
2.6015	3.5468	4.7612	7.6025	9.996	7.4536	4.5339	3.2399	2.8616	2.1864	1.8302	1.5295	0.3446	1.4967	1.8350	2.1569
1.9064	2.5403	3.1688	4.2908	7.5561	9.996	7.6895	4.3004	3.1609	2.3075	1.8491	1.6284	1.2008	0.7138	1.2613	1.6000
1.5759	2.0602	2.4197	2.9536	4.5880	7.7406	9.996	7.7594	4.2958	2.9454	2.2134	1.8761	1.4939	1.2247	0.8591	1.2576
1.3173	1.8363	2.0630	2.2889	3.2743	4.3342	7.7702	9.996	6.8975	4.2762	2.9857	2.3620	1.8520	1.5997	1.2942	0.8804
0.3153	1.8092	2.0569	2.1267	2.7740	3.0522	4.1174	6.5541	9.996	8.0455	4.8228	3.4794	2.6366	2.2275	1.8969	1.5470
1.2084	0.2928	1.3346	1.4523	1.9557	2.0742	2.6661	3.8505	7.6299	9.996	6.9183	4.0076	2.6939	2.1021	1.7292	1.4943
1.6021	1.4968	0.8091	1.2189	1.8016	1.8245	2.2162	2.9327	4.9756	7.5618	9.996	8.0459	4.4428	2.9979	2.2489	1.8603
1.8757	1.7726	1.4188	0.7512	1.5111	1.5502	1.8114	2.2303	3.4835	4.2737	7.8696	9.996	8.1402	4.4963	2.9745	2.2680
2.1153	1.8737	1.6113	1.1387	0.3507	1.1107	1.3803	1.6775	2.4961	2.7169	4.0665	7.5048	9.996	7.3906	4.0358	2.7526
2.9703	2.4207	2.0253	1.5650	1.4869	0.6358	1.1854	1.5165	2.2395	2.2469	2.9327	4.5204	8.0105	9.996	7.7751	4.3593
4.4114	3.1268	2.4544	1.8732	1.7992	1.2443	0.8305	1.2358	1.9673	1.884	2.2383	3.0767	4.4814	8.0820	9.996	7.8468
7.9732	4.4002	3.1293	2.2692	2.0441	1.5025	1.1757	0.7608	1.6475	1.5796	1.7856	2.2792	2.9234	4.4009	7.6989	9.996

La imagen reconstruida es una matriz de 64x64 píxeles distribuidos de forma uniforme según coordenadas cartesianas.

RESULTADOS

A continuación se presentan las imágenes resultantes de los dos modelos de prueba. Estos mapas cuentan con un rango de 256 tonalidades.

En la Fig. 7a y 7b se muestra la imagen del modelo físico homogéneo, así como la imagen reconstruida del mismo con el programa de Khoros. Puede notarse que su área es bastante homogénea.

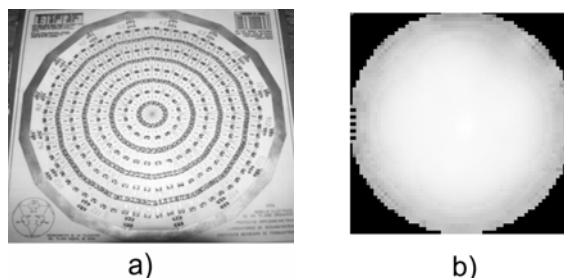


Fig. 7. Modelo físico (a) e imagen reconstruida del modelo homogéneo (b).

En la Fig. 8 se muestra la reconstrucción del modelo heterogéneo, en el cual se introdujeron tres áreas de igual tamaño, pero distinto valor de impedancia con respecto al área homogénea.

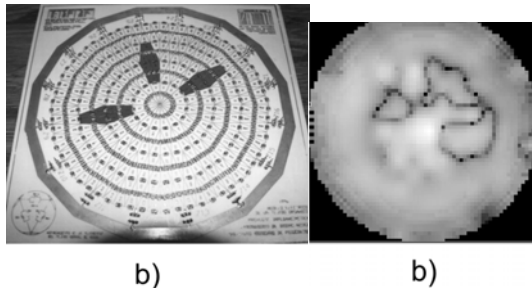


Fig. 8. Modelo físico (a) e imagen reconstruida del modelo heterogéneo (b).

Pruebas en humanos

Después de haber hechos pruebas con los modelos, se decidió hacer otras en un individuo, al cual se le colocó un arreglo de electrodos de plata y gel conductor en su brazo (Fig. 9). Para este caso el individuo no corre ningún peligro de descarga, ya que se utilizó una fuente de corriente constante de carga flotante ($800 \mu\text{A}$), una fuente de poder por medio de baterías y por supuesto con la aprobación del comité científico del Instituto, aunque estas pruebas se realizaron en los mismos que desarrollamos este sistema. Una vez obtenidos los datos del brazo de la persona, estos fueron procesados y visualizados con Khoros. Posteriormente se hizo una comparación con una imagen de un brazo, pero obtenida por medio de la Resonancia Magnética, en la cual se pudo notar gran similitud en sus estructuras principales, pero no en su resolución. Después de haber obtenido los datos del brazo de la persona, estos fueron procesados y visualizados con Khoros, tal y como se



Fig. 9. Adquisición de datos del brazo de una persona.

muestra en la Fig. 10. Además de hacer una comparación con las imágenes que se pueden obtener de la Resonancia Magnética.

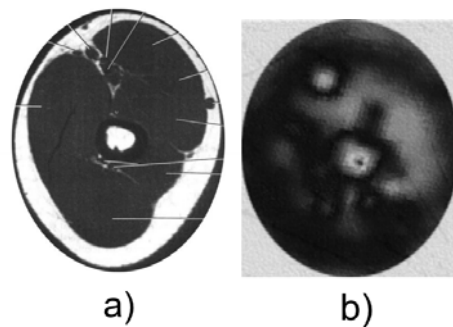


Fig. 10. Comparación de imágenes obtenidas por a) Resonancia Magnética y por b) Impedancia eléctrica.

DISCUSIÓN

De los métodos existentes de construcción que conocemos (serial y paralelo), decidimos combinar la parte serial en la inyección de corriente y en la adquisición de datos la parte paralela, por las ventajas que presenta cada una de ellas clasificando el sistema TIE como semi-paralelo. Por otra parte elegimos la inyección polar o electrodos opuestos porque nos ofrece una mejor uniformidad en la distribución de la corriente, una buena resolución espacial y un mayor rango en la medición de los voltajes desarrollados en la periferia del fantom, así como la posibilidad de

experimentar con otras estrategias de inyección. Algunas ventajas de esta estrategia nos permitió la posibilidad de obtener resultados inmediatos, fácil monitoreo y evaluación con respecto a este hardware. El diseño del prototipo se ha desarrollado de forma modular para poder verificar los aspectos teóricos y prácticos que se han considerado de interés. La variaciones de frecuencia que se presentaron durante las pruebas en los modelos, fue de tan sólo del $\pm 5\%$ sobre la frecuencia de trabajo de 100 Khz, escogida esta última por presentar mayor estabilidad en la señal después de haber hecho distintas pruebas con otras frecuencias. Estas variaciones intrínsecas son debido a las especificaciones eléctricas del circuito integrado usado (ICL8038). Además existieron pequeñas variaciones durante la inyección de corriente sobre los modelos, que fueron alrededor del $\pm 2\%$ de la corriente inyectada debidos a las tolerancias de los componentes resistivos y capacitivos utilizados en su construcción ($\pm 1\%$) y con una distorsión armónica total de 0.12%. Para los casos de estos: modelo homogéneo y heterogéneo, la máxima corriente aplicada fue de 800 μA . En lo que respecta a componentes de reactancia inductiva en el fantom, estas las manejamos como despreciables ya que es muy bajo su valor.

El hecho de establecer que el sistema pueda ser modular, y permitir sucesivas ampliaciones o variaciones de cada una de sus partes tiene sus ventajas, ya que ha permitido ir desarrollando nuevas etapas con mejor tecnología y eficacia, lo cual ha llevado a mejorar el prototipo.

CONCLUSIONES

Durante este trabajo se pudo comprobar que existen diversos factores que intervienen directamente en una buena reconstrucción de las imágenes por impedancia eléctrica. Entre ellos podemos mencionar la corriente óptima que se puede aplicar, la frecuencia de ésta al inyectarse, la colocación de electrodos, etc., son factores que no han sido desarrollados y normalizado completamente ya que muchos de ellos siguen bajo investigación. Además los algoritmos de reconstrucción no son suficientemente generales con respecto a la forma del contorno, o a la colocación de los electrodos. Por lo que aun no tenemos una base firme de comparación entre algoritmos para su precisión y resolución.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Rosell de la Universidad Politécnica de Cataluña por su apoyo en la información y orientación para el diseño de este sistema.

REFERENCIAS

Barber DC & Brown BH (1986) Recent developments in applied potential tomography-APT *In: Information Processing in Medical Imaging*. Nijhoff M (ed). S. L. Barcharach, Dordrecht, The Netherlands. pp. 106-121.

Barber DC & Brown BH (1987) Electrical Impedance Imaging. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 134: 201- 210.

Barber DC & Seagar AD (1987) Fast reconstruction of resistances images. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* 8: 47-54.

Artículos

Gisser DG, Isaacson D & Newell J C (1987) Current topics in impedance imaging. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* 8: 39-46.

Lehr J (1972) A vector derivation useful in impedance plethysmographic field calculations. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 19: 136-137.

Kejariwal M, Kaster K, Jurist J & Pakanati J (1993) Breast cancer detection using electrical impedance tomography: spice simulation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 15: 64-65.

Rosell J (1989) Tomografía de impedancia eléctrica. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya.

Santosa F & Vogelius M (1990) Backprojection algorithm for electrical impedance imaging. *SIAM J. Appl. Math.*, 50: 216 - 243.

Seagar A D, Barber D C & Brown B H (1987) Theoretical limits to sensitivity and resolution in impedance imaging. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* 9: 35-41.

Microorganismos y Virus: Herramientas Clave para el Desarrollo de Vacunas

Daniel Guillén¹, Silvia Moreno-Mendieta y Romina Rodríguez-Sanoja

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510

E-mail: danielguillenx@yahoo.com.mx

Palabras clave: vacuna, antígeno heterólogo, microorganismo como vehículo.

RESUMEN

El uso de microorganismos como sistemas de vacunación ha sido investigado ampliamente en las últimas décadas. En la actualidad, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, se ha logrado incrementar el potencial de algunas bacterias, virus y levaduras a través de la manipulación fina de eventos como la expresión de antígenos, su localización dentro de la célula, e incluso su liberación sitio específica. En consecuencia, la obtención de microorganismos genéticamente modificados para la expresión o transporte de proteínas antigénicas, así como para la liberación de ADN recombinante, ofrece múltiples ventajas tanto desde el punto de vista inmunológico como logístico y comercial. En este trabajo se analiza el estado actual del uso de microorganismos para el desarrollo de vacunas, sus ventajas y las perspectivas de esta tecnología en el campo de la vacunación.

Key words: vaccine, heterologous antigen, microorganisms as vehicles.

ABSTRACT

Microorganisms based vaccines have been extensively studied during the last decades. Nowadays, new technologies have successfully increased the potential of some bacteria, virus and yeasts through the fine manipulation of events like antigen expression, its subcellular localization and site-specific delivery. Consequently, production of engineered microorganisms for antigen expression and transport, and also for recombinant DNA delivery, offers many advantages not only from the immunological, but also from the logistic and commercial point of view. The aim of this review is to present the current state of microorganisms based vaccine research, its advantages and the technological perspectives in the vaccination field.

