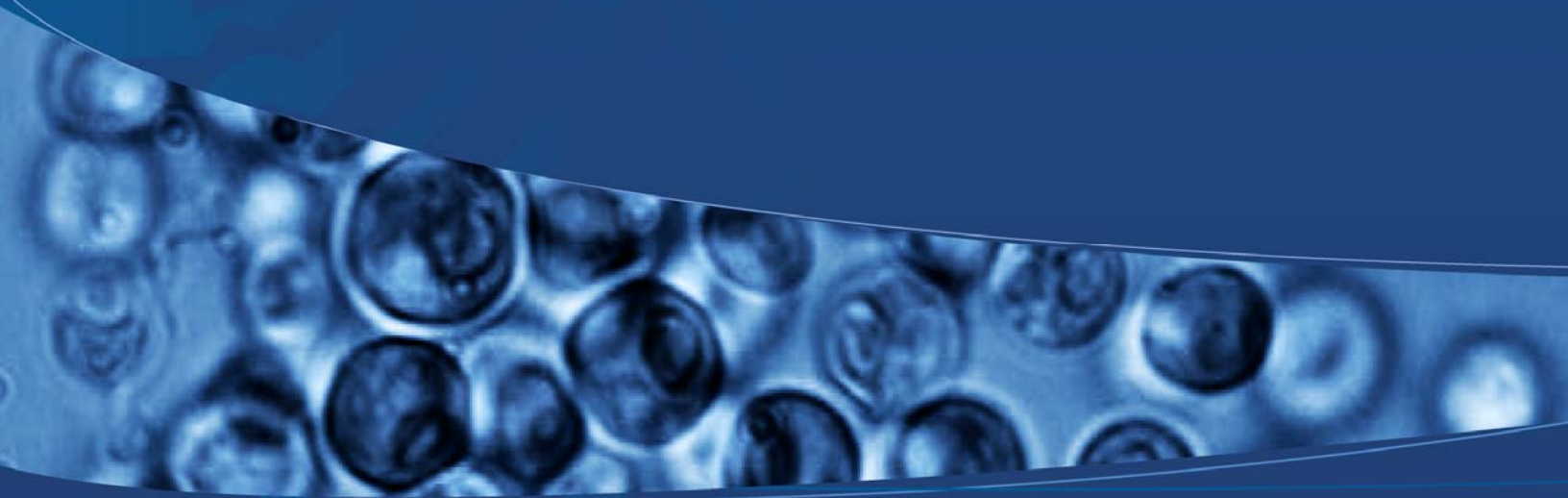


Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.



Año 2010 Volúmen 14 Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



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

Q.A. Ofelia Edith Carreón Rodríguez

FORMACION EDITORIAL

Q.A. Ofelia Edith Carreón Rodríguez

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

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

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

ADSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

Q.A. Ofelia Edith Carreón Rodríguez
Tel: (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 Título04-1999-082516265000-101. 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 6

ARTÍCULOS

Cultivo Monoxénico Sumergido del Nematodo Entomopatígeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor *airlift* con Recirculación Interna 11

Técnica de PCR Como Estrategia Biotecnológica Para Detección de *Helicobacter pylori* en Placa Dental 25

La Bionanotecnología y otras Estrategias de Neuroprotección para la Enfermedad de Parkinson 37

“Biotecnología y Bioingeniería: Tiempo de decisiones y acciones”

A lo largo de los siglos, la especie a la que pertenecemos ha desarrollado distintos métodos para asegurar su permanencia en el mundo, tal como lo conocemos al día de hoy. En este sentido, hemos buscado fuentes de alimento, tanto animal como vegetal, y domesticado especies para estos fines; hemos localizado y modificado recursos hídricos en nuestro beneficio, así como explotado fuentes naturales de energía y desarrollado aplicaciones para aprovechar otras originalmente no disponibles en abundancia en nuestro entorno, entre otras acciones que han dejado huella permanente de nuestros pasos en el planeta. Estas acciones han estado relacionadas con importantes avances científicos y tecnológicos en todas las áreas del conocimiento humano, así como han sido acompañadas de innegables beneficios para la gente como la disponibilidad de alimentos procesados, antibióticos, vacunas y otros medicamentos; ahora contamos con diversas máquinas y dispositivos inconcebibles hace unos cuantos años, etc. No obstante, los riesgos inherentes a nuestras acciones al buscar la supervivencia y prevalencia de la especie han sido importantes, así como en algunos casos el uso de los conocimientos adquiridos han sido muy cuestionables (v. gr. tecnologías con fines militares).

Específicamente, en cuanto a las acciones realizadas que implicaron/implican consecuencias negativas importantes, se pueden mencionar algunos casos. Por ejemplo, el establecimiento de asentamientos humanos ha sido frecuentemente acompañado de deforestación, cobertura de grandes superficies con cemento y asfalto, uso de grandes cantidades de agua para alimentación y servicios, y consumo de combustibles fósiles, así como la generación de cantidades industriales de basura, lo cual ha ocasionado un serio problema de contaminación del agua, aire y suelo, y contribuido al calentamiento global del planeta, de acuerdo con distintos reportes científicos. Por otra parte, con relación a la producción agrícola determinante para la autosuficiencia alimentaria, entre otros aspectos, ha existido un abuso histórico bien documentado, referente al uso de sustancias sintetizadas químicamente con distintos fines (v. gr. fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, rodenticidas, etc.) con el fin último de garantizar altas productividades y rendimientos en la agricultura moderna. Estas prácticas también han generado una serie de problemas, ya que diversos estudios sugieren la correlación entre concentraciones de los principios activos usados con la aparición de enfermedades en nuestra especie, daños al medio ambiente, así como afectación de cadenas alimentarias. Sobre estos últimos aspectos, específicamente sobre control de plagas agrícolas, una alternativa viable parece ser el llamado manejo integrado de plagas que a su vez combina distintas estrategias, siendo una de ellas el control biológico de plagas, que se refiere al uso de enemigos naturales para controlar poblaciones de organismos que afectan nuestros cultivos. Sólo a través de la búsqueda e

implementación de alternativas adecuadas y funcionales para cada problemática que nos afecta es como podremos asegurar la permanencia de nuestra especie en armonía con las diversas especies con las que cohabitamos en este mundo, lo cual incluye desde organismos unicelulares microscópicos hasta los multicelulares más evolucionados y complejos.

Es a propósito de estas ilustraciones generales que los biotecnólogos mexicanos podríamos meditar una vez más acerca de nuestro papel como integrantes de esta sociedad: ¿Qué investigamos?, ¿Por qué y para qué investigamos lo que investigamos?; en este sentido, ¿Qué enseñanzas dejamos a nuestros jóvenes colaboradores y futuros investigadores?, ¿Qué importancia puede tener el auténtico trabajo en equipo?, ¿Cuáles pueden ser los beneficios de los enfoques multidisciplinarios sobre nuestros objetos de investigación?... Cualesquiera que sean las conclusiones de nuestras reflexiones personales o aquellas que se generen de la discusión formal o informal sobre los aspectos aquí resaltados, en lo que probablemente estaremos de acuerdo es que no queda mucho tiempo para encontrar alternativas y sobre todo, para llevarlas a la práctica. Por otra parte, no tenemos duda de que contamos con las capacidades y creatividad suficientes para hacer frente a estos retos, lo cual debemos demostrar cabalmente, a través del trabajo coordinado con otros actores involucrados (v. gr. Sector gubernamental e inversores privados, entre otros), ¿O alguien lo duda?

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Profesor Investigador Titular

Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria

<http://biotecnologiauaeh.sitiosprodigy.mx>

Instituto de Ciencias Agropecuarias,

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

E-mail: norberto@uaeh.edu.mx

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 un máximo de 25 páginas, 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 genética para hacer

Instrucciones para los autores

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 tamaño 14. El título deberá estar centrado.

Instrucciones para los autores

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 se pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente 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 de una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Instrucciones para los autores

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 & Solís 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. 3^a 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.

Instrucciones para los autores

Para tesis de pre y posgrado:

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 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.

Cultivo Monoxénico Sumergido del Nematodo Entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor *airlift* con Recirculación Interna

Gabriela Maciel-Vergara, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández, Norberto Chavarría-Hernández*

Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo. CP 43600, México.

E-mail: norberto@uaeh.edu.mx

RESUMEN

El presente artículo trata acerca del cultivo sumergido del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, y su bacteria simbiote, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor con agitación neumática, del tipo *airlift* con recirculación interna, usando un medio de cultivo complejo que contiene 10% (volumen/volumen, v/v) aguamiel de agave (*Agave* spp.), 2% v/v aceite de maíz, 1% (peso/volumen, p/v) yema de huevo deshidratada, 0.5% p/v NaCl y 1% p/v extracto de levadura. Se realizaron dos corridas de fermentación, F1 y F2, expresándose las condiciones de operación en términos del número adimensional de Reynolds (Re), como índice de las condiciones hidrodinámicas, y del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, k_La , como indicador de las condiciones de oxigenación imperantes durante los bioprocesos. Los experimentos comenzaron con aproximadamente 1,000 nematodos en fase infectiva juvenil (IJ) por mililitro (ml) de medio, alcanzándose al día 16, 127,220 y 92,897 nematodos/ml con 99.7% y 96.5% en fase IJ, en las corridas F1 y F2, respectivamente. Las propiedades reológicas de los caldos de fermentación evolucionaron del comportamiento dilatante al inicio, a casi Newtoniano al final de los experimentos, y las condiciones de operación cambiaron notablemente, involucrando valores del número Re de 80 a 4,900 y del k_La en el intervalo de 3.1×10^{-3} a $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. La máxima concentración de fases IJ, 126,882 por ml, fue alcanzada en la fermentación F1.

Palabras clave: biorreactor *airlift*, hidrodinámica, transferencia de oxígeno, nematodos entomopatógenos, biocontrol, variedades silvestres.

ABSTRACT

The present article reports on the submerged culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, isolated within the state of Hidalgo, Mexico, and its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, in an internal-loop *airlift* bioreactor using a complex culture medium containing 10% (volume/volume, v/v) agave sap from *Agave* spp., 2% v/v corn oil, 1% (weight/volume, w/v) dried egg yolk, 0.5% w/v NaCl and 1% w/v yeast extract. Two fermentation runs, F1 and F2, were carried out at operating conditions expressed in terms of the dimensionless Reynolds number (Re), as an index of hydrodynamics, and the volumetric oxygen transfer coefficient (k_La), as an index of oxygen transfer conditions, during the bioprocesses. Experiments initiated with 1,000 infective juvenile stage nematodes (IJ) per millilitre (ml), approximately, and at the day 16, they achieved 127,220 and 92,897 nematodes/ml with 99.7% and 96.5% in IJ stage, corresponding to F1 and F2 runs, respectively. Culture broth rheological properties evolved from the dilatant behaviour to nearly the Newtonian one at the end. Also, operating conditions changed notably involving values of Re from 80 to 4,900, and k_La from 3.1×10^{-3} to $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. The maximum IJ concentration, 126,882 per ml, was achieved within F1 run.