¹ Daniel Guillén y Silvia Moreno-Mendieta contribuyeron de forma equivalente a la elaboración de éste trabajo.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, las bacterias, hongos y levaduras han formado parte de la vida del hombre. Bien porque algunas especies son el agente etiológico de temibles enfermedades infecciosas, o bien porque se han empleado para la fermentación de bebidas y alimentos, en la producción de compuestos de interés industrial como antibióticos, enzimas y aminoácidos o en la bioremediación. Por otra parte, con el desarrollo de las herramientas de la biología molecular, se ha logrado incrementar su potencial como materia prima para el desarrollo de sistemas con aplicación biomédica y/o biotecnológica. Una de las aplicaciones más importantes es la elaboración de vacunas a partir de los microorganismos completos o de sus productos. Para ello, se han empleado principalmente patógenos atenuados y algunos microorganismos reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) capaces de

actuar como vehículos de macromoléculas heterólogas importantes en profilaxis y terapia.

Una de las principales ventajas que presenta el uso de microorganismos como vehículos de antígenos (Fig. 1), es la posibilidad de su uso por vía oral o nasal, lo cual, además de imitar la ruta de entrada de varios patógenos, evita los problemas relacionados con la administración parenteral (uso de agujas, dolor, empleo de personal calificado y los altos costos de infraestructura), siendo un procedimiento menos invasivo y más atractivo para su uso en niños y en pacientes inmunosuprimidos. Por otra parte, su producción es más simple y de menor costo debido a la relativa facilidad para cultivar un microorganismo y para escalar el proceso a nivel industrial (Medina & Guzmán, 2001; Detmer & Glenting, 2006), criterios muy importantes en países en desarrollo con alto índice de enfermedades infecciosas (Sim *et al*, 2008).

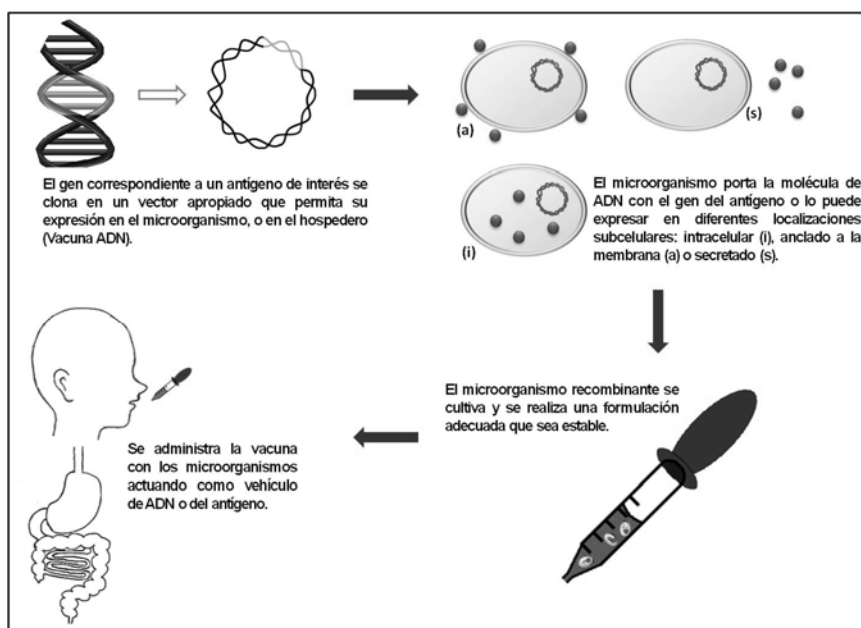


Fig. 1. Esquema representando el uso de microorganismos como vehículo de vacunación.

Se ha demostrado también que inmunizaciones vía oral o nasal no solo estimulan una respuesta inmune local a nivel de mucosa, sino que dan origen a una fuerte producción de anticuerpos en sitios distantes. La protección puede llegar a ser completa ya que se logra inducir a nivel sistémico una eficiente respuesta inmune humoral y celular, fenómeno que no se observa con administraciones parenterales, donde solo se induce una respuesta sistémica y no una respuesta a nivel de mucosa (Medina & Guzmán, 2001; Cortes-Perez *et al.*, 2007).

En consecuencia, el desarrollo de nuevos vehículos para la liberación de antígenos en mucosa (gastrointestinal, respiratoria o genital) es una prioridad. Para lograr que la inmunización por estas rutas sea eficiente, es importante considerar varios factores como son: 1. La liberación efectiva del antígeno en el sitio de inducción de la respuesta inmune, 2. El aumento de dicha respuesta por el uso de adyuvantes seguros, 3. La selección del régimen y ruta de administración que inducirá protección en el sitio deseado y a nivel sistémico y 4. La selección de una adecuada formulación de la vacuna (Gherardi & Esteban, 2005).

En esta revisión se resume el estado actual del uso de microorganismos para la expresión y transporte de antígenos, haciendo énfasis en el uso de bacterias ya que son los microorganismos que más se han estudiado y utilizado en este tipo de sistemas. Virus y microorganismos como levaduras y protozoarios empleados con el mismo propósito, son revisados de manera breve.

VACUNAS BACTERIANAS

Vacunas con bacterias patógenas atenuadas

Como se mencionó previamente, uno de los objetivos en el desarrollo de vacunas es la inducción de respuesta inmune que puede ser mediada por células (celular) o por componentes solubles en sangre como los anticuerpos (humoral) y que puede darse tanto a nivel sistémico como local contra diversos antígenos (Fig. 2). La mayoría de los sistemas en desarrollo involucran microorganismos patógenos para los cuales se han aislado o construido variantes atenuadas (Grangette *et al.*, 2004). El caso más claro es el de *Mycobacterium bovis* en la BCG, que junto con *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* son de las pocas vacunas con bacterias vivas que han logrado llegar al mercado. La cepa atenuada de *S. typhi* Ty21a es usada contra la tifoidea; y la vacuna registrada contra el cólera emplea la cepa atenuada de *V. cholerae* CVD 103-HgR (Dietrich *et al.*, 2003).

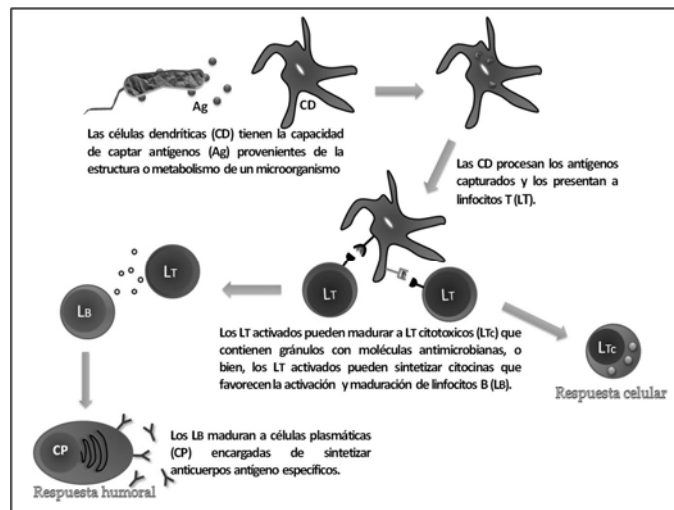


Fig. 2. Modelo simplificado de la activación de respuesta inmune contra un microorganismo.

Las atenuaciones generalmente involucran deleciones de genes que se encuentran relacionados con virulencia o con el metabolismo bacteriano, esto con la finalidad que el microorganismo mantenga una baja tasa replicativa y no supere al sistema inmune del hospedero ya que, la posible aparición de síntomas indeseables o el desarrollo de enfermedad en pacientes inmunocomprometidos así como la reversión a un fenotipo virulento son problemas concernientes al empleo de microorganismos atenuados. Sin embargo, se busca que la bacteria atenuada conserve características intrínsecas como el tropismo celular, la diseminación celular y propiedades adyuvantes gracias a la presencia de moléculas inmunoestimuladoras como lipopolisacárido (LPS), ácido teicoico o motivos CpG (citosina seguida de guanina) no metilados característicos del ADN bacteriano (Grangette *et al.*, 2004; Loessner *et al.*, 2008).

Actualmente se analiza el potencial de otras bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, para despertar respuesta inmune y/o como sistemas de expresión de antígenos heterólogos. La finalidad de este tipo de estudios es mejorar la respuesta dirigida contra un antígeno aprovechando al patógeno atenuado o inactivado como adyuvante. De esta forma, se puede lograr respuesta inmune contra el vehículo (bacteria patógena) y contra el antígeno heterólogo al mismo tiempo, de tal manera que se confiera protección contra dos agentes infecciosos en una sola vacuna.

Osorio *et al.*, (2007), analizaron el potencial inmunogénico y protector de distintas especies de *Shigella*, inactivadas con formalina para evitar los problemas asociados al uso de microorganismos atenuados. El estudio

realizado en ratones demostró la producción de anticuerpos específicos contra las distintas especies de *Shigella* utilizadas y protección contra el patógeno después de inmunizar al modelo animal vía intranasal. De manera similar Barry *et al.*, (2006) analizaron el potencial como vacuna multivalente de una mezcla de serotipos importantes de *Shigella* atenuada, expresando cada cepa uno o dos antígenos provenientes de *E. coli* enterotóxigena (ETEC), los resultados demostraron respuesta inmune específica dirigida contra el vector y contra los antígenos heterólogos así como protección contra la infección.

Entre las bacterias patógenas atenuadas que se han utilizado como posibles vacunas, existe evidencia que *L. monocytogenes* despierta una fuerte respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Bruhn *et al.*, 2007). Esta bacteria facultativa intracelular, que tiene la capacidad de invadir tanto a células fagocíticas como no fagocíticas, estimula la respuesta inmune celular por lo que ha sido utilizada en ensayos contra infecciones virales y en pruebas supresoras de tumores. Cepas recombinantes de *L. monocytogenes* que expresan y secretan proteínas del virus de papiloma humano han demostrado su eficacia como potenciales antitumorales (Gunn *et al.*, 2001), otros estudios realizados incluyen la expresión de Her-2/neu (un antígeno que se sobreexpresa en algunos cánceres como el de mama) fusionado a listeriolisina O, mostrando efecto terapéutico contra tumores implantados en un modelo murino (Singh *et al.*, 2005).

En algunos casos, la atenuación de una cepa la vuelve más susceptible que la cepa silvestre a las condiciones ambientales *in vivo*, perdiendo la capacidad de colonizar el tejido blanco y por tanto de despertar una adecuada respuesta inmune. Li *et al.*, (2009) utilizaron

cepas atenuadas de *S. enterica* Serovar Typhimurium que expresan como antígeno modelo la región α -helicoidal de la proteína A de superficie de *Streptococcus pneumoniae*. Las propiedades de las cepas utilizadas son fenotípicamente iguales a la cepa silvestre en el momento de administrarse y colonizar al hospedero, pero una vez que el microorganismo se ha establecido, se apagan genes relacionados con virulencia. Las cepas modificadas indujeron fuerte respuesta inmune y fueron capaces de resguardar al modelo murino de la infección con *S. pneumoniae*.

Cepas no virulentas de *S. typhimurium*, se han estudiado también como sistemas para la inducción de inmunidad celular contra tumores, la propuesta es que el sistema de secreción tipo III (SST3) puede ser usado para la translocación de antígenos heterólogos al citosol de las células presentadoras de antígeno (CPA) (Panthel *et al.*, 2008). Pruebas en ratones retados con células de fibrosarcoma que expresan el antígeno p60 y que previamente habían sido inmunizados oralmente con *Salmonella* que expresaba y secretaba dicha proteína, demostraron la eficacia de la actividad antitumoral del sistema (Panthel *et al.*, 2006).