Keywords: *airlift* bioreactor, hydrodynamics, oxygen transfer, entomopathogenic nematodes, biocontrol, indigenous strains.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del uso excesivo de sustancias químicas en la agricultura, se han reportado efectos ecológicos negativos como contaminación de suelo y agua, impactos en las cadenas alimentarias, así como efectos sobre la salud humana (<http://www.fao.org/ag/magazine/0205sp2test.htm>; <http://www.fao.org/ag/magazine/0504sp2.htm>). Particularmente, el abuso en el uso de sustancias con actividad insecticida es preocupante. En este sentido, el control biológico ha mostrado ser una alternativa viable para el control de un amplio número de insectos plaga (Hajek, 2004). Específicamente, el uso de las llamadas fases

infectivas juveniles (IJ) de nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, ha mostrado ser efectivo en ciertos sistemas agrícolas para controlar larvas de insectos plaga como escarabajos en viñedos y pastos (i. e., *Otiorhynchus sulcatus* y *Pachnaeus* spp.; Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Tanto steinernemátidos como heterorhabdítidos han establecido relaciones evolutivas simbióticas con bacterias Gram negativas de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, las cuales pueden presentar dos fenotipos, siendo únicamente la llamada fase I, esencial para la actividad entomopatógena así como

para la reproducción de los nematodos (Forst *et al.*, 1997). La bacteria es acarreada en el intestino del IJ, el cual es el único estadio de desarrollo de los NEP que puede vivir fuera del insecto huésped y tiene la habilidad de buscar a su presa e invadirla, liberando a su bacteria simbionte en la hemolinfa del insecto, donde ésta prolifera produciendo toxinas y enzimas que son responsables de la muerte del insecto y su bioconversión en una sopa nutritiva ideal para el crecimiento y reproducción de los NEP, lo cual ocurre hasta que los nutrientes se agotan, momento en el que se induce una nueva generación de IJ que abandona la carcasa del insecto en búsqueda de nuevos huéspedes (Forst & Clarke, 2002). Por lo anterior, la producción masiva de fases IJ de NEP es de interés actual. En este sentido, de acuerdo con distintos autores la mejor opción tecnológica para producir NEP es el cultivo monoxénico sumergido usando biorreactores (Ehlers, 2001; Chavarría-Hernández *et al.*, 2008) aunque los NEP de mayor "calidad" se obtienen mediante el cultivo in vivo. Actualmente, aunque algunas compañías en el mundo producen distintas especies de NEP mediante el cultivo monoxénico sumergido (<http://www.sipweb.org/DirectoryMCP/nematodes.htm>), los resultados obtenidos son muy variables por lo que esta tecnología debe ser mejorada. En particular, para disponer de bioprocesos más confiables para la producción de NEP, se requieren más estudios concernientes a la formulación de medios de cultivo, cinética del crecimiento poblacional de los NEP, diseño de biorreactores así como exploración de mejores condiciones de

operación. Más aún, son escasos los estudios relacionados con los efectos de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno durante la producción de NEP (Chavarría-Hernández *et al.*, 2007), aunque hay algunos reportes dedicados a otros aspectos durante su producción usando distintos tipos de biorreactores (Pace *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1991; Surrey & Davies, 1996; Ehlers *et al.*, 1998; Strauch & Ehlers, 2000; Neves *et al.*, 2001; Johnigk *et al.*, 2004).

Por otra parte, en un afán de conservar o alterar lo menos posible la biodiversidad existente en los distintos ecosistemas, la práctica del biocontrol de insectos plaga mediante el uso de NEP actualmente tiende a usar preferentemente especies de NEP endémicos de las zonas geográficas donde éstos serían aplicados para el biocontrol (Campos-Herrera *et al.*, 2007), en lugar de usar especies exóticas aisladas de nichos ecológicos diferentes, que por otra parte aún continúa siendo la práctica más ampliamente usada en muchos agrosistemas. Más aún, se ha reportado que el uso de especies nativas de NEP es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias.

Con base en lo anterior, el presente estudio trata sobre la producción masiva del NEP, *Steinernema carpocapsae* CABA01 aislado en el estado de Hidalgo, México, mediante el cultivo monoxénico sumergido usando un biorreactor agitado neumáticamente, del tipo *airlift* con recirculación interna a través de un cilindro

concéntrico. Uno de los intereses principales fue el establecer cómo cambian las condiciones del proceso con el tiempo, para lo cual el número de Reynolds (Re) y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$), fueron tomados como indicadores de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno imperantes durante las fermentaciones, respectivamente. Para lograr lo anterior, la evaluación de la viscosidad aparente (η_a) del caldo de fermentación fue de gran importancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes biológicos

Fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 fueron mantenidas en suspensiones acuosas (300,000 IJ/ml) en botellas para el cultivo de células, a 4°C y periodos de agitación de 15 min cada 15 d para proporcionar el oxígeno requerido. Los NEP fueron aislados de muestras de suelo de Alcholoaya, en el estado de Hidalgo, México, e identificados por métodos de morfometría y biología molecular (Pérez-Santos, 2009).

X. nematophila en fase I, fue conservada en viales de 2 ml en 25% p/v glicerol a -80°C (10^9 células por vial). La bacteria simbiótica fue aislada de cultivos en NBTA (Akhurst, 1980) estriados con hemolinfa de larvas del último instar de *Galleria mellonella* previamente infectadas con fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 (Woodring & Kaya, 1988). La bacteria fue identificada mediante secuenciación del gene 16s rADN y pruebas bioquímicas (Martínez-Rodríguez, 2008)

Medios de cultivo

Medio STB (Buecher & Popiel, 1989). 3% p/v caldo de soya tripticasa y 0.5% p/v extracto de levadura. pH 7.

Agar NBTA (Akhurst, 1980). 2.3% p/v agar nutritivo, 0.0375% p/v azul de bromotimol y 0.004% p/v cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). pH 8.5.

Medio MA10 (Modificado de Islas-López *et al.*, 2005). 10% v/v aguamiel de *Agave* spp., 2% v/v aceite de maíz, 1% p/v yema de huevo deshidratada, 0.5% p/v NaCl, 1% p/v extracto de levadura. Se usó 0.3 ml de antiespumante A [100% base silicón] (SIGMA-Aldrich) por cada litro de medio. pH de 7.5.

Cultivo monoxénico sumergido de Steinernema carpocapsae CABA01

Un vial de conservación de *X. nematophila* se inoculó en 420 ml de medio STB y se incubó a 150 rpm y 30°C durante 48 h. Muestras de este cultivo fueron estriadas sobre placas de NBTA para verificar la presencia de la fase I bacteriana, la cual absorbe al azul de bromotimol dando lugar a colonias azul oscuro, mientras que la fase II bacteriana no absorbe este colorante, además de reducir al TTC dando lugar a colonias rojas (Akhurst, 1980). El caldo-STB fue posteriormente bombeado al biorreactor *airlift* con recirculación interna (Fig. 1) que contenía 3.8 l de medio MA10 estéril. El biorreactor fue previamente sanitizado durante 1.5 h con vapor saturado a 98°C. Luego, el cultivo bacteriano fue incubado a 30°C con

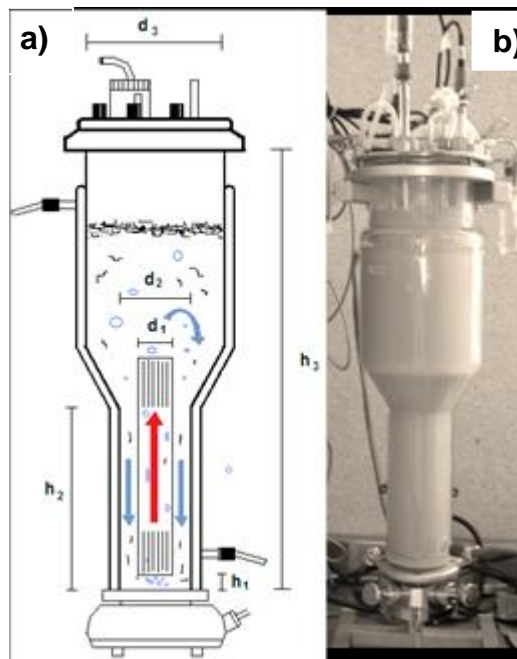


Fig. 1. Biorreactor *airlift* con recirculación interna usado para el cultivo sumergido del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, y su bacteria simbiote, *Xenorhabdus nematophila*. El volumen de trabajo fue 4.2 l y las fermentaciones se desarrollaron a 22°C y aireación variable (1 a 1.5 vvm) durante 16 días. a) Esquema del biorreactor mostrando la sección de flujo ascendente a través del tubo concéntrico interno, así como la sección de flujo descendente a través del espacio anular entre los cilindros, creándose un patrón de flujo principal en la dirección axial. Dimensiones principales: d_1 , 5.16 cm; d_2 , 6.25 cm; d_3 , 13 cm; h_1 , 2 cm; h_2 , 21 cm; h_3 , 54 cm. b) Fotografía del biorreactor.

aireación de 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm) durante 48 h. Trascurrido este tiempo, fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 fueron inoculadas hasta una concentración de 1,000 IJ/ml aproximadamente, cambiándose la temperatura de proceso a 22°C con aireación variable de 1 a 1.5 vvm hasta el final de los experimentos. Se realizaron dos corridas de fermentación (i. e., F1 y F2).

Concentración de nematodos viables (nematodos/ml)

Cada 2 d se tomó una muestra de 10 ml de caldo de fermentación para determinar la

concentración de nematodos viables. Dependiendo de la concentración de nematodos, las muestras de caldo de fermentación fueron diluidas de 10^{-1} a 10^{-3} con solución salina isotónica. Muestras diluidas de 0.1 ml fueron colocadas en portaobjetos excavados para la cuenta de NEP bajo el microscopio de campo claro (aumentos, 40× y 100×). Los NEP móviles o inmóviles pero de aspecto “normal” fueron considerados como viables.

Propiedades reológicas.

Cada 4 d se tomó 30 ml de caldo para determinar las propiedades reológicas de los

caldos de fermentación. Éstas fueron evaluadas en un reómetro de esfuerzos controlados AR-2000 TA Instruments usando la geometría *vane rotor*. Las muestras fueron sometidas a cizalla de 50 a 600 s⁻¹ (tanto en sentido ascendente como descendente para eliminar posibles dependencias con el tiempo) a 25°C durante un periodo acumulado de 37 min. El comportamiento reológico fue descrito con el modelo de Ostwald-de Waele (Ecuación 1)

donde τ (Pa) es el esfuerzo de cizalla, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) es la cizalla, y K (Pa·sⁿ) y n (adimensional) son los índices de consistencia y comportamiento al flujo, respectivamente.

$$\tau = K \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (1)$$

Determinación de la viscosidad aparente del caldo de fermentación, η_a (Pa·s)

Primero, las componentes de velocidad en el reactor fueron consideradas como $v_\theta=v_r=0$ y $v_z \neq 0$. Luego, el valor promedio de $\dot{\gamma}$ (i. e., $\dot{\gamma}_a$) fue estimado de acuerdo con lo siguiente:

a) Sección de ascenso (sa). La velocidad superficial del gas fue estimada con la Ecuación 2, donde Q es el flujo de aire (l/s) y A_{sa} es el área transversal al flujo (20.91 cm²)

$$v_{sg} = \left(\frac{Q}{A_{sa}} \right) \quad (2)$$

El valor $\dot{\gamma}_{a-sa}$ fue determinado con la Ecuación 3, si $v_{sg} \geq 0.04$ m/s, o la Ecuación 4, si $v_{sg} \leq 0.04$ m/s (Li *et al.*, 1995)

$$\dot{\gamma}_{a-sa} = 5000 \cdot v_{sg} \quad (3)$$

$$\dot{\gamma}_{a-sa} = 5000 \cdot v_{sg}^{0.5} \quad (4)$$

b) Sección de descenso (sd). En esta sección del sistema, el valor $\dot{\gamma}_{a-sd}$ fue estimado con la Ecuación 5 (Al-Masry & Al-Ahmed, 2005) la cual considera el valor v_{sg} de la sección de ascenso, la razón de áreas transversales al flujo (A_{sd}/A_{sa}) (siendo $A_{sd}=6.40$ cm² y $A_{sa}=20.91$ cm²) y la altura de la sección de descenso ($h_{sd}=35.3$ cm).

$$\dot{\gamma}_{a-sd} = 4800 \cdot v_{sg}^{1.86} \left(1 + \frac{A_{sd}}{A_{sa}} \right)^{-0.14} (h_{sd})^{0.48}$$

(5)

Una vez contando con los valores de cizalla promedio por sección, los correspondientes valores de viscosidad aparente fueron determinados con la Ecuación 6.

$$\eta_a = K \left(\dot{\gamma}_a \right)^{n-1} \quad (6)$$

Determinación de las condiciones hidrodinámicas durante las fermentaciones

El número de Reynolds (Re) fue usado como un índice de las condiciones hidrodinámicas imperantes y fue calculado con la Ecuación 7, donde D_H es el diámetro hidráulico igual a $4R_H$, siendo R_H el radio hidráulico igual a la razón (área transversal al flujo)/(perímetro mojado) (Tilton, 1999).

$$Re = \frac{D_H v \rho}{\eta_a} \quad (7)$$

Se consideró la densidad del caldo de fermentación como $\rho=1,000 \text{ kg/m}^3$.

a) Sección de ascenso. En esta sección, el valor de Re fue determinado considerando la velocidad v igual a v_{sg} (m/s).

b) Sección de descenso. Aquí, el número Re fue calculado usando la velocidad promedio de descenso $v=Q/A_{ad}$, la cual fue estimada considerando que el gas inyectado “bombea” aproximadamente un flujo volumétrico de medio de cultivo similar a Q , el cual luego de desgasificarse cuando abandona la zona de ascenso, se mueve hacia la base del reactor a través del ánulo.

Estimación de las condiciones de oxigenación durante las fermentaciones

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $k_L a$, fue considerado como un índice de la eficiencia de oxigenación lograda durante los bioprocesos y fue estimado mediante la Ecuación 8 (Li *et al.*, 1995). Los valores empleados de v_{sg} fueron a su vez determinados mediante las Ecuaciones 3 o 4, según correspondiese.

$$k_L a = 0.0343 \cdot v_{sg}^{0.524} \eta_a^{-0.255} \quad (8)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En principio, durante el desarrollo de las fermentaciones, *X. nematophila*, permaneció principalmente en fase I, lo cual fue sugerido por el desarrollo abundante de colonias azules al crecer en NBTA. Sin embargo, a partir del día 8, el crecimiento de colonias rojas se incrementó

gradualmente sugiriendo un cambio bacteriano a la fase II (Akhurst, 1980). Por otra parte, la Fig. 2 presenta el aspecto exhibido por distintos estadios de desarrollo de los nematodos durante las fermentaciones

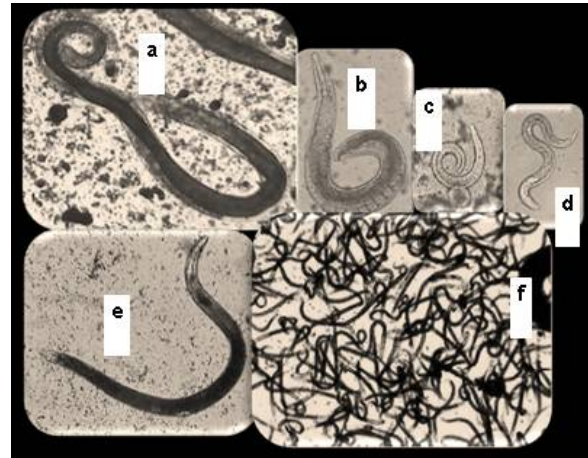


Fig. 2 Fotografías de campo claro de distintos estadios de desarrollo de *Steinernema carpocapsae* CABA01, durante su cultivo sumergido en presencia de su simbiote bacteriano, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. a) Hembra adulta de primera generación a $t=4$ d (longitud, $3,800 \mu\text{m}$; $40\times$); b) Macho adulto de primera generación a $t=4$ d (longitud, $1,600 \mu\text{m}$; $100\times$); c) juvenil de primera etapa a $t=4$ d (longitud, $200 \mu\text{m}$; $400\times$); d) juvenil de segunda etapa a $t=6$ d (longitud, $320 \mu\text{m}$; $200\times$); e) hembra adulta de segunda generación a $t=12$ d (longitud, $1,200 \mu\text{m}$; $40\times$); f) fases infectivas juveniles a $t=8$ d (longitud, $630 \mu\text{m}$; $40\times$)

Evolución de la concentración de nematodos

Las Figuras 3a y 3b presentan la evolución de las concentraciones de nematodos totales y de fases IJ durante las corridas realizadas en el presente trabajo. Las correspondientes concentraciones iniciales fueron $1,330 \text{ IJ/ml}$ (Desviación estándar, $DE=63$) y $1,064 \text{ IJ/ml}$ ($DE=146$), para las corridas F1 y F2,

respectivamente. Por otra parte, la máxima concentración total de NEP de 127,220 por ml (DE=16,330) con 99.7% IJ al final (126,882 IJ/ml) se alcanzó en el experimento F1. Los

resultados correspondientes al experimento F2 fueron 92,897 NEP/ml (DE=24,061) con 96.5% IJ (i.e., 89,667 IJ/ml). Este es el primer

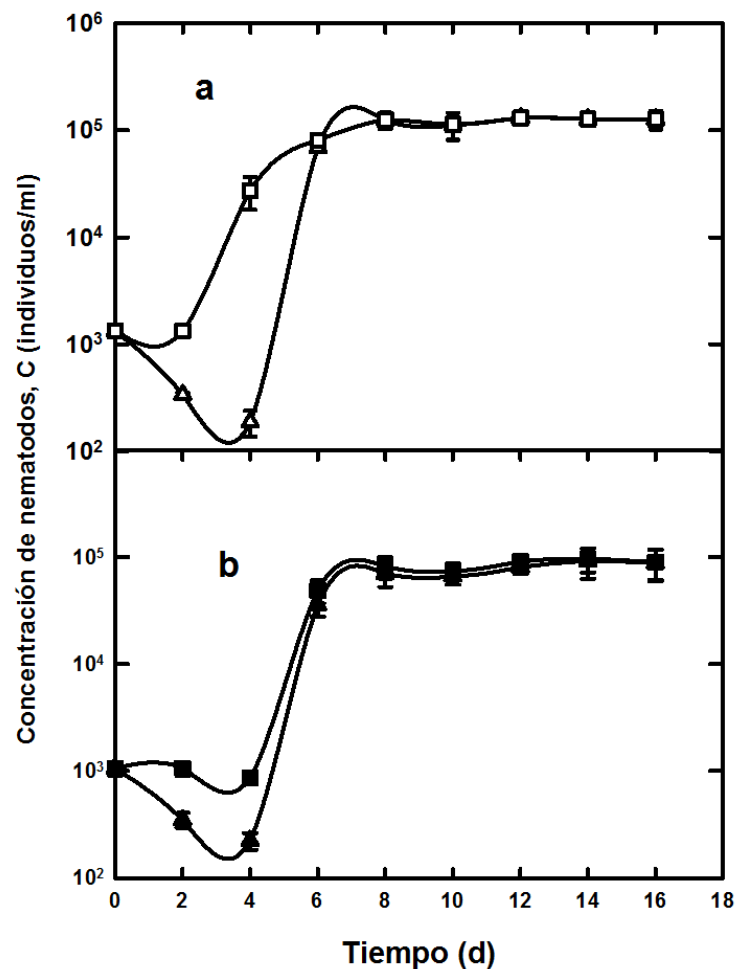


Fig. 3 Evolución de las concentraciones del total de nematodos viables (cuadros) y de fases infectivas juveniles (triángulos) durante el cultivo sumergido de *Steinerinema carpocapsae* CABA01 y su bacteria simbiótica, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. a) Corrida F1; b) corrida F2. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 conteos independientes.

reporte sobre la propagación masiva de steinernemátidos aislados en México, mediante el uso de biorreactores del tipo *airlift* con recirculación interna. De hecho, existen pocos

reportes acerca de la producción de steinernemátidos usando biorreactores agitados neumáticamente. Anteriormente, Chavarría-Hernández *et al.* (2007) reportaron la producción

de hasta 193,140 IJ/ml trabajando con *S. carpocapsae* All mediante el uso de un biorreactor *airlift* con recirculación interna a través de tubos internos modificados. Pace *et al.* (1986) y Friedman *et al.* (1991) usaron tanques agitados mecánicamente para la producción de NEP, pero desprovistos de sus impulsores para que funcionasen como columnas burbujeadoras, de tal manera que lograron concentraciones de 90,000 IJ/ml y 95,000 IJ/ml al propagar *S. feltiae* y *Neoplectana* (\equiv *Steinernema*) *carpocapsae*, respectivamente. Por otra parte, en la propagación de *S. carpocapsae*-Az 20, estirpe aislada en las Azores, Portugal, Neves *et al.* (2001) obtuvieron de 38,000 a 64,000 IJ/ml mediante el uso de un biorreactor *airlift* de 1 l con recirculación externa.