A diferencia de *Salmonella* y *Listeria*, *Yersinia* es un patógeno extracelular, que también es capaz de translocar proteínas vía SST3, siendo este el sistema que emplea para desplegar factores de virulencia (Yops) en el citosol de las células del hospedero. Se han realizado pruebas con cepas de *Yersinia enterocolitica* atenuadas en distintos factores de virulencia (Leibiger *et al.*, 2008). Los antígenos liberados en el citosol de las CPA, son procesados y presentados en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC I), lo que puede activar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ de forma

específica. *Y. enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* han demostrado tener la capacidad de estimular respuesta celular T CD8⁺ usando como antígeno modelo ovoalbúmina fusionada a un dominio de translocación del factor de virulencia YopE (Wiedig *et al.*, 2005).

Otras bacterias patógenas que se han analizado por su potencial como vehículos de vacunas son *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica*, patógenos del tracto respiratorio de humanos y animales respectivamente, sin embargo, no han sido tan estudiadas como los otros géneros mencionados. Algunos ejemplos incluyen a *B. pertussis* expresando la proteína HtrA de *Haemophilus influenzae* no-capsulado. La forma en que presenta al antígeno es como una proteína de fusión entre la HtrA y una hemaglutinina filamentosa (FHA), la cual es una adhesina que *B. pertussis* expone en su superficie y además secreta. Infección de ratones vía intranasal con esta cepa modificada demostraron la inducción de altos títulos de anticuerpos anti-HtrA y anti-FHA (Alonso *et al.*, 2005); resultados similares se han obtenido con el péptido neutralizante SP70 de enterovirus 71 (EV71) fusionado a FHA o al dominio pasajero del autotransportador BrkA, las proteínas recombinantes expresadas en *B. pertussis* BPZE1 inducen anticuerpos capaces de neutralizar la infección in vitro por EV71 (Ho *et al.*, 2008).

En cuanto a *B. bronchiseptica*, una cepa mutante *aroA* se utilizó para expresar el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) bajo la regulación del promotor de la FHA; inmunización intranasal con este microorganismo indujo anticuerpos séricos contra *B. bronchiseptica* y contra TetC, además al retar al modelo murino con la toxina

tetánica se observó 100% de protección (Stevenson & Roberts, 2004). Trabajos con *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* siguen realizándose ya que al ser microorganismos capaces de colonizar la mucosa del tracto respiratorio tienen gran potencial como vehículos para la presentación de antígenos heterólogos en vías aéreas superiores.

Otra estrategia promisoría utilizando microorganismos atenuados, es la expresión de proteínas inmunogénicas que potencien la respuesta inmune. Tal es el caso del toxoide del tétanos que ha sido ampliamente utilizado como adyuvante. TetC es potencialmente inmunogénico cuando es expresado en cepas de *Salmonella*. Un ejemplo es la expresión de la glutatión S transferasa de 28kDa de *Schistosoma haematobium* (SH28GST) en una cepa atenuada de *S. enterica* Serovar Thypimurium. La expresión del antígeno fusionado a TetC despertó inmunidad protectora contra la esquistosomiasis. De esta forma se puede explotar el potencial inmunoestimador de TetC para la elaboración de vacunas contra enfermedades que requieren una fuerte respuesta protectora (Lee *et al.*, 2000).

Actualmente, pese a que la atenuación de las bacterias patógenas impide sobrevivir a la bacteria fuera del laboratorio y a que existen estrategias para controlar la población como el uso de antibióticos o la introducción de genes suicidas inducibles (Loessner *et al.*, 2008), sigue en controversia el riesgo asociado con la posible reversión al fenotipo virulento de estas bacterias. La inducción de respuestas autoinmunes o tolerancia, la producción de metabolitos tóxicos, la exclusión competitiva de la flora comensal y la transferencia indeseada de genes vía plásmidos que pudieran activar protooncogenes, son otros de las preocupaciones existentes asociadas al uso de

bacterias como vacunas (Detmer & Glenting, 2006; Li *et al.*, 2007).

Vacunas con bacterias ácido lácticas

Una manera de eliminar los problemas relacionados con la seguridad en el uso de patógenos como vacunas, es utilizando microorganismos reconocidos como seguros (GRAS), que son modificados para expresar los antígenos originales de los patógenos.

Una de las alternativas más estudiadas desde la pasada década son las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas bacterias Gram positivas, no esporuladas, no patógenas y no invasivas incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, de los cuales algunas especies son importantes miembros de la microbiota endógena asociada con tejido mucoso. Debido a que son utilizadas en la industria alimentaria, en fermentaciones tradicionales de consumo humano y algunas incluso tienen efectos probióticos (Escalante *et al.*, 2008; Camu *et al.*, 2007; Jokovic *et al.*, 2008), resultan ser una buena alternativa para reemplazar vectores patógenos atenuados como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Shigella* y administrar de forma controlada y dirigida antígenos al sistema inmune vía mucosa (Cortes-Perez *et al.*, 2007; Wells & Mercenier, 2008).

El uso de las BAL como vehículos vivos para la producción y liberación de moléculas terapéuticas como antígenos, presenta varias ventajas, una de las cuales es que provocan menos efectos secundarios que las vacunas de uso sistémico. Además, se ha demostrado que las BAL genéticamente modificadas para producir antígenos de patógenos, son capaces de despertar respuesta inmune sin la inducción de la inmunotolerancia que pueda presentarse posteriormente a la inmunización vía mucosas

Artículos

(Sim *et al.*, 2008; Scavone *et al.*, 2007). Por otra parte, y según lo han demostrado Maassen *et al.* (2000), hay un perfil de citocinas dependiente de la cepa utilizada, de esta manera, es posible obtener fuertes respuestas si el objetivo es la vacunación contra enfermedades infecciosas, o inducir inmunotolerancia si el objetivo es el tratamiento de alergias.

Entre las BAL más estudiadas se encuentran las del género *Lactococcus*, especialmente *Lactococcus lactis*, una bacteria

no comensal, transitoria en el tracto digestivo. Previamente se ha demostrado que esta bacteria expresa eficientemente proteínas heterólogas de varias fuentes (Tabla 1) y es capaz de despertar respuesta inmune específica contra dichas proteínas confiriendo de esta forma protección contra la infección (Sim *et al.*, 2008; Scavone *et al.*, 2007; Morello *et al.*, 2008). Incluso se ha utilizado para la expresión y liberación de citocinas como las IL2-6-10 y 12 en ratones, llegando con éxito a ensayos clínicos fase I (Wells & Mercenier, 2008).

Tabla 1. Expresión de proteínas heterólogas en bacterias ácido lácticas.

BAL	PROTEÍNA HETERÓLOGA	OBJETIVOS Y RESULTADOS	REFERENCIAS
<i>L. plantarum</i> <i>L. lactis</i>	Proteína verde fluorescente (GFP)	La expresión de GFP permite visualizar su fagocitosis por los macrófagos <i>in vitro</i> y <i>in vivo</i> y rastrear su paso por el tracto GI.	Geoffroy <i>et al.</i> , 2000
<i>L. plantarum</i> (<i>alr</i> -)	TTC	Mutantes con paredes más permeables mejoran la presentación del antígeno. Las cepas administradas vía intragástrica resultan más inmunogénicas.	Grangette <i>et al.</i> , 2004
<i>L. casei</i>	Antígeno PspA de <i>S. pneumoniae</i>	Ocurre inducción de anticuerpos específicos después de inmunización nasal y destrucción del pneumococo por deposición de C'.	Campos <i>et al.</i> , 2008
<i>L. plantarum</i> <i>L. lactis</i>	Antígeno E7 -HPV	La inmunización intranasal es más eficiente para inducir respuesta inmune en mucosa y sistémica que la vía intragástrica.	Cortes-Perez <i>et al.</i> , 2007
<i>L. lactis</i>	Dominio III del virus del dengue serotipo II (EDIII)	Ocurre inducción de anticuerpos IgG después de la administración vía nasal y oral. La respuesta depende de la ruta de administración y de la cepa de ratones inoculada.	Sim <i>et al.</i> , 2007
<i>L. lactis</i>	Antígeno MrpA de <i>Proteus mirabilis</i>	Ocurre inducción específica de IgG e IgA y disminución en la colonización de patógenos en riñón después de la inmunización.	Scavone <i>et al.</i> , 2007

También han sido investigadas las propiedades adyuvantes de las BAL y se han desarrollado cepas mutantes. En el primer caso por ejemplo, se han evaluado las propiedades adyuvantes de *L. lactis* NZ9000 comparando su efecto proinflamatorio con el de dos bacterias Gram-negativas, *E. coli* DH5 α y *S. typhi* Ty21a ambas no patogénicas y ampliamente estudiadas como vacunas vivas. Los perfiles de expresión de citocinas y la estimulación de células dendríticas (CDs) son indicativos de las propiedades adyuvantes (proinflamatorias) de esta bacteria, condición ideal para potenciar la respuesta inmune (Yam *et al.*, 2008).

En el segundo caso y con el objetivo de establecer si el desarrollo de transportadores bacterianos mutantes puede aumentar el potencial de las BAL como sistema de liberación, se hizo una aproximación tratando de incrementar la liberación *in vivo* de antígeno al interferir con la biosíntesis de la pared celular. Se demostró que mutantes de *Lactobacillus plantarum*, alanina racemasa negativas (*alr*), poseen paredes más permeables y tienen más potencial como sistema liberador siendo mucho más inmunogénicas por vía intragástrica, que las cepas silvestres. Este hallazgo propone pues, que un incremento en la liberación *in vivo* del antígeno, juega un papel importante en el efecto que se observa, sin excluir la posibilidad de una mejor presentación de antígeno (Granette *et al.*, 2004).

Localización de antígenos en bacterias

Existen varios factores que pueden afectar la presencia y/o efectividad de una respuesta inmune, entre estos se encuentra la cantidad de antígeno que se suministra, el esquema de inmunización, la inmunogenicidad del antígeno así como su localización dentro de un vehículo.

La ubicación de un antígeno en un microorganismo es variable, puede ser secretado, intracelular o estar anclado a la membrana, para lo cual se utilizan diferentes estrategias (Lee *et al.*, 2003). Esto es importante ya que un antígeno intracelular puede estar más protegido de la degradación que uno secretado, pero un antígeno secretado puede ser más fácilmente captado por elementos que conforman al sistema inmune y por tanto promover una respuesta más efectiva. De lo anterior se infiere que la localización de un antígeno en un microorganismo puede influir en la respuesta inmune que se obtiene contra dicho antígeno.

En *S. enterica* Serovar Typhimurium se comparó la influencia en la respuesta inmune de un antígeno heterólogo localizado en la superficie celular con respecto a su localización intracelular. El antígeno modelo fue la hemaglutinina B (HagB) de *Porphyromonas gingivalis*. Para poder localizar a HagB en la membrana de *Salmonella* se fusionó a la señal de localización externa de la lipoproteína mayor de *E. coli* (Lpp) y a un dominio de la proteína de membrana OmpA. Cuando se administró oralmente a ratones, la cepa que expresa HagB en su superficie indujo títulos de IgG e IgA mayores que la cepa que expresa HagB intracelularmente (Isoda *et al.*, 2007).