Cambios en el comportamiento reológico de los caldos de fermentación

En principio, se observaron cambios importantes en las propiedades reológicas de los caldos de fermentación (Fig. 4a), que involucraron cambios en la viscosidad aparente (η_a) de 2 mPas al inicio de los cultivos, hasta 12 mPas a los 16 días de las fermentaciones. Por otra parte, el comportamiento de los caldos de fermentación fue no Newtoniano (i.e., viscosidad variable dependiente de las condiciones de deformación), evolucionando específicamente del comportamiento dilatante al inicio, hasta cercano al comportamiento Newtoniano al final de los experimentos. Anteriormente, con relación a las propiedades reológicas de caldos de fermentación durante la producción de nematodos entomopatógenos, sólo se contaba

con los reportes de Young *et al.* (1998) quienes reportaron el comportamiento pseudoplástico

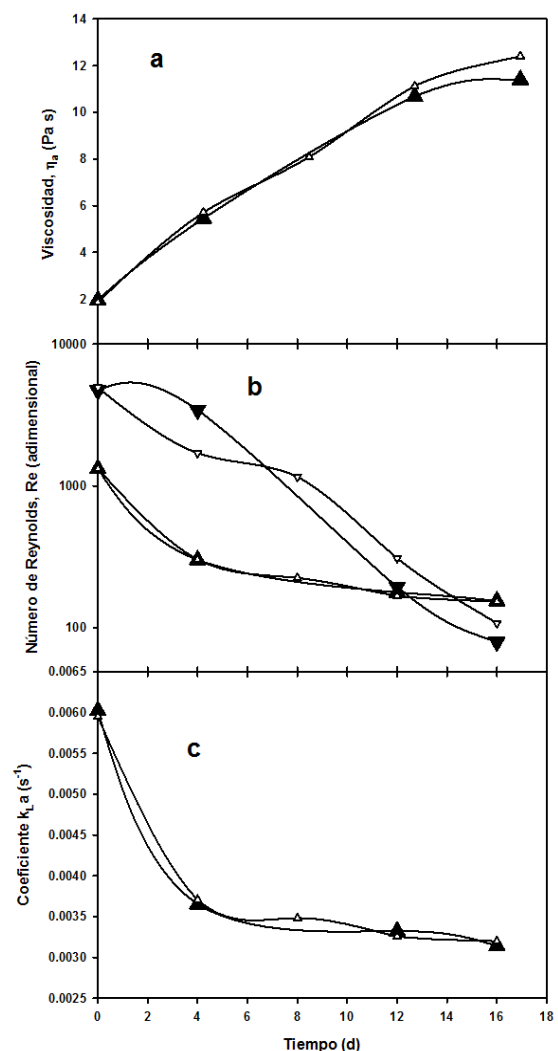


Fig. 4. Cultivo sumergido de *Steinernema carpocapsae* CABA01 y su bacteria simbiótica, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. Evoluciones de: a) viscosidad aparente (η_a) del caldo de fermentación; b) condiciones hidrodinámicas en términos del número de Reynolds (Re), y c) condiciones de oxigenación en términos del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}). Clave: símbolos negros, corrida F1; símbolos blancos, corrida F2; sección de ascenso, \blacktriangle ; sección de descenso, \blacktriangledown .

durante la producción de *S. feltiae*, y los reportes de Chavarría-Hernández *et al.* (2003, 2007) quienes determinaron tanto los comportamientos dilatante como pseudoplástico durante la producción de *S. carpocapsae* All al propagarlo en matraz agitado orbitalmente así como en biorreactor *airlift* con recirculación interna, usando medios de cultivo relativamente similares a los empleados en el presente estudio. Por otra parte, en los trabajos mencionados se emplearon distintas geometrías para la evaluación reológica (Cilindros concéntricos: Young *et al.*, 1998, y Chavarría-Hernández *et al.*, 2003; impulsor helicoidal: Chavarría-Hernández *et al.*, 2007; impulsor de paletas *vane rotor*: presente trabajo) lo que pudiese tener alguna relación con la variabilidad entre los resultados mencionados, además de los posibles efectos causados por usar medios de cultivo distintos, especímenes biológicos distintos así como sistemas de fermentación diferentes.

Cambios en las condiciones hidrodinámicas durante las fermentaciones

Con relación a las condiciones hidrodinámicas existentes durante el desarrollo de las fermentaciones para producir *S. carpocapsae* CABA01, éstas implicaron menores valores del número de Reynolds en la sección de ascenso ($150 < Re$ (adimensional) $< 1,320$) que lo determinado en la sección de descenso ($80 < Re$ (adimensional) $< 4,900$) (Fig. 4b), y fueron notablemente mayores que lo reportado por Chavarría-Hernández *et al.* (2007) al producir *S. carpocapsae* All en un sistema

relativamente similar al usado en el presente trabajo (i.e., *standard draft tube airlift bioreactor*) tanto en la zona de ascenso ($19 < Re$ (adimensional) < 425) como en la de descenso ($3 < Re$ (adimensional) < 129) en el trabajo mencionado. Lo anterior puede tener implicaciones interesantes. Cuando las condiciones hidrodinámicas tienden hacia la laminaridad (i.e., involucrando menores valores de Re) el proceso de apareamiento de los nematodos se puede ver favorecido (recordar que los adultos machos y hembras de steinernemátidos deben copular para reproducirse). En este sentido, un incremento del número Re como consecuencia de la mayor prevalencia de las fuerzas inerciales por sobre las fuerzas viscosas durante el mezclado en el biorreactor *airlift*, podrían traducirse en una disminución de la eficiencia del apareamiento entre steinernemátidos, originándose a su vez una disminución de la productividad de fases IJ lograda durante estos procesos. Esto parece tener relación con el hecho de que en el presente trabajo, partiendo aproximadamente de 1,000 NEP/ml se lograron producir de 90,000 a 130,000 *S. carpocapsae* CABA01-NEP/ml, mientras que Chavarría-Hernández *et al.* (2007), usando un sistema relativamente similar al aquí reportado pero propagando *S. carpocapsae* All, lograron producir 207,000 individuos/ml en condiciones de operación que involucraron menores números de Reynolds que los calculados para los experimentos reportados en este trabajo, como ya fue mencionado anteriormente. Otros autores también han sugerido la influencia de las condiciones

hidrodinámicas en la reproducción de steinernemátidos, como Neves *et al.* (2001) quienes durante la producción de *S. carpocapsae* Az 20 sugirieron que el apareamiento de nematodos puede ser favorecido a través de la creación de una zona de baja velocidad del fluido lo cual puede generar mejores oportunidades para el apareamiento, tomando en cuenta las diferencias de densidades entre hembras y machos reportadas por estos autores. Desafortunadamente en la literatura relacionada se cuenta con muy pocos reportes sobre la producción de NEP mediante biorreactores, que involucren un seguimiento de los cambios en las condiciones hidrodinámicas y sus posibles implicaciones en la productividad de fases IJ. Por lo tanto, son escasas las comparaciones de los resultados aquí presentados con otros trabajos.

Cambios en las condiciones de transferencia de oxígeno durante las fermentaciones

Por otra parte, la Fig. 4c muestra la evolución de las condiciones de transferencia de oxígeno durante las fermentaciones desarrolladas en la presente investigación. La eficiencia de oxigenación fue expresada en base al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $k_L a$, el cual fue calculado para la sección de ascenso en el biorreactor *airlift*. Los valores de $k_L a$ determinados se ubicaron en el intervalo de $3.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ los cuales están en concordancia con lo previamente reportado durante la producción de *S. carpocapsae* All en biorreactor *airlift* (i.e.,

$2.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a 0.0447 s^{-1} , Chavarría-Hernández *et al.*, 2007). Mehrnia *et al.* (2005) reportaron valores de $k_L a$ en el intervalo de 0.004 s^{-1} a 0.03 s^{-1} al experimentar con mezclas de queroseno/agua y diesel/agua en un biorreactor *airlift* con tubo concéntrico involucrando valores de v_{sg} de 0.01 m/s a 0.075 m/s.

Para realizar un balance de oxígeno conveniente durante la producción de NEP, es deseable contar con datos acerca de la demanda específica de oxígeno de los NEP y cómo ésta puede cambiar con el estadio de desarrollo; no obstante, no existen datos publicados sobre esto, excepto para fases IJ de algunos especímenes y en condiciones diferentes a las imperantes durante la producción en biorreactores. En este sentido, Lindegren *et al.* (1986) reportaron la rapidez de respiración de fases IJ de *S. feltiae* a distintas temperaturas de almacenamiento.

Por otra parte, los resultados aquí presentados sólo pueden ser comparados con muy pocos reportes ya que las implicaciones de las condiciones de oxigenación han sido escasamente exploradas durante la producción de nematodos entomopatógenos con potencial aplicación en el biocontrol de plagas.

CONCLUSIONES

Fue posible lograr la propagación masiva del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, usando un biorreactor tipo *airlift* con recirculación interna, logrando concentraciones de 127,000 IJ/ml en procesos de 16 días de duración. Por otra parte, fue

posible determinar la evolución de las condiciones hidrodinámicas imperantes durante las fermentaciones, así como estimar la correspondiente a las condiciones de transferencia de oxígeno, destacándose que la reproducción de nematodos fue posible aún cuando se alcanzaron condiciones de franca turbulencia en algunas zonas dentro del biorreactor, de acuerdo con los valores calculados para el número de Reynolds. Esto es de gran importancia ya que abre la posibilidad de optimizar las condiciones de proceso para maximizar productividades de NEP en biorreactores *airlift*, usando enfoques de ingeniería básica. Además, este estudio muestra que es posible lograr la producción masiva de nematodos entomopatógenos aislados en México, con potencial aplicación para el biocontrol de insectos plaga y así contribuir al acceso hacia una agricultura sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por los *Fondos Mixtos-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Gobierno del Estado de Hidalgo, México* (Proyectos con claves 48556 y 9206) y PIFI P/CA-3 2006-14-04 “*Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria*”, así como a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., y Química Valaner por otorgar el *Premio Sergio Sánchez Esquivel a Protocolos de Tesis en Biotecnología y Bioingeniería 2007* a G. Maciel-Vergara. Se agradece la asistencia técnica de E. Ortega-

Morales, U. Pérez-Santos y A. Martínez-Rodríguez.

REFERENCIAS

- Akhurst RJ (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenohabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 303-309.
- Al-Masry WA, Al-Ahmed MI (2005) Effect of scale-up on wall shear rates in circulating bubble columns. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 1230-1235.
- Buecher EJ, Popiel I (1989) Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *J. Nematol.* 21: 500-504.
- Campos-Herrera R, Escuer M, Labrador S, Robertson L, Barrios L, Gutiérrez C (2007) Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *J. Inver. Pathol.* 95: 125 – 139.
- Chavarría-Hernández N, Islas-López MA, Maciel-Vergara G, Gayosso-Canales M, Rodríguez-Hernández AI (2008) Kinetics of infective juvenile production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in submerged monoxenic culture. *Bioprocess Biosys. Eng.* 31: 419-426.
- Chavarría-Hernández N, Rodríguez-Hernández AI, Pérez-Guevara F, de la Torre M (2003) Evolution of culture broth rheological properties during propagation of the

Artículos

- entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnol. Prog.* 19: 405-409.
- Chavarría-Hernández N, Sanjuan-Galindo R, Medina-Torres L, Rodríguez-Hernández AI (2007) Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in an internal-loop airlift bioreactor using two configurations of the inner tube. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 167-176.
- Ehlers R-U (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 623-633.
- Ehlers R-U, Lunau S, Krasomil-Osterfeld K, Osterfeld KH (1998) Liquid culture of the entomopathogenic nematode bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 43: 77-86.
- Forst S, Clarke D (2002) Bacteria-nematode symbiosis. In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler R (Ed). CABI Publishing, Cambridge MA, USA. pp. 57-77.
- Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E (1997) *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Friedman MJ, Langston SE, Pollitt S (1991) Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. US Patent, 5023183.
- Hajek AE (2004) Natural enemies. An introduction to biological control. Cambridge University Press, USA.
- Islas-López MA, Sanjuan-Galindo R, Rodríguez-Hernández AI, Chavarría-Hernández N (2005) Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp.). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 91-97.
- Johnigk SA, Ecke F, Poehling M, Ehlers RU (2004) Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 651-658.
- Li GQ, Yang SZ, Cai ZL, Chen JY (1995) Mass transfer and gas-liquid circulation in an airlift bioreactor with viscous non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* 56: B101-B107.
- Lindgren JE, Rij RE, Ross SR, Fouse DC (1986) Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective juveniles at several constant temperatures. *J. Nematol.* 18: 221-224.
- Martínez-Rodríguez A (2008) Aislamiento y producción masiva de simbioses bacterianas de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo.
- Mehrnia MR, Towfighi J, Bonakdarpour B, Akbarnejad MM (2005) Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids. *Biochem. Eng. J.* 22: 105-110.