En el caso de las BAL, Bermudez-Humaran *et al.*, (2004) probaron a *L. lactis* expresando el antígeno E7 del virus de papiloma humano en tres distintos compartimentos; intracelular, anclado a pared celular y secretado. La ruta de administración a ratones fue intranasal y se evaluó la producción de IL-12 y de IFN- γ ; la mayor respuesta se obtuvo contra la forma anclada a pared seguida de la intracelular y de la secretada. Los autores refieren que la eficiencia en la respuesta contra el antígeno

localizado en la pared celular puede ser debida a la accesibilidad que tiene el sistema inmune por el antígeno a diferencia del intracelular que solamente se expone cuando la bacteria se lisa. Por otra parte, la respuesta disminuida contra la forma secretada es atribuida a la inestabilidad de E7.

En contraste, Scavone *et al.* (2007) encontraron que al administrar vía intranasal una cepa de *L. lactis* que secretaba la proteína fimbrial de *Proteus mirabilis* o ubicándola en su pared celular se inducía la producción de anticuerpos específicos IgG e IgA séricos respectivamente, pero solo cuando el antígeno era secretado se produjo IFN- γ . Al infectar al modelo murino, se presentó una disminución en la colonización renal por *P. mirabilis* en los ratones que fueron inmunizados con una u otra cepa recombinante de *L. lactis*.

La información que se tiene hasta el momento acerca de la influencia que tiene en el sistema inmune la localización subcelular de un antígeno sigue siendo variada y factores como la inmunogenicidad, estabilidad, tolerancia, ruta de administración y dosis, entre otros, son detalles que hay que tomar en cuenta al diseñar la ubicación en la cual se desea que un microorganismo, que está actuando como vehículo, presente un antígeno.

Vacunas de ADN en vehículos bacterianos

Las vacunas de ADN transfieren genes que codifican para antígenos a las células del hospedero, en el caso de bacterias que portan plásmidos con dichos genes, pueden transferir el ADN cuando se lisan dentro del citosol de la célula hospedera o bien, por otros mecanismos que aún no han sido descrito (Loessner *et al.*, 2008). Los plásmidos recombinantes que se transfieren generalmente se encuentran bajo la

regulación de un promotor eucariota, de tal manera que sean las células del hospedero las que lleven a cabo la expresión del antígeno. Dentro de las ventajas que este tipo de vacunas ofrece es que son fáciles de diseñar gracias a las herramientas existentes para manipular el ADN y son estables, lo que facilita su almacenamiento y transporte. Como la síntesis del antígeno se lleva a cabo *in vivo* en el hospedero, se pueden realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias para que un antígeno adquiera una conformación correcta e incluso se pueden expresar múltiples antígenos usando un mismo vector de ADN, también inducen una fuerte respuesta inmune celular, además de humoral, que se correlaciona con la protección contra patógenos intracelulares y tumores, razón por la cual, se han utilizado ampliamente para proteger contra una serie de enfermedades infecciosas como el VIH (Li *et al.*, 2007).

Otras ventajas ofrecidas por este sistema incluyen la coexpresión de moléculas inmunomoduladoras como citocinas o moléculas coestimuladoras y la posibilidad de manipular los antígenos por adición de secuencias como péptidos señal. Estos marcan su destino a determinados compartimentos celulares, para mejorar así su eficacia en la inmunización. Además, pueden utilizarse sistemas de transporte o vectores para su liberación dirigida. En este sentido, el uso de bacterias como vehículos resulta una estrategia simple con múltiples ventajas, entre otras, que pueden invadir casi cualquier célula eucariótica e incluso colonizar ciertas superficies mucosas de órganos internos. Finalmente, una ventaja importante es que la cantidad de ADN que puede ser clonado en un plásmido bacteriano es en varias órdenes de magnitud más grande que la que puede

acomodarse en vectores virales (Darji *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, el uso de microorganismos para transportar el ADN, es una de las alternativas más prometedoras sobretodo en el caso de bacterias enteroinvasivas, ya que pueden administrarse por vía oral y transferir el ADN directamente a células presentadoras de antígeno. Entre estas bacterias se encuentra *L. monocytogenes*, la cual ha sido utilizada para comparar la eficacia como vehículo de ADN, ARNm o bien secretando el antígeno por sí misma. En dicho trabajo se utilizó como antígeno modelo la ovalbumina (OVA) y se observó que de los ratones infectados con *Listeria* portando las diferentes formas de vacuna, la forma expresada y secretada por la misma bacteria fue la más eficiente en la presentación de antígeno seguida del ARNm, mientras que *Listeria* que transfiere el ADN codificante para la OVA falló en generar una respuesta (Loeffler *et al.* 2006).

El hecho de no obtener una respuesta cuando se utilizó *L. monocytogenes* como vehículo de ADN codificante para OVA no implica que sea ineficiente para transportar vacunas de ADN ya que la presencia de una buena respuesta inmune depende de varios factores como la naturaleza del antígeno o la ruta de inmunización, entre otras. Resultados favorables con *L. monocytogenes* se han obtenido portando plásmidos de expresión eucariota con antígenos de *M. tuberculosis*, donde se reportó la inducción de respuesta inmune celular después de su administración vía intraperitoneal en un modelo murino. Se observó también que al inmunizar vía intravenosa con *L. monocytogenes* transportando los plásmidos de expresión eucariota, se obtiene una respuesta protectora

comparable a la inducida por la vacuna BCG (Miki *et al.*, 2004).

Otros ejemplos de bacterias enteropatógenas como vehículos para vacunas de ADN incluyen a *Salmonella*, donde recientemente se reportó su efectividad contra la infección por *Toxoplasma gondii* en ratones (Qu *et al.* 2008) y como terapia antitumoral (Xiang *et al.*, 2008); *Shigella* (Vecino *et al.*, 2004) y *Y. enterocolitica* (Al-Mariri *et al.*, 2002).

Las bacterias lácticas por su parte, no poseen las propiedades de las bacterias patógenas como el tropismo hacia ciertos tejidos o patrones moleculares que estimulan al sistema inmune, pero se ha demostrado su eficacia como vehículos de ADN. En un estudio donde se utilizó una cepa recombinante de *L. lactis* expresando la internalina A de *L. monocytogenes* se demostró que *L. lactis* era capaz de invadir enterocitos *in vivo* y más aún, era capaz de transferir un plásmido con la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (Pcmv) a la línea celular Caco-2, observándose la expresión de la GFP en el 1% de las células infectadas (Guimaraes *et al.*, 2005). En un trabajo subsecuente se incubó a *L. lactis* sin la capacidad de internalizarse y con un plásmido con el gen de la β -lactoglobulina bovina bajo el control del promotor viral Pcmv junto con células Caco-2. Después de la incubación se observó la expresión de la β -lactoglobulina en dicha línea celular (Guimaraes *et al.*, 2006).

Con *Lactobacillus acidophilus* portando un plásmido con el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa, se compararon las rutas de inmunización intramuscular, intraperitoneal, intranasal y oral, reportándose que la vía que más impacto tuvo fue la intramuscular ya que se obtuvieron títulos de anticuerpos

semejantes a los que se tienen al emplear la vacuna comercial existente (Li *et al.*, 2007). Todos estos estudios prueban el potencial que tienen las bacterias lácticas como posibles vehículos para la administración de vacunas de ADN.

VACUNAS VIRALES

Las vacunas virales consisten de virus inactivados incapaces de reproducirse dentro del organismo o bien, de virus atenuados con una baja tasa de multiplicación, por lo que causan mínimos o ningún efecto secundario, la vacuna Sabin contra la polio es un ejemplo del último caso.

Desde la década de los 80's hay un creciente interés por utilizar virus como vectores para la presentación de antígenos heterólogos, especialmente por la fuerte respuesta inmune que son capaces de despertar. Se han desarrollado vectores con virus de ADN, tales como adenovirus y herpesvirus y con virus de ARN de cadena positiva como alfavirus y flavivirus. Dentro de los más utilizados se encuentran los adenovirus, virus de doble cadena de ADN que presentan una gran variedad de serotipos y de los cuales se conoce su genoma, además de que se pueden obtener altos títulos virales en cultivos tisulares e inducir respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Para poder usarlos como vectores generalmente se hacen deleciones de regiones que están involucradas con la replicación viral (Tatsis & Ertl, 2004). Estudios actuales, en los que están involucrados como posibles vectores de vacunas, abarcan diferentes agentes infecciosos causantes de enfermedades que tienen impacto a nivel mundial como el SARS y

el VIH (Catanzaro *et al.*, 2006; Kobinger *et al.*, 2007).

Otro virus utilizado es el baculovirus, cuyo genoma es circular de doble cadena e infecta principalmente a insectos, propiedad que es utilizada para la expresión y producción celular *in vitro* de proteínas recombinantes. Estudios con baculovirus como vector, involucran la fusión de un péptido o proteína heteróloga a gp64, glicoproteína de envoltura involucrada en la internalización del virus a la célula, logrando de esta forma que se incorpore la proteína de fusión a la envoltura viral. Este método, ha sido utilizado como plataforma para el transporte de proteínas antigénicas, por ejemplo la glicoproteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), observándose una alta producción de anticuerpos neutralizantes en modelo murino (Xu & Liu, 2008), o la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium bergeri*, estudio en el cual se reportó la producción de anticuerpos y protección parcial en los ratones inmunizados vía intramuscular contra la infección por el parásito (Yoshida *et al.*, 2003).

Aunque son promisorios los resultados que se han obtenido hasta el momento, existe preocupación con respecto a la seguridad en la utilización de estos virus como vectores de antígenos en términos de la potente respuesta inmune que son capaces de inducir, la gran cantidad de proteínas que son capaces de sintetizar, que puedan modular o antagonizar la respuesta inmune y la capacidad que tienen algunos para transformar a la célula huésped (Bukreyev *et al.*, 2006).

Como alternativa, recientemente, se ha evaluado el potencial de un grupo de virus de ARN de cadena negativa no segmentada (NNSV) como vectores virales y que comprenden las familias *Rhabdoviridae*,

Paramyxoviridae, *Filoviridae* y *Bornavirida*. A pesar de la infectividad de su ARN genómico en cultivo celular y a la ausencia de un mecanismo ya establecido para la inserción de genes extraños, presentan múltiples características que los hacen candidatos ideales como vectores. Entre las más importantes están que algunos de estos virus son restringidos de forma natural por el huésped, se replican eficientemente en líneas celulares utilizadas para la fabricación de vacunas, pueden infectar vía intranasal induciendo IgA local e IgG sistémica, se replican en el citoplasma, pocas veces se integran al genoma del huésped y codifican de 5 a 11 proteínas, evitando problemas de modulación o antagonismo con la respuesta inmune del huésped. Los que resultan más promisorios son el virus de la parainfluenza humana, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la estomatitis vesicular (Bukreyev *et al.*, 2006).

Bien sean virus de ADN o ARN, entre los diferentes sistemas de liberación de antígenos, los vectores virales recombinantes tienen enorme potencial. Su habilidad para liberar eficientemente al antígeno directamente en el citosol estimula la vía de procesamiento de antígeno en el contexto de MHC-I, induciendo en consecuencia una fuerte respuesta inmune celular y humoral contra los antígenos expresados. Por otra parte, su habilidad para infectar células blanco y tejidos de interés, su fácil liberación en mucosas (oral o nasal) y su efecto adyuvante natural debido a la inducción de citocinas y quimiocinas, los convierten en poderosas herramientas para el desarrollo de vacunas contra patógenos virales respiratorios de uso masivo en la población pediátrica (Gherardi & Esteban, 2005; Bukreyev *et al.*, 2006).