Artículos

- Neves JM, Teixeira JA, Simoes N, Mota M (2001) Effect of airflow rate on yields of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 369–373.
- Pace GW, Grote W, Pitt DE, Pitt JM (1986) Liquid culture of nematodes. International Patent Application, WO 86/01074.
- Pérez-Santos U (2009) Aislamiento de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo.
- Shapiro-Ilan DI, Gaugler R (2002) Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 137–146.
- Strauch O, Ehlers R-U (2000) Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 9-13.
- Surrey MR, Davies RJ (1996) Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Inver. Pathol.* 67: 92-99.
- Tilton JM (1999) Fluid and particle dynamics. In: Perry's Chemical Engineers' Handbook. Perry RH, Green DW, Maloney JO (eds). McGraw-Hill, USA. pp. 6-12.
- Woodring JL, Kaya HK (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas Agric. Exp. Stn. USA.
- Young JM, Dunnill P, Pearce JD (1998) Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Eng.* 19: 121-127

Técnica de PCR Como Estrategia Biotecnológica Para Detección de *Helicobacter pylori* en Placa Dental.

Roba Izzeddin ^{1*}, Rubén Toro ², Rula Izzeddin³

^{1*} *Departamento de Prostodoncia y Oclusión. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.*

E-mail: rubaizzeddin@gmail.com

² *Unidad de Investigaciones Morfopatológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.*

³ *Department of Bioscience Technologies, Jefferson School of Health Professions, Thomas Jefferson University. Philadelphia, PA 19107-5587*

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta biotecnológica muy útil para el diagnóstico de bacterias o virus de difícil cultivo *in vitro*. El objetivo del estudio es reafirmar la efectividad de dicha técnica en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* (*Hp*), en este caso en placa dental y su relación específica con afecciones gástricas, además difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área de la odontología. En consecuencia, se realizó una investigación tipo descriptivo de diseño no experimental y transversal; para el cual se seleccionó una muestra de setenta (71) individuos que presentaban sintomatología a nivel gástrico. A cada paciente se le tomó muestra de placa dental de la región subgingival y se llevó a un tubo Eppendorf. Del ADN de las bacterias presentes en placa dental se amplificó el gen *ureC* para identificar el microorganismo a través de PCR. De las 71 muestras examinadas, 18

(25.35%) resultaron positivas para el ADN de *Hp*. Se evidencio la coincidencia entre los resultados positivos y los pacientes con reflujo gastroesofágico, y además se logró estandarizar la técnica de PCR en la detección de *H. pylori* en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

Palabras clave: Reacción en Cadena de Polimerasa, *Helicobacter pylori*, placa dental

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) is a useful biotechnological tool for the diagnosis of viruses or bacteria difficult to culture *in vitro*. The study's objective is to reaffirm the effectiveness of this technique in the diagnosis of *Helicobacter pylori* (*Hp*), in this case in dental plaque, and its specific relationship with

gastric symptoms, further spreading the benefits and future applications in the field of dentistry. Consequently, a descriptive, non-experimental and transversal investigation was conducted using a sample of seventy one (71) individuals who had symptoms at the gastric level. Each patient sample was taken from dental plaque in the subgingival region and put in an Eppendorf tube. The ureC gene was amplified via PCR from the bacterial DNA in dental plaque to identify the organism. Of the 71 samples examined, 18 (25.35%) were positive for Hp DNA. There was agreement between positive results and patients with gastroesophageal reflux, and the standardization of the PCR technique for detecting *H. pylori* in the Faculty of Dentistry, University of Carabobo was successful.

Keywords: PCR, *Helicobacter pylori*, dental plaque

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada una técnica biotecnológica cuya finalidad es la amplificación o reproducción *in vitro* de un número de copias de una región específica de ADN, en este caso bacteriano, para su respectiva evaluación. La mencionada técnica es de gran utilidad en una variedad de campos, incluidas la biología molecular, la biotecnología, la genética, la epidemiología, las ciencias forestales, las ciencias forenses, la microbiología, el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras, es decir con múltiples ventajas que se mencionan a continuación:

- La técnica de PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo; porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos.
- La secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma, pero una vez completada su reproducción, esta puede ser separada

del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa.

- La cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le ofrece una alta sensibilidad a la prueba.
- La reacción de PCR es llevada completamente *in vitro* y requiere para su desarrollo de los elementos siguientes: 2 oligonucleótidos sintéticos o cebadores (*primers*), que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, lo que proporciona la alta especificidad; una enzima termoestable, *Taq* polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* y 4 desoxyribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Este procedimiento, permite obtener una duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico; es decir, cada ciclo consta de un proceso

de desnaturalización (95°C) que permite la apertura de las dobles cadenas; luego viene seguido por un proceso de anillamiento (40-65°C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o cebadores que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia específica del ADN, formando una unión ayudada por enlaces iónicos (*primers* y hebra de ADN); en donde la enzima *Taq* polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72°C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniendo por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de ADN de interés en este caso de *Helicobacter pilory* (*hp*) (Premoli *et al.*, 2004)

En este sentido, Leontiodys en el 2000 refiere que *Hp* es un bacilo Gram-negativo, de forma espiral y con gran motilidad conferida por sus flagelos, responsable del 90% de las gastritis crónicas, 85-90% de las úlceras duodenales, 70-75% de las úlceras gástricas; y por estar asociado con la evolución de metaplasia a cáncer gástrico. En 1994 fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como carcinógeno tipo I. Adicionalmente, se ha asociado de manera concluyente a distintas formas de gastritis, úlcera péptica de estómago y duodeno, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico de

bajo grado, originado en tejido linfoide asociado a la mucosa. Por ende, dicho microorganismo esta vinculado a la alta incidencia mundial de las patologías mencionadas con un promedio de *Hp* del 60%, siendo una de las infecciones humanas mas diseminadas a nivel mundial (Kabris, 2004); Así, dicho autor ha mencionado el posible contagio por vía oral, ya que la saliva representa una vía potencial de transmisión del microorganismo y por tanto pudiera ser encontrada también, en surco gingival o en placa dental (Dowsett *et al.*, 1999).

Bajo esta premisa, Manson & Eley (1993) afirman que la placa dental constituye un reservorio de reinfecciones postratamiento. Por tal motivo, diversos autores se han abocado a estudiar la presencia de dicho microorganismo en la cavidad bucal. Así, la presencia del *Hp* a nivel dental ocurre inmediatamente después de una limpieza dental, restauraciones y prótesis, donde se deposita una fina capa de glucoproteínas salivales sobre la superficie dental, adhiriéndose firmemente y posteriormente es colonizada por bacterias. En pocas horas, algunas especies de *Streptococcus* y, posteriormente, de *Actinomyces* se adhieren a la película, dando inicio así a la etapa de colonización microbiana y a la formación de la placa dental. Posteriormente, otros microorganismos se establecen sobre los que ya se encuentran, incrementando el espesor de la placa dental y del número de microorganismos, por multiplicación y por agregación bacteriana. Al mismo tiempo, surge la formación de la matriz de la placa, que ayuda a mantener estable la comunidad de microorganismos que conforman

en si la estructura de la misma entre los cuales se encuentra *Hp*. Debido a esto se han originado diversos estudios, con el objeto de aislar esta bacteria en restauraciones, prótesis y superficies dentales, utilizando metodologías tradicionales de cultivo o bien por el método de la PCR, la cual se basa en la amplificación de una secuencia de ADN bacteriano para constatar la presencia del microorganismo. Dicho aspecto es de suma relevancia para el desarrollo del presente estudio, cuyo objetivo es reafirmar la efectividad de dicha técnica en el diagnóstico de *Hp*, en este caso en placa dental y su relación específica con afecciones gástricas, además de difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área de la odontología

MATERIALES Y MÉTODOS

Se presenta un estudio enmarcado dentro de un diseño no experimental, transeccional y de campo, cuya muestra fue de setenta y un (71) pacientes seleccionados utilizando como criterios de inclusión utilizados pacientes mayores de 35 años, con síntomas gastrointestinales y sin tratamiento con antibióticos; al menos durante tres meses previos a la toma de muestra. Se informo a cada paciente el propósito del estudio y previo consentimiento para su participación en el mismo, todos estos aspectos en base a las normas de bioética que protegen a los seres humanos. Una vez finalizada esta fase se procedió de la siguiente forma:

Toma de la muestra.

Para la toma de muestra se utilizó una cureta de Gracey Hu-friedy removiendo la misma de la región subgingival e interdental de la placa dental. La muestra se llevó a un tubo Eppendorf conteniendo 50 μ l de solución salina al 0.9% y se congeló a -20°C , hasta la posterior extracción del ADN bacteriano.

Centrifugado.

Previo a la extracción de ADN, se descongelaron las muestras y se sometieron a centrifugación a 7000 rpm durante 10 min.

Extracción del ADN bacteriano de la placa dental

Se descartó el sobrenadante y se inició la extracción de ADN con el kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega, para lo cual al pellet se le agregó 600 μ l de solución de lisis nuclear e incubó 5 min a 80°C ; se descartó el sobrenadante, se llevó a temperatura ambiente y se agregó 3 μ l de RNasa e incubó durante 40 min a 37°C . Seguidamente se añadió 50 μ l de solución precipitante de proteínas (proteínasa K, a concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); y se incubó en hielo durante 5 min; se centrifugó 13000 rpm por 3 min; se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se precipito el ADN añadiendo 600 μ l de etanol al 70%, después se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se rehidrató el ADN con 60 μ l de agua libre de nucleasas. Seguidamente, se determinó la concentración de ADN, colocando en un tubo Eppendorf 72 μ l de agua libre de nucleasas + 8 μL del ADN (dilución

1:10). Esta mezcla se llevó al espectrofotómetro Gene Quant y se obtuvo la concentración en ng/μl, y se ajustó a 110 ng/μl, a partir de absorbancias de 260 y 280.

Detección de Hp con Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La preparación de la mezcla se realizó en campana de flujo laminar, previa limpieza con etanol al 70% y aplicación de UV durante 15 min, utilizando cebadores del gen *ureC*, cuyas secuencias son Forward: 5'-GGATAAGCTTTTAGGGGTGT TAGGGG- 3' y Reverse: 5'- GCTTACTTTC TAACACTAACGCGC-3', los cuales amplifican un fragmento de 294 pares de bases del gen. Es de hacer notar, que para la mezcla de reacción se usó el kit GoTaq Gren Master Mix de Promega, el cual es una solución que contiene: *taq* DNA polimerasa, desoxinucleótidos a una concentración de 400 μM, cloruro de magnesio a 3 mM de concentración y buffer a pH 8.5. Adicionalmente a esto, fue usada la cepa bacteriana de *Hp* 26695, como control positivo. En este sentido, para un protocolo de 25 μL de volumen final en cada tubo de reacción, se requirió de 12.5 μL de Gotaq Gren master Mix a una concentración final de 1X; 0.25 μL de primers positivo directo y 0.25 μL de primers reverso a una concentración final de 0.1 pmol/μl cada uno; 11.5 μL de agua libre de nucleasas y 0.5 μL de ADN que quedó a una concentración

final de 2.2 ng/μL. Luego, en el termociclador marca

MJ Research, se programó el equipo con un ciclo de: 95°C por 5 min; treinta y cinco ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min. Obtenido el producto amplificado de PCR.

Electroforesis y captura de imagen.

Para observar la calidad del producto se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 min a 70 voltios y se expuso a luz ultravioleta para evidenciar las bandas cromosómicas amplificadas. Finalmente, se capturó y documentó la imagen para el análisis pertinente, utilizando el transiluminador UVP, modelo M-15, el cual está incorporado al sistema de fotodocumentación Photo Doc-It.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Día a día, se hace evidente la discrepancia de resultados reflejados por diversos autores en lo que a *Hp* se refiere, ya que, existen estudios con una alta prevalencia de positividad a diferencia de otros que muestran escasos resultados positivos. En lo referente al presente estudio, de las setenta y un (71) muestras examinadas, 18 (25.35%) resultaron positivas para el gen *ureC* de *Hp*, tal como se observa en la Tabla 1, lo que corroboraría lo antes expuesto por otros autores en lo referente a las posibilidades de reinfección del microorganismo.

Tabla 1 Resultado de la expresión del gen *ureC* de *Hp* en placa dental

Pacientes	Cantidad	Porcentual
Positivos	18	25.35
Negativos	53	74.64
Total	71	100

Por ende, se evidencia la sensibilidad y especificidad del método de PCR en la identificación de esta bacteria en placa dental. Este aspecto concuerda con el reporte de Song *et al.* (2000), quienes lo consideran el método de elección para detectar ADN de *Hp* en la cavidad bucal; al igual que Brooks *et al.*, (2004) los cuales detectaron ADN de *Hp* partiendo de concentraciones mínimas de placa dental.

Además de esto, con el presente estudio se evidenció que 13 de los 18 pacientes positivos para *Hp*, también presentaban reflujo gastroesofágico. Confirmando estos resultados, Perrone & Berroteran (1999) afirman que la presencia de este microorganismo en la cavidad bucal surge como una consecuencia de dicho reflujo, es decir, como miembro de una microbiota transitoria, que se convierte en un microorganismo permanente de la cavidad bucal. Estos aspectos, confirman la estrecha relación existente entre la infección por *Hp* y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, este aspecto resalta la sugerencia de que la placa dental y la saliva pueden ser responsables para la transmisión de la bacteria y posiblemente funciona como vía de reinfección después de la terapia de erradicación. Dicho aspecto, fue mencionado por segunda vez por los mismos

autores en el año 2006. En este sentido, Martínez & Noa (2009), refieren que *Hp* es una bacteria que coloniza e infecta la mucosa del epitelio gástrico del hombre, condicionando la aparición de una gastritis que puede evolucionar hacia úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT. En otros casos, la infección se presenta de forma silente. Dichos autores mencionan la presencia de *Hp* en pacientes con gastritis y en otros con mucosa sana que acudieron a la Consulta de Endoscopia, del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", por desórdenes en las vías del tracto digestivo superior. Así, Martínez & Noa (2009) estudiaron 50 pacientes, de ellos 30 tenían gastritis erosiva y 20 la mucosa sana, confirmado histológicamente. Se detectó *Hp* por amplificación de un fragmento del gen *Urec A* en el 90% de los casos con gastritis erosiva y el 75 % de los sujetos con mucosa sana mediante PCR. Por ende, llegan a la conclusión que la infección por *Hp* es tan elevada en los pacientes con gastritis como en aquellos con mucosa gástrica sana, lo cual pudiera tener relación con la colonización de dicho microorganismo en placa dental.

En este orden de ideas, Nguyen *et al.* (1995) agregan que la detección de *Hp* en placa dental

Artículos

indica que la colonización de esta bacteria no se limita a la mucosa gástrica y que el nicho bucal puede servir como una posible fuente de reinfeksi3n de la mucosa gástrica.

Bajo esta perspectiva, diversos autores se han abocado a estudiar la presencia de *Hp* en placa dental, entre ellos Perrone & Berroteran (1999) que exponen en su publicaci3n, que de las 69 muestras de placa dental evaluadas, solo una (1.4 %) fue positiva para la amplificaci3n del gen *ureC*; en discrepancia con este estudio. Mientras Jang-Jih *et al.* (1999) obtuvieron un 36% de resultados positivos utilizando cinco m3todos para la detecci3n de *Hp* por PCR. Profundizando en este tema, el mismo autor,

estudio la presencia de *Hp* en la placa dental supragingival de molares, premolares e incisivos de 20 pacientes. Dichos autores, evidenciaron que todas las muestras fueron positivas para el ADN de *Hp*, llegando as3 a la conclusi3n de que la placa dental realmente actúa como reservorio de esta bacteria y advierten que los ensayos con PCR demuestran ser un m3todo muy sensible y especifico. Por lo tanto, lo consideran el m3todo de elecci3n para detectar el ADN de *Hp* en la cavidad bucal. A diferencia de dichos autores, el presente estudio evidencia la presencia de dicho microorganismo en algunas muestras de placa dental lo cual se aprecia en las figuras 1 y 2.

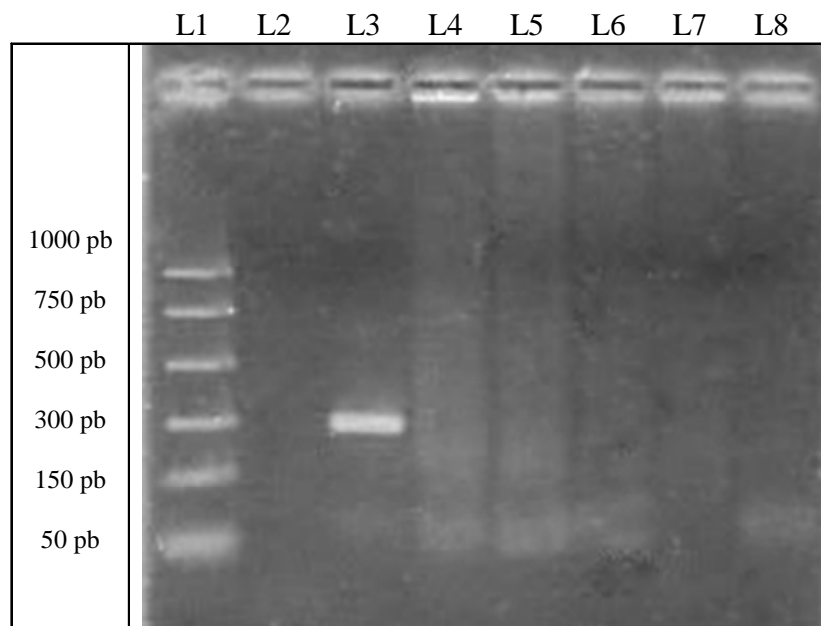


Figura 1 Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), el control negativo (línea 2), el control positivo (línea 3) y cinco muestras con resultado negativo (línea 4, 5, 6, 7 y 8).

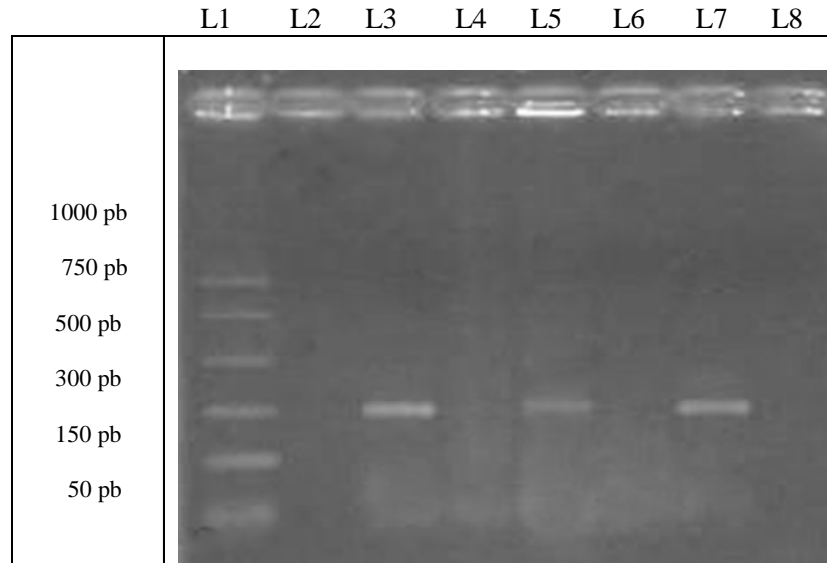


Figura 2. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), dos resultados positivos (línea 5 y 7) y tres resultados negativos (línea 4, 6 y 8)

Cheng *et al.* (1996) refieren que aún cuando la placa dental presenta una microbiota bastante compleja, podría actuar como uno de los principales reservorios de *Hp* y posiblemente desempeña un papel importante en la instauración de la infección periodontal y gástrica. Por tal motivo, se han relacionado varias condiciones bucales que predisponen a la presencia del microorganismo en la placa dental.

Entre los más nombrados figuran el uso de prótesis dental y la frecuencia de tratamiento odontológico. Dicho aspecto fue estudiado en la presente investigación observándose que de los 71 pacientes estudiados y referidos en la Tabla 1, 9 eran portadores de prótesis dental y todos presentaron positividad para *Hp* (Fig. 3 y 4). Dicho aspecto fue confirmado por Hirchl *et al.* (1994) que refiere que pacientes que reciben

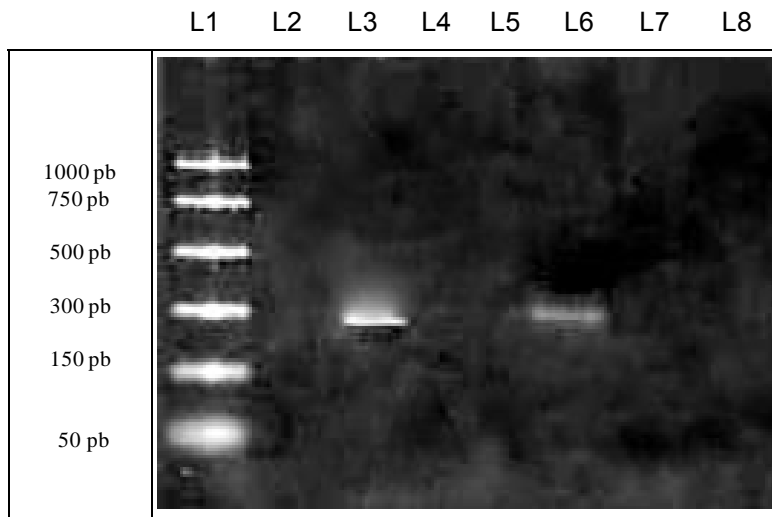


Fig. 3. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), un resultado positivo (línea 6) los cuales son portadores de prótesis dental y tres resultados negativos (línea 4, 5 y 8)

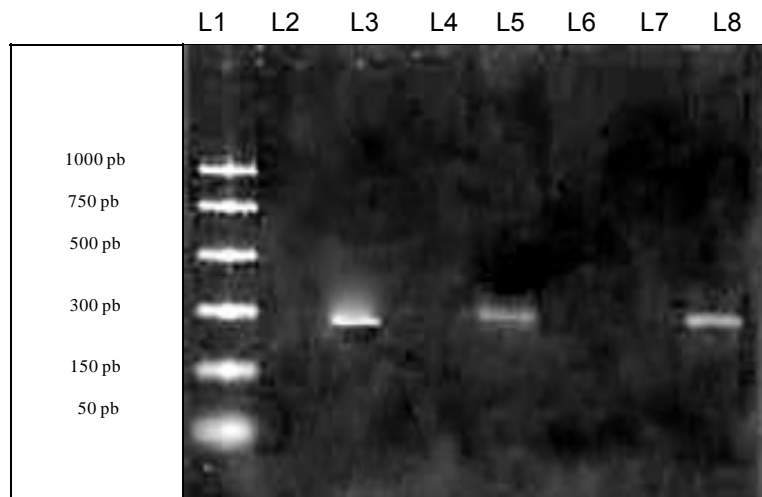


Fig. 4. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), dos resultados positivos (paciente portador de prótesis dental, línea 5 y 8) y tres resultados negativos, pacientes no presentan prótesis dental (línea 4, 6 y 7)

tratamiento odontológico presentan niveles mas bajos de seropositividad para *Hp*, mientras aquellos portadores de prótesis dental permanente presentan niveles más altos demostrados por lo la técnica de PCR.