VACUNAS CON LEVADURAS

El uso de levaduras recombinantes representa una de las alternativas más atractivas como vehículo para la liberación de antígenos. Además de ser bastante estables y seguras, poseen propiedades adyuvantes intrínsecas y pueden suministrarse varias veces al huésped sin consecuencias adversas. Las levaduras son capaces de activar a las células dendríticas suministrándoles el antígeno en paquetes concentrados que son ávidamente internalizados. De ésta forma se incrementa la cantidad de antígeno disponible para el procesamiento y la presentación, que ocurre de forma eficiente por ambas vías del MHC, lo que conduce a una inmunidad a células tumorales mediada por células ayudadoras y linfocitos T citotóxicos (Saiki *et al.*, 2005; Haller *et al.*, 2007).

Una de las cepas que genera más interés es *Saccharomyces cerevisiae* ya que los componentes de su pared interactúan con receptores de macrófagos y células dendríticas. Por otra parte, es conocido que la preparación de pared celular cruda (Zymosan) regula positivamente genes proinflamatorios así como moléculas de superficie en macrófagos y células dendríticas y moléculas coestimuladoras (Haller *et al.*, 2007).

Dentro de los diferentes estudios que se han realizado, Bernstein *et al.* (2008) expresaron el antígeno carcinoembrionario humano en *S. cerevisiae* y administraron la levadura recombinante vía subcutánea a un modelo murino. De esta forma se indujo una respuesta inmune celular específica así como un rápido incremento de las moléculas MHC-II y CPAs. También se ha utilizado a *S. cerevisiae* para expresar la proteína NS3 de la envoltura del virus de la hepatitis C. En ratones inmunizados por vía subcutánea, se observó

una fuerte respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos y se demostró una fuerte respuesta inmune celular tipo Th1 dependiente de la dosis y los refuerzos, así como un efecto profiláctico y terapéutico de la vacuna (Haller *et al.* 2007). Como alternativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o cáncer, Saiki *et al.* (2005), demostraron que la levadura recombinante que expresa el autoantígeno asociado a la Degeneración Cerebral Paraneoplásica (PCD) es inmunogénico en modelo murino.

Otro aspecto interesante relacionado con el uso de levaduras para la expresión de antígenos heterólogos, es su capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales como la manosilación. Buscando la relación entre dichas modificaciones y la inmunogenicidad, Lam *et al.* (2005), mediante estudios comparativos con ovoalbúmina no manosilada derivada de *E. coli* y ovoalbúmina manosilada derivada de *Pichia pastoris*, demostraron *in vitro*, que la manosilación favorece la captura del antígeno por células dendríticas en función de la presencia de receptores de manosa en su superficie, incrementando a su vez la respuesta inmune celular

VACUNAS CON PROTOZOARIOS

La vacunación utilizando como vehículo a protozoarios no es un campo muy estudiado, probablemente debido a las ventajas que ofrecen los otros microorganismos y virus para desarrollar este tipo de sistemas, aunque es posible encontrar algunos ejemplos. En un ensayo de vacunación utilizando cepas atenuadas de *T. gondii* que expresan el antígeno KMP-11 proveniente de *Leishmania*, Ramírez *et al.*, (2001) demostraron que al

inmunizar vía intraperitoneal con el parásito, se induce la proliferación antígeno específica de células T. Aún más, al infectar al modelo murino con *Leishmania major*, se registró protección parcial contra el desarrollo de lesiones causadas por este patógeno.

De igual forma, *Leishmania tarentolae*, un parásito no patógeno para los humanos que se dirige eficientemente a las células dendríticas y órganos linfoides, fue utilizado por Breton *et al.*, (2005) para expresar la proteína Gag del VIH-1, observándose la producción de IFN- γ y la presencia de anticuerpos anti-Gag en modelo murino. Así mismo, observaron que el tamaño del vector favorece la presentación de antígeno y tiene influencia en la magnitud y calidad de la respuesta de linfocitos T, lo que habla del potencial que pueden tener este tipo de microorganismos en la búsqueda de un vehículo adecuado.

CONCLUSIONES

Actualmente se desarrollan distintos sistemas que pueden ser utilizados como vehículos y/o adyuvantes en la vacunación. Los liposomas, sales de alúmina, micropartículas de ácido poliláctico y las nanopartículas de quitosano, son algunos ejemplos de estos sistemas. Sin embargo, se conoce desde hace tiempo que los mejores estimuladores de la respuesta inmune son por excelencia los microorganismos, gracias a que presentan estructuras moleculares invariantes (LPS, CpG, ácido teicoico, etc) que son el blanco de reconocimiento del sistema inmune innato y por tanto son capaces de inducir respuesta inmune específica, ya sea de tipo celular, humoral o ambas.

Pese a que hoy en día se sigue argumentando el riesgo asociado con el uso de

microorganismos patógenos en la vacunación, la presencia en el mercado de vacunas con patógenos atenuados y los estudios realizados con microorganismos GRAS, resultan esperanzadores para el futuro de las vacunas basadas en microorganismos. Dada su versatilidad, se pueden emplear con una gran variedad de antígenos, el reto consiste en encontrar las condiciones óptimas que permitan un diseño racional de vacunas. La compatibilidad entre el antígeno y la cepa, las condiciones de cultivo, la estabilidad del sistema y su seguridad, son sólo algunos de los aspectos que hay que tener en cuenta para lograr dicho objetivo.

REFERENCIAS

Alonso S, Willery E, Renauld-Mongenie G & Loch C (2005) Production of nontypeable *Haemophilus influenzae* htra by recombinant *Bordetella pertussis* with the use of filamentous hemagglutinin as a carrier. *Infect. Immun.* 73: 4295-4301.

Al-Mariri A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, De Bolle X & Letesson J-J (2002) *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or p39 antigen. *Infect. Immun.* 70: 1915-1923.

Barry EM, Wang J, Wu T, Davis T & Levine MM (2006) Immunogenicity of multivalent *Shigella*-ETEC candidate vaccine strains in a guinea pig model. *Vaccine*, 24: 3727-3734.

Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, Alcocer-Gonzalez JM, Tamez-Guerra RS, de Oca-Luna RM & Langella P (2004) An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in

mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J. Med. Microbiol.* 53: 427-433.

Bernstein MB, Chakraborty M, Wansley EK, Guob Z, Franzusoff A, Mostböck S, Sabzevari H, Schloma J & Hodgea JW (2008) Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells. *Vaccine*, 26: 509-521.

Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M & Papadopoulou B (2005) Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73: 6372-6382.

Bruhn KW, Craft N & Miller JF (2007) *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect.* 9: 1226-1235.

Bukreyev A, Skiadopoulos MH, Murphy BR & Collins PL (2006) Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J. Virol.* 80: 10293-10306.

Campos IB, Darrieux M, Ferreira DM, Miyaji EN, Silva DA, Arêas APM, Aires KA, Leite LCC, Ho PL & Oliveira MLS (2008) Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes Infect.* 10: 481-488.

Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M & De Vuyst L (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6):1809-1824.

Artículos

Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Gu L, Martin JE, Novik L, Chakrabarty BK, Butman BT, Gall JGD, King CR, Andrews CA, Sheets R, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS & The Vaccine Research Center 006 Study Team (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade hiv-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J. Infect. Dis.* 194: 1638-1649.

Cortes-Perez NG, Lefèvre F, Corthier G, Adel-Patient K, Langella P & Bermúdez-Humarán LG (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 25: 6581-6588.

Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T & Weiss S (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27: 341-349.

Detmer A & Glenting J (2006) Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell. Fact.* 5:23.

Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB & Viret J-F (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, 21: 678-683.

Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, Córdova-Aguilar MS, López-Munguía A, Gosset G & Bolívar F (2008) Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124:126-134.

Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M & Mercenier A (2000) Use

of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 383-391.

Gherardi MM & Esteban M (2005) Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J. Gen. Virol.* 86: 2925-2936.

Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M & Mercenier A (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* 72: 2731-2737.

Guimaraes VD, Gabriel JE, Lefevre F, Cabanes D, Gruss A, Cossart P, Azevedo V & Langella P (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect.* 7: 836-844.

Guimaraes VD, Innocentin S, Lefevre F, Azevedo V, Wal JM, Langella P & Chatel JM (2006) Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7091-7097.

Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC & Paterson Y (2001) Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by hpv-16. *J. Immunol.* 167: 6471-6479.

Haller AA, Lauer GM, King TH, Kemmler C, Fiolkoski V, Lu Y, Bellgrau D, Rodell TC, Apelian D, Franzusoff A & Duke RC (2007) Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell

Artículos

responses targeting HCV NS3 and core proteins. *Vaccine*, 25: 1452-1463.

Ho SY, Chua SQ, Foo DGW, Loch C, Chow VT, Poh CL & Alonso S (2008) Highly attenuated *Bordetella pertussis* strain bpze1 as a potential live vehicle for delivery of heterologous vaccine candidates. *Infect. Immun.* 76: 111-119.

Isoda R, Simanski SP, Pathangey L, Stone AES & Brown TA (2007) Expression of a *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin on the surface of a *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine*, 25: 117-126.

Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovcic B, Savic D & Topisirovic L (2008) A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 305.

Kobinger GP, Figueredo JM, Rowe T, Zhi Y, Gao G, Sanmiguel JC, Bell P, Wivel NA, Zitzow LA, Flieder DB, Hohann RJ & Wilson JM (2007) Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine*, 25: 5220-5231.

Lam JS, Mansour MK, Specht CA & Levitz SM (2005) A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. *J. Immunol.* 175: 7496-7503.

Lee JJ, Sinha KA, Harrison JA, De Hormaeche RD, Riveau G, Pierce RJ, Capron A, Wilson RA & Khan CMA (2000) Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma*

haematobium Glutathione S-Transferase. *Infect. Immun.* 68: 2503-2512.

Lee SY, Choi JH & Xu Z (2003) Microbial cell-surface display. *Trends. Biotechnol.* 21: 45-52

Leibiger R, Niedung K, Geginat G, Heesemann J & Trülsch K (2008) *Yersinia enterocolitica* yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine*, 26: 6664-6670.

Li YG, Tian FL, Gao FS, Tang XS & Xia C (2007) Immune responses generated by *Lactobacillus* as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 25: 902-911.

Li Y, Wang S, Scarpellini G, Gunn B, Xin W, Wanda SY, Roland KL & Curtiss R 3rd (2009) Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13:593-8.

Loeffler DIM, Schoen CU, Goebel W & Pilgrim S (2006) Comparison of different live vaccine strategies in vivo for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 74: 3946-3957.

Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, zur Lage S, Westphal K & Weiss S (2008) Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 21-26.

Maassen CB, Holten-Neelen C, Balk F, Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Classen E (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in

the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, 18: 2613-2623.

Medina E & Guzmán CA (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 19: 1573-1580.

Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M & Koide Y (2004) Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and mpb/mpt51. *Infect. Immun.* 72: 2014-2021.

Morello E, Bermúdez-Humarán LG, V. Solé DL, Miraglio N, Langella P & Poquet I (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 48-58.

Osorio M, Bray MD & Walker RI (2007) Vaccine potential for inactivated shigellae. *Vaccine*, 25: 1581-1592.

Pantheil K, Meinel KM, Domènech VES, Geginat G, Linkemann K, Busch DH & Rüssmann H (2006) Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the *Salmonella* type III secretion system. *Microbes Infect.* 8: 2539-2546.

Pantheil K, Meinel KM, Domènech VES, Trülzsch K & Rüssmann H (2008) *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: A versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 99-103.

Qu D, Wang S, Cai W, Du A (2008) Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine*, 26:4541-4548.

Ramírez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepúlveda JC, Moll H, Soldati D & Berberich C (2001) Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen kmp-11 elicit a specific immune response in balb/c mice. *Vaccine*, 20: 455-461.