No obstante, debido a la gran variabilidad genética del *Hp* demostrada por estudios de genotipificación y secuenciación, la mayoría de las investigaciones basadas en PCR, se han dirigido hacia la identificación de algunos genes específicos, dentro del cual destacan *el vacA*, *el cagA* y *el ureC*; sin embargo, cabe destacar que el gen *ureC* que expresa para una fosfoglucoamin mutasa (GlmM), la cual es esencial y exclusiva en el genoma del *Hp* para su crecimiento constituye el gen más empleado para realizar el diagnóstico, reportándose buenos valores de sensibilidad y especificidad (Perrone *et al.*, 2006),. De esta manera, los referidos antecedentes marcaron las pautas fundamentales para realizar esta investigación, con la finalidad de determinar la presencia de *Hp* en placa dental a través de PCR con la utilización del gen *ureC* empleado para un buen diagnostico.

Por otra parte, Scarano *et al.* (2005) en la Universidad Central de Venezuela, opinan que la presencia de lesión en la mucosa gástrica favorece la proliferación de *Hp* en el medio y consecuentemente aumenta la colonización de la mucosa gástrica por el patógeno y refiere además que la infección de la mucosa gástrica por *Hp* frecuentemente ocurre con presencia simultánea del patógeno en la placa dental. Dicha hipótesis llamó la atención, pues pudo confirmarse a través del presente estudio donde

el 100% de los pacientes con síntomas de reflujo gastroesofágico arrojaron resultados positivos en cuanto a *Hp* se refiere. En contraparte, en otro estudio el mismo año, resultó que 100% (n=48) de los pacientes presentaron positividad para *Hp* en placa dental, independientemente de la presencia de lesión en la mucosa gástrica (Jang-jih *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES.

Los resultados presentados en este trabajo revelan la importancia de la aplicación del método de PCR en placa dental, el cual, podría servir como recurso auxiliar de diagnostico en la infección por *Hp* en pacientes con gastropatías. En este sentido, diversos autores afirman que la detección de dicho microorganismo en placa dental, indica que la colonización del mismo no se limita a la mucosa gástrica y que el nicho bucal podría servir como posible fuente de re infección para la misma. Dicho aspecto se evidencia a nivel medico; por el fracaso de tratamientos erradicadores, lo cual es justificado con una posible resistencia bacteriana de *Hp* ante el antimicrobiano indicado. Por otro lado, cabe resaltar, que existe mayor predisposición de positividad de *Hp* en pacientes portadores de prótesis, en este caso prótesis fija, ya que las mismas pueden actuar como nicho para el microorganismo antes mencionado. A través del estudio se logró estandarizar y demostrar la eficiencia de la metodología de PCR en la detección de *Hp* en muestras proveniente de placa dental, en UNIMPA de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

RECOMENDACIONES.

Existe la necesidad de profundizar las investigaciones enfocadas en la detección del *Hp* en placa dental, para poder determinar así la aplicación de la técnica PCR como recurso auxiliar de diagnóstico de *Hp* en pacientes con gastropatías.

AGRADECIMIENTOS

Para la materialización del presente trabajo ha sido significativo el aporte del Fondo de Subvención de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo; además, el apoyo incondicional de la Profa. Flor Herrera y del TSU José Rivero, del Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC); de igual manera cabe resaltar, el cordial agradecimiento a la Dra Mónica Contreras, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C).

REFERENCIAS

- Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA & Barbezat GO (2004) Diagnosis of helicobacter pylori infection by polymerase chain reaction: is it worth it? *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 1-5.
- Cheng LHH, Webberley M, Hanson N & Brown R (1996) *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. *Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 81: 421-423.
- Dowsett SA, Archiva L Segret VA & Gonzalez CR (1999) *Helicobacter pylori* Infection in Indigenous Families of central America : Serastatus and Oral Finger nail Carriage. *J. Clin Microbiol.* 37: 2456-2460
- Hirschl AM, Ritcher M, Makrithatis PM, Pruckl B, Willinger K, Schutze K & Rotter M (1994) Single and multiple strain colonization in patients with Helicobacter pylori-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J. Infect. Dis.* 170: 473-475.
- Jang-Jih L, Cherng-Lih P, Rong-Yaun S, Chi-Hsiang C & Qinyuan L (1999) Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric Tisúes. *J. Clin. Microbiol.* 37: 772.
- Kabris S (2004) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by Polimerase Chain Reaction: a review. *Helicobacter.* 9: 115- 123.
- Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW (2000) Infecção por *Helicobacter pylori* fora do Trato Gastrointestinal. *JAMA Brasil.* 4: 3413-28.
- Manson JD & Eley BM (1993). O Meio Bucal na Saúde e na Doença. Manual de Periodontia. São Paulo. .
- Martínez, M. & Noa G (2009) Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con mucosa sana y con gastritis erosiva. *Rev Cubana de Med.* 48(2).
- Nguyen AMH, El-Zaatari FAK & Graham DY (1995) *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 76: 705-709.
- Perrone M, & Berroteran A (1999) Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y saliva de pacientes con enfermedad de las vías digestivas superiores. *Acta Odontol Venezolana,* 36: 51-55.

Perrone, M, Gonzalez-Valencia, G & Camorlinga, M (2006) Identificación de genotipos de *Helicobacter pylori*, provenientes de muestras de placa dental en la población venezolana. 4ª ed. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/cielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652006000100012&lng=es&nrm=iso. ISSN 0001-6365.

Premoli G, Gonzalez A, Mendoza B & Percoco T (2004) Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop.* 56: 85-90

Scarano, G, Correia, A & Marques S (2005) Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. *Acta Odontol. Venez* 2ª ed.. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652005000200003&lng=es&nrm=iso.

Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G. & Bode G (2000) Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive Polymerase Chain Reaction. *J. Clin Pathol.* 53: 218-222.

La Bionanotecnología y otras Estrategias de Neuroprotección para la Enfermedad de Parkinson

José L. Calderon¹, Paulo Silva², Eric Avila³, Rodrigo Bolaños³ y Gerardo Rivera^{1,3*}

¹*Institute for BioNanotechnology in Medicine, Northwestern University, Chicago, IL. 60611, USA*

²*Faculdade de Medicina da Universidad de São Paulo, 01246-000, Brazil*

³*Laboratorio de Neurociencias y Biotecnología, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, México, D.F., 03920, MEX.*

**g-rivera@northwestern.edu*

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson constituye un reto para numerosos científicos que en la actualidad buscan encontrar un tratamiento que sea capaz de detener la progresión de éste debilitante proceso neurodegenerativo. Las estrategias utilizadas al momento para curar el padecimiento se han visto empañadas por resultados ambiguos. El reciente desarrollo de bionanomateriales que promueven la reparación, protección y regeneración neuronal representan no solo una posibilidad terapéutica para esta enfermedad; si no que consolidan el trabajo científico interdisciplinario que es donde reside el futuro de la ciencia.

Palabras clave: Neuroprotección, Enfermedad de Parkinson, Bionanotecnología.

ABSTRACT

Parkinson's disease constitutes a challenge for many scientists who are nowadays searching for a treatment to stop the progression of the neurodegenerative process. Current strategies to find a curative treatment have been discouraged because of ambiguous results. Bionanotechnology and the recent development of bionanomaterials that promote neural repair, protection and regeneration, represent not only a therapeutic possibility for the treatment of this disease, they will also consolidate the interdisciplinary scientific work, which is where the future of science resides.

Keywords: Neuroprotection, Parkinson's disease, Bionanotechnology

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo padecimiento neurodegenerativo más frecuente después del Alzheimer (Nussbaum & Ellis, 2003), afecta aproximadamente a 1.5 millones de norteamericanos y cerca de 500,000 nuevos casos se reportan anualmente (De Lau & Breteler, 2006). Se espera que el número de

personas que sufran de éste mal se duplique en los próximos 10 a 15 años debido al incremento de la población en el estrato de los adultos mayores. Según datos del Instituto Nacional de Neurología en México, 50 de cada 100,000 habitantes la padecerán (González-Torres & Armendáriz-Borunda, 2005). Tiene mayor prevalencia en hombres y se presenta en sujetos

de todas las razas y grupos étnicos, aunque se ha demostrado que la población de raza hispana y raza blanca son más propensos a padecerla. Los síntomas de la EP están asociados con la degeneración y muerte de neuronas dopaminérgicas localizadas en *la pars compacta* de la *sustantia nigra* (SNpc) y está caracterizada por cuatro signos cardinales: temblor, rigidez muscular, bradicinesia (lentitud en el movimiento) y alteraciones de la postura (Jankovic, 2008).

Este trastorno aún no tiene cura, ya que se desconoce la causa que genera la muerte neuronal. Sin embargo, se tienen pruebas suficientes para admitir que la neurodegeneración progresiva está relacionada a una serie de mecanismos en los que se encuentran involucrados anomalías mitocondriales, estrés oxidativo, aminoácidos excitadores y el incremento de calcio (Ca^{2+}) intracitoplásmico (Youdim y col., 2006; Schapira, 2008; Palacino y col., 2004), el problema radica en que resulta incierto si éstos mecanismos son primarios o secundarios. Dado lo anterior, la noción de neuroprotección aparece como una necesidad de obtener el resguardo de las neuronas dopaminérgicas situadas en la SNC para impedir su degeneración progresiva.