Saiki M, Sakai K, Saiki S, Kitagawa Y, Nakanishi M & Hirose G (2005) Induction of humoral responses specific for paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen by whole recombinant yeast immunization. *J. Autoimm.* 24: 203-208.

Scavone P, Miyoshi A, Rial A, Chabalgoity A, Langella P, Azevedo V & Zunino P (2007) Intranasal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. *Microbes Infect.* 9: 821-828.

Sim ACN, Lina W, Tana GKX, Sima MST, Chowb VTK & Alonso AS (2008) Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine.* 26: 1145-1154.

Singh R, Dominiacki ME, Jaffee EM & Paterson Y (2005) Fusion to listeriolysin O and delivery by *Listeria monocytogenes*

Artículos

enhances the immunogenicity of her-2/neu and reveals subdominant epitopes in the fvb/n mouse. *J. Immunol.* 175: 3663-3673.

Stevenson A & Roberts M (2004) Intranasal immunisation against tetanus with an attenuated *Bordetella bronchiseptica* vector expressing frgc: Improved immunogenicity using a bvg-regulated promoter to express frgc. *Vaccine*, 22: 4300-4305.

Tatsis N & Ertl HCJ (2004) Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 10: 616-629.

Vecino WH, Quanquin NM, Martinez-Sobrido L, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A, Jacobs Jr. WR, Fennelly GJ (2004) Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology*, 325: 192-199.

Wells JM & Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 349-362.

Wiedig CA, Kramer U, Garbom S, Wolf-Watz H & Autenrieth IB (2005) Induction of CD8⁺ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine*, 23: 4984-4988.

Xiang R, Luo Y, Niethammer AG & Reisfeld RA (2008) Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol. Rev.* 222: 117-128.

Xu XG & Liu HJ (2008) Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and

immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine*, 26: 5455-5460.

Yam KK, Pouliot P, N'diaye MM, Fourniera S, Olivier M & Cousineau B (2008) Innate inflammatory responses to the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Vaccine*, 26: 2689-2699.

Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C & Tanaka T (2003) Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*, 316: 161-170.

Estudio de la Conservación del Aceite de Amaranto Utilizando Diversos Antioxidantes

José Alberto Ariza*, Fernando López, Claudia Montalvo, Amicla Arellano, Silvia Luna y Raúl Rene Robles.

Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada-IPN, Tlaxcala. Sn. J. Molino s/n km 1,5 carretera estatal Sta. I. Tecuexcomac-Tepetitla de Lardizábal.90600
Tel. 01 (248) 487-0765, Fax. 487-0766.
e-mail: ariza_ortega@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus*, aceite de amaranto, ácidos grasos insaturados, conservación de aceites.

RESUMEN

La semilla de amaranto contiene ácidos grasos esenciales y escualeno. Refinado y con antioxidantes se lograría un aceite competitivo. En este trabajo se estudió la conservación del aceite de amaranto midiendo los peróxidos en presencia y ausencia de antioxidantes naturales (vitamina E y semilla de uva) y uno sintético (butilhidroxitolueno). Se determinó el punto de humo y se sometió a pruebas de foto-oxidación. En los tres casos los resultados fueron analizados estadísticamente por medio del ANAVAR y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Primeramente se encontró que la vitamina E al 0.02 (v/v) mostró un mayor efecto protector con 54% de poder antioxidante. En la segunda prueba el punto de humo se presentó a los 220 °C, por lo que se recomienda su empleo para freír. Sin embargo, se encontró que el índice de peróxido fue de 15 meq kg⁻¹ a un tiempo de 35 h, lo que indica la formación de los peróxidos, por lo que es necesario mantenerlo en oscuridad.

Key words: *Amaranthus hypochondriacus*, amaranth oil, unsaturated fatty acids, oil preservation.

ABSTRACT

The amaranth seed contains essential fatty acids and squalene. Refined and added with antioxidants it would be obtained a highly competitive oil. In this work, the preservation of amaranth oil was studied measuring the formation of peroxides with and without natural (vitamin E and grape seed) and synthetic antioxidants (butylated hydroxytoluene). The smoke point was also determined and the amaranth oil was submitted to the test photo-oxidation. In all three cases the results were statistically analyzed by the ANAVAR and Tukey test ($p \leq 0.05$). In the first case it was found that vitamin E at 0.02 (v/v) showed an increased protective effect of 54% for the conservation of oxidation. The smoke point was presented to the 220 °C, indicating that can be used for frying. For the photo-oxidation it was found a maximum rate of 15 meq kg⁻¹ at a time of 35 h, and the peroxides increasing, that is why this oil should be kept in dark conditions.

INTRODUCCIÓN

El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae*, de la cual sólo se cultivan de manera importante *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus pumilus*, *Amaranthus tricolor*, *Amaranthus retroflexus* y *Amaranthus hybridus* (Tudor & Bean, 1985, Marcone, 2000). El amaranto es una planta herbácea de origen tropical, adaptable a climas templados y semiáridos (Marcone, 2000). En México la producción anual es de 4,227,000 Kg, siendo el Estado de Puebla el principal productor con 3,059,000 Kg (SAGARPA, 2004). Con la semilla de amaranto se elaboran diversos productos, pero se conoce principalmente por el dulce tradicional denominado "alegría". La semilla de amaranto contiene compuestos nutritivos, entre ellos se encuentran los lípidos, como el escualeno, ácidos grasos y tocoferoles. El primero tiene una concentración de 9.26-10.34%, en los segundos predominan los ácidos grasos del tipo 18:1 (22.70%), 18:2 (40.83%) y 18:3 (7.7%), y los terceros se encuentran en un 60.45 por g de semilla (Marcone, 2000). Diversos estudios han demostrado que el amaranto presenta diversas aplicaciones nutraceuticas, como es la disminución del nivel de glucosa en sangre, combinado con otros cereales equilibra el patrón de aminoácidos, minerales y presenta un efecto hipocolesterolémico (Chaturvedi *et al.*, 1997). Además, los ácidos grasos 18:2 y 18:3 son importantes para producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales, por ejemplo, la inflamación y la coagulación de la sangre. Por otro lado, el escualeno presenta propiedades biológicas que ayudan a disminuir la presencia de los radicales libres y aumenta la resistencia inmunológica. Además, se usa en la industria de cosméticos para la elaboración de cremas y

bronceadores (He *et al.*, 2002, Amunziata *et al.*, 1999, Lehmann, 1996).

Los aceites son más susceptibles que las grasas a sufrir reacciones de deterioro por su contenido de ácidos grasos insaturados. Estas reacciones son aceleradas por el calor, la luz, la humedad y por trazas de metales (Badui, 1998, Fennema, 2000).

La baja estabilidad de los aceites puede ser prevenida por la adición de antioxidantes, de los cuales se recomiendan el α -tocoferol, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbobutilhidroxiquinona (TBHQ), galato de propilo, tocoferoles mixtos y palmitato de ascorbilo (CODEX, 1981). El efecto protector depende de la composición y de las propiedades químicas del aceite o grasa.

Los aceites durante su almacenamiento sufren una degradación que afecta su vida útil. Para determinar los daños en el aceite se emplean métodos acelerados como el oxígeno activo, la bomba de oxígeno o la incubación en estufa. Además, para verificar la oxidación se usan pruebas sensoriales que son poco precisas y muy subjetivas, y los métodos físico-químicos, que aportan más información acerca del grado de oxidación, por ejemplo: los carbonilos totales, el índice de anisidina, índice de peróxido, ácido tiobarbitúrico, fluorescencia y cromatografía de gases (Fennema, 2000).

La finalidad de este trabajo fue: i) evaluar el efecto de antioxidantes naturales (vitamina E y aceite comercial de semilla de uva) y uno sintético (BHT) sobre el aceite de amaranto y ii) determinar la actividad protectora de la vitamina E, sometiendo al aceite de amaranto a pruebas termo-oxidativas y foto-oxidativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó aceite de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) proporcionado por la industria San Miguel de Productos Agropecuarios, localizada en el Estado de Hidalgo, México; el aceite se refinó mediante el método de Ariza et al. (2004). El índice de acidez (IA) del aceite de amaranto refinado fue 0.05% expresado como porcentaje de ácido oleico y el índice de peróxido fue de 1.4 meq Kg⁻¹. Los disolventes utilizados fueron grado reactivo, los antioxidantes vitamina E y el BHT fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri. El antioxidante aceite comercial de semilla de uva, marca Medinatural, fue adquirido en una farmacia local, (Cd. de Puebla, México).

Efecto de los antioxidantes sobre el índice de peróxido del aceite de amaranto

Para determinar la actividad antioxidante de los aditivos empleados se desarrollaron pruebas de estabilidad, utilizando antioxidantes naturales como aceite de semilla de uva y vitamina E al 0.01 y 0.02 (v/v) y el antioxidante sintético BHT a 0.01 y 0.02 (g/L). Los antioxidantes fueron mezclados directamente en el aceite. Cada tratamiento se realizó por duplicado. La prueba de oxidabilidad se llevó a cabo por el método de Matissek et al. (1999). Para cuantificar el grado de oxidabilidad en el aceite, se realizaron 11 análisis en vasos de precipitado de 100 mL cada uno con 3g de muestra de aceite, se depositaron dentro de una estufa previamente calentada a 60 °C, donde se anotó el tiempo inicial (t=1), y se determinó el índice de peróxido usando la técnica de SECOFI (1987). Primero se cuantificó el índice de peróxido del aceite sin calentar (tiempo t=1). A continuación se llevaron a cabo los análisis de los 11 tratamientos restantes. Al cabo de 1 h se sacó uno de los vasos y se determinó el índice de peróxido (t=1 h). Se realizó la misma operación

en el resto de las muestras al cabo de 2, 3, 5, 7, 8, 20, 30, 40, 60 y 80 h (t=2 hasta 80 h).

Cuantificación de la actividad antioxidante de los conservadores en el aceite de amaranto

De la prueba anterior la actividad antioxidante (AA) de los conservadores se determinó por duplicado comparando la pendiente del índice de peróxido en función del tiempo de cada antioxidante: semilla de uva y vitamina E a 0.01 y 0.02 v/v, y BHT a 0.01 y 0.02 g/L (A_E), con la pendiente producida por el aceite sin conservador (A_C). Los valores obtenidos se sustituyeron en la ecuación reportada por Hudson & Mahgoub (1981) para obtener la gráfica que describe la capacidad de los antioxidantes para inhibir o disminuir el proceso oxidativo.

$$\% AA = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Tratamiento termo-oxidativo en el aceite de amaranto

Una vez que se encontró que la vitamina E al 0.02 (v/v) era el mejor antioxidante, el aceite de amaranto se sometió a una prueba termo-oxidativa en presencia de dicha vitamina. Para ello se siguió la metodología reportada por Matissek et al. (1999). El tratamiento termo-oxidativo se realizó por duplicado en vasos de precipitado de 100 mL a temperatura de 50, 70, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 y 240 °C por 15 minutos. Se midió el color fotométrico inicial y final, empleando el método reportado por Allen et al. (1982) y el índice de acidez mediante la técnica de SECOFI (1987).

Tratamiento de foto-oxidación en el aceite de amaranto

La prueba de foto-oxidación se realizó sobre aceite de amaranto en presencia de vitamina E al 0,02(v/v) y se colocó dentro de una cámara

de luz incandescente (1650 luxes). El área de la cámara de luz fue de 120 cm², el aceite se depositó en frascos cerrados transparentes a 55 °C. Los tratamientos se realizaron por duplicado. La prueba de foto-oxidación, se determinó por el método de Matissek et al. (1999), que mide el índice de peróxido del aceite a dos temperaturas diferentes, la ambiental (24 °C) y a una temperatura superior (60 °C), de manera intermitente a diferentes tiempos para formar la cinética de oxidación; el índice de peróxido se cuantificó usando la técnica de SECOFI (1987).

Cuantificación del escualeno en el aceite de amaranto

La determinación del contenido de escualeno en el aceite de amaranto se realizó según la técnica del AOAC (1990).

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza mediante el procedimiento ANAVAR y se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey, $p < 0.05$, (SAS, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los antioxidantes sobre el índice de peróxido del aceite de amaranto

Los resultados de la cinética de oxidación del aceite de amaranto en términos del índice de peróxido con y sin antioxidantes a una concentración de 0.01 (v/v) y a 60 °C son mostrados en la Fig. 1.

Se observa un incremento del índice de peróxido en los diferentes tratamientos con

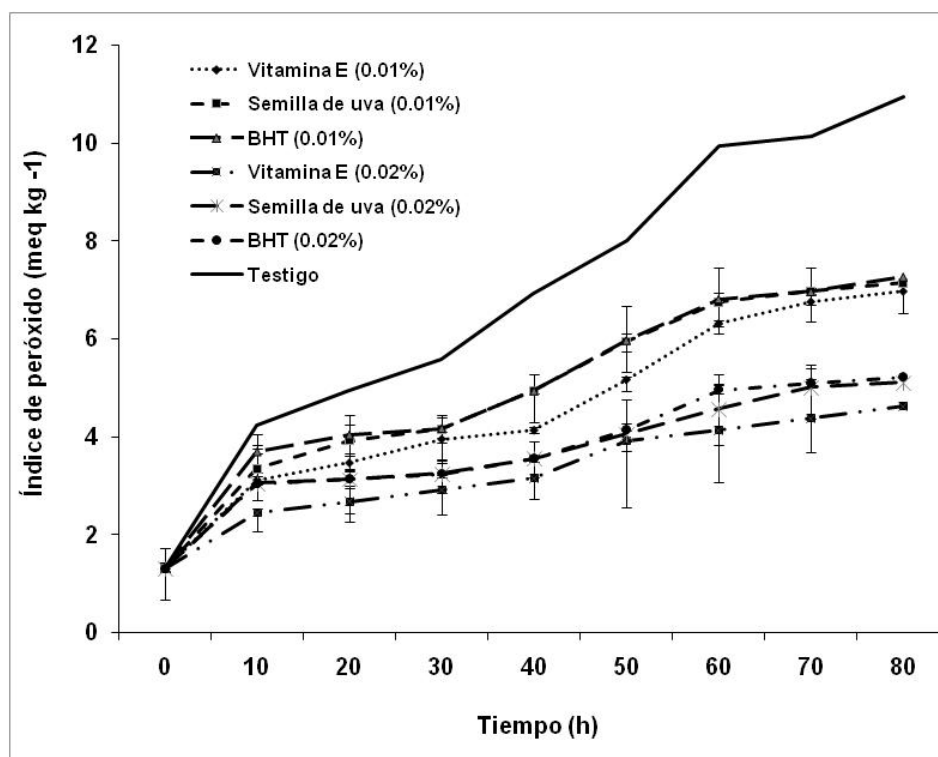


Fig. 1. Determinación del índice de peróxido del aceite de amaranto con antioxidantes naturales: vitamina E y semilla de uva al 0.01 y 0.02 (v/v) y un sintético: BHT (g/L), empleando el método

antioxidantes al 0.01 (v/v) con respecto al tiempo. A las 70 h el índice de peróxido aumentó en promedio 6.5 meq kg^{-1} en los tres antioxidantes probados; en este mismo lapso de tiempo el grupo testigo mostró un índice de peróxido de 10 meq kg^{-1} . Los tratamientos con los antioxidantes (vitamina E, semillas de uva y BHT), no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos, pero el grupo testigo sí fue diferente a los grupos tratados ($p \leq 0.05$).

Cuando se incrementó la concentración de los antioxidantes se observaron cambios cualitativos y cuantitativos (Fig. 1). En este estudio, se observó que a las 70 h el índice de peróxido de los tratamientos aumentó a 4 meq kg^{-1} , mientras que en el testigo el índice de peróxido fue de 10 meq kg^{-1} . La concentración de antioxidante de 0.02 (v/v) fue más efectiva ($p \leq 0.05$) que la de 0.01 (v/v) para preservar el aceite. Reische et al. (2002) estudiaron diferentes concentraciones de antioxidantes e indicaron que la estabilidad antioxidante del conservador debe presentar las siguientes características, tener una estabilidad oxidativa, adicionado a bajas concentraciones, obtener una máxima actividad antioxidante, y no ser prooxidante.

Por otro lado, Matissek et al. (1999) proponen una clasificación de las grasas y los aceites sometidas a pruebas aceleradas ($60 \text{ }^\circ\text{C}$ a 48 h): aceites con un índice de peróxido de 8 a 12 meq kg^{-1} se consideran estables, con un IP de 20 a 24 meq kg^{-1} la estabilidad esta condicionada de tres a cuatro meses, y si es mayor a 24 meq kg^{-1} los aceites deben refinarse ya que no son estables. Así se determinó que el aceite de amaranto refinado es estable por tiempos superiores a cuatro meses cuando se adicionan antioxidantes como los usados en este trabajo, debido a que su índice de peróxido es menor a 8 meq kg^{-1} a 70 h.

Cuantificación de la actividad antioxidante de los conservadores en el aceite de amaranto

Los resultados del efecto de los conservadores en el aceite de amaranto, se observan en la (Fig. 2).

Todos los conservadores mostraron actividad antioxidante a una concentración de 0.01 (v/v), dando una actividad antioxidante menor a

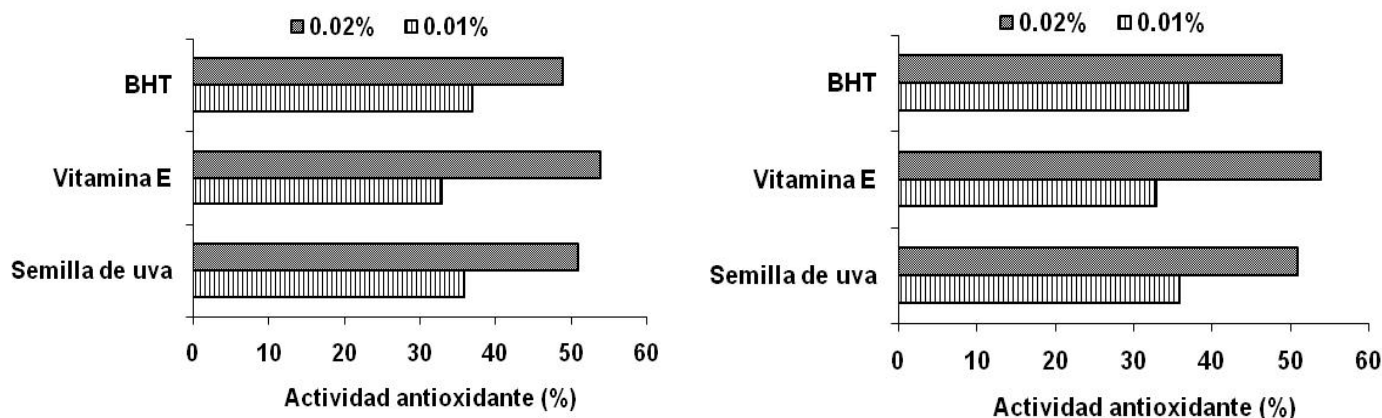


Fig. 2. Cuantificación de la conservación del aceite de amaranto con antioxidantes naturales: vitamina E y semilla de uva al 0.02 (v/v) y sintético: BHT (g/L), empleando el método acelerado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

35.3%; el antioxidante sintético (BHT) presentó una mayor actividad con 37%. Cuando la concentración de los conservadores se incrementó a 0.02 (v/v), la actividad antioxidante aumentó en la mayoría de los casos (51.3%). La vitamina E fue mejor al presentar 54% de actividad (Fig. 2), debido a que los tocoferoles donan un átomo de hidrógeno de su anillo cromano del grupo 6-hidroxi al radical peroxi, originando hidroperóxidos y radicales tocoferol-peroxi. El electrón no apareado del antioxidante se deslocaliza dentro del anillo aromático lo que estabiliza el compuesto formado y deteniendo de esta manera la oxidación del aceite (Liebler *et al.*, 1990, Simic, 1980).

El aceite de amaranto se preservó satisfactoriamente con vitamina E (α -tocoferol) a 0.02 (v/v) y 60 °C, es decir a una baja concentración del α -tocoferol y a una temperatura en la cual difícilmente se almacenaría. Al respecto, Jung & Min (1990), analizaron distintas concentraciones de tocoferoles para disminuir la oxidación del aceite de soya almacenado en la oscuridad a 55 °C, el mejor resultado fue a una concentración de 100 ppm en comparación con

las mejores concentraciones recomendadas a 250 y 500 ppm. Por otro lado, Hiroaki & Kenji (1997) utilizaron α -tocoferoles al 0.2 (m/m) sobre el aceite de sardina, el cual almacenaron a 40 °C, obtuvieron una actividad antioxidante de 71% en el aceite de sardina.

Según las Normas Mexicanas (SECOFI, 1985a y 1985b) la concentración máxima para el empleo de α -tocoferol es 0.03 (v/v) para preservar los aceites de maíz y cártamo. Entonces, se propone usar 0.02 (v/v) de α -tocoferol y almacenarlo a temperatura ambiente o en refrigeración. Al respecto, hay que mencionar que de acuerdo a la literatura, la semilla de amaranto de la especie *A. hypochondriacus* contiene 374 ppm de α -tocoferol, después de la extracción se reportan 370 ppm, (Sun *et al.*, 1997). Sin embargo se sabe que durante los procesos de refinación y blanqueo, debido al material empleado, gran parte del α -tocoferol se pierde.

Tratamiento termo-oxidativo en el aceite de amaranto

Los resultados de la prueba termo-oxidativa en el aceite de amaranto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros realizados al aceite de amaranto.

Aceites	PH (°C)	Cfi (unidades)	Cff (unidades)	IAi	IAf	Ipi (meq kg ⁻¹)	Ipf (meq kg ⁻¹)
Testigo	150±0.047	3.2±0.087	4.6±0.033	0.05±0.004	1.87±0.051	1.4±0.072	15±0.080
AAE	220±0.032	3.2±0.010	4.3±0.021	0.05±0.007	0.88±0.030	1.4±0.011	11±0.045

PH: Punto de humo. Cfi y Cff: Color fotométrico, inicial y final, IAi e IAf: Índice de acidez, inicial y final (expresado como porcentaje de ácido oleico). Ipi e Ipf: Índice de peróxido inicial y final: Ipi e Ipf. Testigo: Aceite de amaranto sin antioxidante, AAE: Aceite de amaranto con vitamina E (0.02%).

Como se puede observar, el aceite de amaranto con vitamina E tuvo un índice de acidez de 0.88 expresado como porcentaje de ácido oleico y un punto de humo superior a los 215 °C, el aceite de amaranto sin antioxidante (testigo) presentó un índice de acidez de 1.87 y un punto de humo menor a 215 °C, (Tabla 1), éste último no es adecuado para freír porque se cuantificaron una mayor cantidad de ácidos grasos libres debido a la oxidación térmica, y estos no son un buen indicador de calidad del aceite, porque reaccionan rápidamente para formar polímeros y compuestos volátiles (Paul & Mittal, 1997). Por otra parte, Psomiadou & Tsimidou (2002) reportaron que el α -tocoferol a una concentración de 100 mg kg⁻¹ retardó la degradación del aceite de oliva, siendo más apropiada cuando los productos de oxidación alcanzan concentraciones críticas, ya que este antioxidante es consumido en las primeras etapas de la oxidación, preservando el aceite.

Con respecto al cambio en el color, los tratamientos de aceite de amaranto (testigo y con antioxidante) presentaron una oxidación en el color de 1 unidad, esto debido al contenido de pigmentos como carotenos, que al incrementar la temperatura se oxidaron rápidamente (Psomiadou & Tsimidou, 2002).

En la degradación de los ácidos grasos, el testigo presentó un incremento de 6 veces en el índice de peróxido y en el aceite con antioxidante se incrementó a 5 veces este índice. Romero *et al.* (2000), reportaron que los peróxidos presentan una mayor inestabilidad bajo condiciones extremas de temperatura y estos forman productos de oxidación secundaria (compuestos polares, volátiles y polímeros) y al cuantificarlos, éste valor es bajo porque los peróxidos tienden a descomponerse a 180 °C.

El aceite de amaranto con antioxidante y

posiblemente el contenido de escualeno se mantuvo estable, ya que se encontró un total 12 g de escualeno por kg de aceite; este hidrocarburo insaturado presenta propiedades antioxidantes, como lo reportaron Bolla & Hughes (1949), cuando investigaron la autooxidación del escualeno a 55 °C y dedujeron que por cada molécula oxidada de escualeno dos moléculas de oxígeno son consumidas, debido a la reacción del escualeno con el radical libre y la formación final de un diperoxido. Indicaron que los radicales ciclan de forma más eficiente la molécula de escualeno que un átomo de hidrógeno, debido al espacio entre los dobles enlaces del escualeno que favorece la ciclización de los radicales peroxi. Además, mencionan que los productos de la oxidación del escualeno permanecen invariables durante un parámetro de absorción de oxígeno, de modo que no pueden participar enérgicamente en la propagación de las reacciones. Hay que destacar que el contenido de escualeno en el aceite de amaranto se encuentra en el intervalo descrito en la Legislación de la Comunidad Europea, que es de 8 a 12 g kg⁻¹, para evaluar la calidad del aceite de oliva virgen (Lanzón *et al.*, 1994).

Tratamiento de foto-oxidación en el aceite de amaranto

Los resultados de la prueba de foto-oxidación en el aceite de amaranto se muestran en la Fig. 3. Como se puede observar, en general, existe un incremento del índice de peróxido en los diferentes tratamientos con el antioxidante al 0.02 (v/v) con respecto al tiempo. A las 35 h de estudio el índice de peróxido se incrementó en promedio 15 meq kg⁻¹ con el antioxidante probado, lo cual incrementó la oxidación de los ácidos grasos por la formación de los hidroperóxidos. La alta

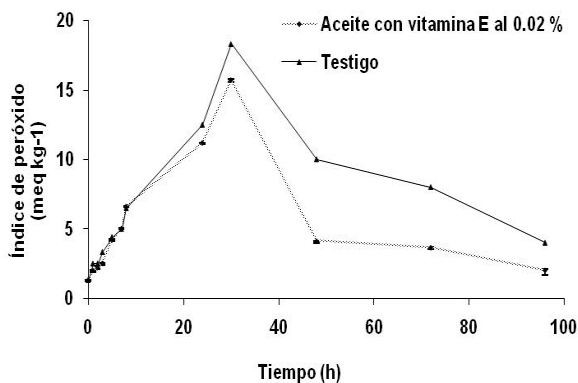


Fig. 3. Tratamiento de foto-oxidación del aceite de amaranto

reactividad del grupo metileno adyacente al doble enlace, es acelerado por la luz, debido a que la energía luminosa presenta longitudes de onda más corta que origina efectos perjudiciales en un menor tiempo en comparación con la oxidación por el oxígeno (Sattar *et al.*, 1976). En el aceite de amaranto se formaron reacciones de oxidación y esto ocasionó la presencia de olor a rancio, indicativo de la producción de compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos sustituidos, aldehídos, alcoholes y cetonas (Ceballos *et al.*, 2003); por otro lado en este mismo lapso de tiempo el grupo testigo mostró un índice de peróxido de 18 meq kg^{-1} . Es decir, el antioxidante retardó la degradación del aceite ($p < 0.05$), sin embargo se presentó al mismo tiempo que en el testigo.

Es muy probable que la presencia de escualeno en el testigo (12 g kg^{-1} de aceite) haya favorecido su conservación como reportan Psomiadou & Tsimidou (1999), quienes indican que 7 g kg^{-1} de escualeno es suficiente para retardar los efectos de la oxidación en el aceite de oliva virgen.

CONCLUSIONES

La vitamina E a una concentración de 0.02 (v/v) proporcionó al aceite de amaranto un efecto protector de 54% de actividad antioxidante, lo cual mantuvo estables a los ácidos grasos y no presentó el olor a rancio característico de deterioro, ya que los productos de oxidación (hidroperóxidos) y los procesos de auto-oxidación de los ácidos grasos fueron mínimos. Por tanto, la vitamina E al 0.02 (v/v) es el mejor antioxidante de los tres estudiados y, además, es un producto natural. El resultado del 54% de efecto protector indica que el aceite de amaranto se puede almacenar por cuatro meses, de lo cual se infiere que si el aceite se almacena a temperatura ambiente, el índice de peróxidos sería menor y se podría almacenar por periodos más prolongados. El aceite de amaranto con vitamina E a una concentración de 0.02 (v/v), se puede utilizar para freír porque tiene un punto de humo de $220 \text{ }^\circ\text{C}$, manteniendo su olor y sabor característico. Además, tiene un efecto protector sobre los ácidos grasos, sin embargo al exponerlo a la luz, el aceite incrementó los productos de oxidación (hidroperóxidos) y los procesos de auto-oxidación de los ácidos grasos y presentó el olor a rancio característico de deterioro, por lo tanto el aceite de amaranto debe almacenarse donde no incidan los rayos de luz directamente.

REFERENCIAS

- Allen RR, Formo MW, Krishnamurthy RG, Mcdermott GN, Norris AF & Sonntag OV (1982) *Bailey's industrial oil and fat products. In: Physical properties of fats and fatty acids.* Swern D (ed). John Wiley & Sons, New York, pp. 666-679.
- Amunziata C, Massaro M & Siculella L (1999) Oleic acid inhibits endothelial activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 220-228.

Artículos

AOAC (2005) Official methods of analysis of AOAC international. *In: Fats and oils*. Horwitz W (ed). AOAC International, Maryland, USA., pp. 963-967.

Ariza OJA, López VF, Montalvo PC, Arellano HA & Luna SS (2004) Desgomado y neutralizado del aceite de amaranto. *C. Tecnol. Alim. (Cuba)*. 14: 28-32.

Badui JS (1998) Química de los alimentos. *En: Lípidos*. Longman de México (eds). Alambra, España., pp. 158-200

Belton PS & Taylor JRN (2002) Grain properties and utilization potential, pseudocereals and less common cereals. Springer-Verlag, Berlin.

Bolland JL & Hughes H (1949) The primary thermal oxidation product of squalene. *J. Chem. Soc.* 26: 492-497.

Chaturvedi A, Sarojini G, Nirmala G, Nirmalamma N & Satyanarayana D (1997) Glycemic index of amaranth grain, wheat and rice in NIDDM subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* 50: 171-178.

Ceballos C, Moyano MJM, Vicario I & Heredia JF (2003) Chromatic evolution of virgin olive oil submitted to an accelerated oxidation test. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 80: 257-262.

CODEX (1981) Norma del CODEX para Grasas y Aceites Comestibles No Regulados por Normas Individuales, Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO, Roma., pp. 1-5.

Fennema OR (2000) Química de los Alimentos. Acirbia, España. Fritch CW (1981) Measurements of frying-fat deterioration: a brief review. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 54: 234-238.

He H, Cai PY, Sun M & Corke H (2002) Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *J. Agric. Food Chem.* 50: 368-372.

Hiroaki S & Kenji I (1997) Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 74: 1531-1536.

Hudson BJ & Mahgoub SE (1981) Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidants in leaf lipids. *J. Sci. Food Agric.* 32: 208-210.

Jung MY & Min DB (1990) Effects of α -, γ -, and δ -tocopherols on the oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.* 55: 1464-1465.

King JM & Min DB (2002) Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D2. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 583-587.

Lanzón A, Albi T, Cert A & García J (1994) The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 71: 285-291.

Lehman JW (1996) Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World.* 41: 369-441.

Liebler DC, Baker PF & Kaysen KL (1990) Oxidation of vitamin E: evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reaction of the tocopheroxyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 6995-7000.

Marcone FM (2000) First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). *J. Agric. Food Chem.* 48: 378-382.

Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV & Zolodov VI (2007)

Artículos

Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis.* 6: 1-12.

Matissek R, Schnepel MF & Sterner G (1999) Análisis de los Alimentos. *En: Fundamentos, Métodos y Técnicas.* Bosch JM (ed). Acirbia, España., pp. 297-302.

Paul S & Mittal GS (1997) Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat /oil food frying. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 635-662.

Peeled N, Gutfinger T & Letan A (1975) Effect of water and BHT on stability of cottonseed oil during frying. *J. Food Sci. Agric.* 26: 1655-1668.

Psomiadou E & Tsimidou M (1999) On the role of squalene in olive oil stability. 2. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4025-4032.

Psomiadou E & Tsimidou M (2002) Stability of virgen olive. 2. Photo-oxidation studies, *J. Agric. Food Chem.* 50: 722-727.

Reische DW, Lillard DA & Eitenmiller RR (2002) Antioxidants. *In: Food lipids.* Akoh CC & Min DB (ed). New York: Marcel Dekker, pp. 489-516.

Romero A, Cuesta C & Sánchez-Muñiz FJ (2000) Cyclic fatty acid monomers and thermoxidative alteration compounds formed during frying of frozen foods in extra virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1169-1175.

SAGARPA (2004) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *En: Anuario Estadístico de Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.* Por Cultivo., Secretaría de Salud, p. 65.

SAS Institute (1996) SAS User's Guide Statistics. *Statistical Analysis System.* Cary NC

versión 6.1.

Sattar A, DeMan JM & Alexander JC (1976) Effect of wavelength on light-induced quality deterioration of edible oils and fats. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9: 108-113.

SECOFI (1985a) Norma Mexicana NMX-F-030-1985. *En: Alimentos-Aceite comestible puro de maíz.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., p. 7

SECOFI (1985b). Norma Mexicana NMX-F-161-1985. *En: Alimentos-Aceite comestible puro de cártamo.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., p. 5.

SECOFI (1987a). Norma Mexicana NMX-F-154-1987. *En: Determinación del índice deperóxido.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.

SECOFI (1987b). Norma Mexicana NMX-F-101-1987. *En: Determinación del índice de acidez.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.

Simic MG (1980) Kinetic and mechanistic studies of peroxy, vitamin E, and anti-oxidant free radicals by pulse radiolysis. *In: Autoxidation in food biological systems.* Simic MG & Karel M (eds). New York: Plenum Press, pp. 17-26.

Soren BE (1997) Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 74: 1495-1508.

Sun H, Wiesenborn D, Rayas-Duarte P, Mohamed A & Hagen K (1997) Bench-scale Processing of amaranth seed for oil. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 17: 413-418.

Tudor F & Bean G (1985) A comparison of the fatty acids and sterols of seeds of weedy and vegetable species of *Amaranthus spp.* *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 62: 89-91.



www.smbb.com.mx