MUERTE DE LA NEURONA

El análisis de la muerte neuronal necesita de la distinción entre apoptosis y necrosis, ya que aunque son procesos que finalizan con el cese de la vida celular, tienen rumbos diferentes que es necesario conocer e identificar. En el proceso de la muerte por apoptosis, un componente clave es la mitocondria, en la que los cambios de permeabilidad en sus membranas provocan la activación de las caspasas; éstas enzimas

activarán las endonucleasas que producen una condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, pero la membrana celular se conserva íntegra aunque con un aspecto de tipo globuloso. La mitocondria se encuentra bajo la acción equilibrada entre elemento antiapoptóticos (Bcl_w, Bcl-2, Bcl-x_i, A-1, bFGF, GDGF, NT 4/5, etc.) y elementos proapoptóticos (Bad, Bak, Bik, Bax, HrK, y Mtd/Bok). Gracias a este equilibrio se mantiene protegido el factor Apaf-1, pero cuando se pierde como consecuencia de una señal intracelular o extracelular, éste queda libre y consigue la activación de la cadena de las caspasas. Existen también ligandos específicos que activan una familia de receptores de membrana que tienen el “dominio de muerte”, cuya activación facilitará la acción de Apaf-1 sobre la cadena de caspasas (Bredesen, 1995).

La sucesión de eventos que se presentan en la necrosis comienza con la ausencia de oxígeno (O_2), que provoca una fuerte caída del potencial de membrana neuronal debido a cambios en la conducción de potasio (K^+). Esto origina la liberación del neurotransmisor glutamato (Glu), que al activar los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) provoca la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}). Lo anterior genera: 1. Imposibilitar la función mitocondrial haciendo descender los niveles de adenosin-trifosfato (ATP), afectando varios procesos mediados por Ca^{2+} que son ATP-dependientes; 2. Aumentar las concentraciones citoplasmáticas de radicales libres de oxígeno (O_2^{\cdot}); y 3. Activar enzimas Ca^{2+} -dependientes del tipo fosfolipasas (PLD, PLA₂, etc.), que originan mensajeros de heterogénea categoría y función (quinasas, leucotrienos y ácido araquidónico). También es estimulada la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) con la consiguiente

acumulación de óxido nítrico (NO) y su contribución a la producción de más radicales libres. Estas variaciones neuroquímicas producen edema, destrucción de los organelos intracelulares, pérdida de continuidad de membranas externas con la consecuente expulsión del contenido interno y reacciones inflamatorias (Goldstein & Kroemer, 2006).

Los dos tipos de muerte celular pueden coexistir y se ha demostrado que la aparición de uno u otro depende de la eficacia del estímulo desencadenante; es decir, la calidad del estímulo no es factor obligatoriamente condicionante del tipo de muerte celular que aparece. Existen otros factores que también influyen, un ejemplo característico es la isquemia cerebral, en la que la proporción de apoptosis y de necrosis vienen determinadas por la intensidad y duración de la agresión tisular, así como la localización del tejido. En la zona isquémica nuclear las neuronas mueren más rápidamente por efecto de necrosis; mientras que en la zona de penumbra, la muerte celular aparece más tardíamente por apoptosis. Sin embargo, es habitual que en el striatum impere la apoptosis (Nicotera & Leist, 1997).

La duración de los estímulos nocivos, su intensidad y la especificidad de las neuronas dañadas son factores que establecen el tipo de respuesta que lleva a la muerte. En este sentido hay que destacar la riqueza de los factores de protección o "antimuerte" que pueden existir en un sitio determinado, como son: sistemas depuradores de radicales libres (superóxido dismutasa, glutatión, etc.), intensidad y eficiencia de sistemas transportadores de Ca^{2+} , proteínas fijadoras de Ca^{2+} , inhibidores intracelulares de proteasas, etc. Con la finalidad de elaborar

estrategias que puedan regular estos sistemas, no debe extrañarnos el que haya irrumpido con fuerza el término de tratamiento neuroprotector.

TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE

En estudios de investigación realizados con cultivos de neuronas dopaminérgicas se ha comprobado que la dopamina (DA) es generadora de estrés oxidativo (Gille y col., 2006); de la misma manera se ha demostrado en estudios *post mortem* de pacientes con EP que la SNpc se encuentra en un estado de estrés oxidativo y que la lesión causada por radicales libres favorece a la patogenia de la muerte celular. Son bien conocidas dos vías que pueden generar radicales libres muy citotóxicos (Figura 1): a) la propia DA, por medio de su metabolismo oxidativo por monoamino-oxidasa tipo B (MAO-B) o de su autooxidación (Finberg y col., 2000), y b) la vía del radical libre óxido nítrico (NO), que puede convertirse en peroxinitrito ($ONOO^-$) en presencia de O^{2-} (Iravani y col., 2002). La DA puede generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por dos vías: metabolismo oxidativo o por autooxidación. El H_2O_2 es un elemento oxidante pero además, en combinación con hierro (Fe^{2+}), forma el radical hidroxilo libre (OH), uno de los radicales más citotóxicos (Chen y col., 2002). En circunstancias normales el glutatión reducido (GSH), neutraliza el H_2O_2 , pero si su producción está aumentada o los niveles de GSH están disminuidos, se desequilibra la reacción produciendo neurotoxicidad. En la Fig. 1 se muestra cómo el radical NO interactúa con el superóxido O^{2-} para formar $ONOO^-$, que es protonado y genera el radical hidroxilo (OH). El $ONOO^-$ produce la nitración de moléculas de tirosina que pueden modificar la fosforilación de

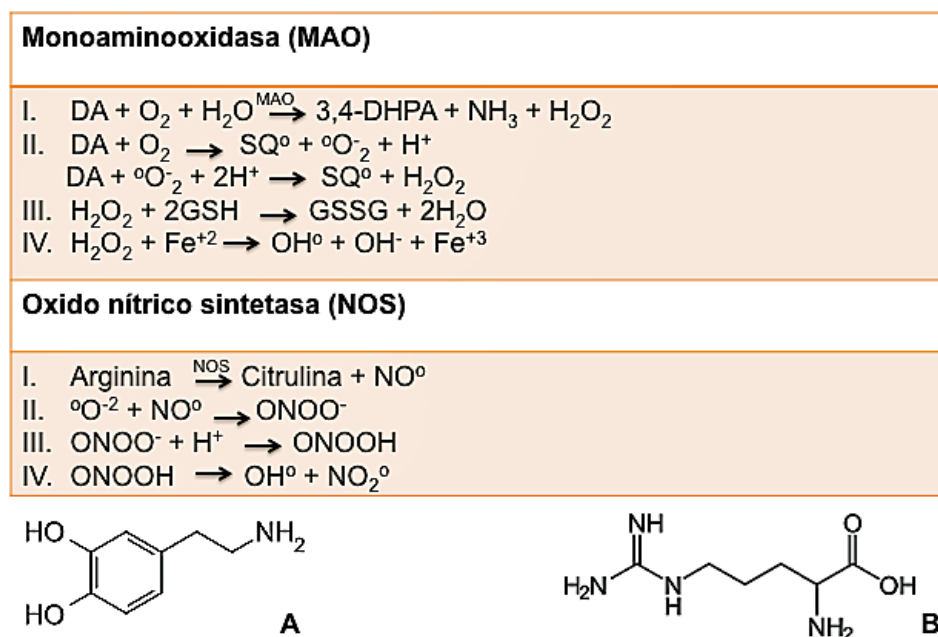


Fig. 1. Reacciones oxidativas que se llevan a cabo en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, donde se generan radicales libres muy citotóxicos. **A.** Estructura química de la Dopamina (DA). **B.** Fórmula química de la arginina.

receptores de tirosina kinasa (Trk), con los que habrían de interactuar las neurotrofinas (NT). Lo anterior se ha definido por un aumento de nitrotirosina en el núcleo de los cuerpos de Lewy en la sustancia negra de pacientes con EP. La eficacia de la selegilina como antioxidante ha sido evidenciada en ensayos clínicos realizados en pacientes. La selegilina inhibe la MAO-B e incrementa la concentración de DA cerebral, por lo tanto, disminuye la capacidad de generar H_2O_2 ; esto es, podría actuar de manera simultánea como fármaco que restituye la falta de DA y como protector frente a la acción de agentes oxidantes (Dewey, 2004). Es posible que cumpla otras acciones además de inhibir la MAO-B, ya que su acción neuroprotectora se ha

revelado en sistemas neuronales en los que no hay MAO-B ni DA. Su metabolito desmetildeprenilo (Mytilineou y col., 1997; Ju y col., 1994), puede inhibir la serie de reacciones que producen apoptosis mediante la inducción de eventos transcripcionales que favorecen la síntesis de nuevas proteínas; concretamente, se ha demostrado su capacidad de alterar la expresión de diversos genes implicados en la apoptosis (SOD, bcl-2, bclxl, NOS y c-jun) (Beal, 1996). Por lo que a su acción antioxidante se podría añadir una acción antiapoptósica.

En los pacientes con EP se ha demostrado incremento de hierro, en su forma ferrosa, que tiene la capacidad de originar radicales libres en la sustancia negra y reducción de su principal

proteína fijadora, la ferritina, que lo mantiene en una forma estable (Griffiths y *col.*, 1999; Kienzi y *col.*, 1999). El agente quelante del hierro, la desferoxamina, no pasa bien la barrera hematoencefálica por lo que es complicado que pueda manifestar un buen efecto clínico.

La fenilbutilnitrona y los salicilatos reaccionan con radicales OH, a los que atrapan. Se han iniciado con ellos ensayos clínicos para ver su posible acción preventiva en la evolución de la enfermedad. Por último, se está estudiando la posibilidad de incrementar los niveles de GSH que pueden estar disminuidos en la sustancia negra de estos pacientes, ello se puede conseguir con fármacos que sean análogos como el 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-uno

(Ebselen) o por técnicas de ingeniería genética que induzcan su síntesis (Moussaoui y *col.*, 2000).

FACTORES NEUROTRÓFICOS

La eliminación de los factores de crecimiento en los medios de cultivo de neuronas dopaminérgicas induce apoptosis, mientras que la adición del factor de crecimiento derivado del hueso (BDNF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), neurotrofinas 4/5, el factor de crecimiento de fibroblasto tipo a y b (FGF-a y FGF-b), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) favorecen su supervivencia y diferenciación neuronal (Tabla 1) (Apfel, 1997).

Tabla 1. Factores de crecimiento de utilización posible, como agentes neuroprotectores en la EP.

Factores Neurotróficos: Efectos protectores en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta
I. Factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF): <i>in vivo e in vitro</i>
II. Factor de crecimiento de transformación tipo $\beta 2$ y $\beta 3$ (TGF $\beta 2$ y $\beta 3$): <i>in vivo e in vitro</i>
III. Factor de crecimiento derivado del hueso (BGNF): <i>in vitro</i>
IV. Factor de crecimiento de fibroblasto tipo a y b (FGF a y b): <i>in vitro</i>
V. Factor de crecimiento epidérmico (EGF): <i>in vitro</i>

El GDNF es el factor que ha mostrado tener una acción protectora sobre neuronas dopaminérgicas en varios modelos experimentales *in vivo* de EP (Gash y *col.*, 1996). De hecho, el GDNF se produce en el cuerpo estriado, por lo que se considera un factor de crecimiento de las neuronas dopaminérgicas. También los factores de crecimiento de transformación $\beta 2$ y $\beta 3$ (TGF- $\beta 2$ y el TGF- $\beta 3$) se

expresan en mesencéfalo y mejoran las condiciones para el crecimiento y supervivencia de las neuronas trasplantadas en este sitio en animales de experimentación (Tabla 1) (Commissiong y *col.*, 1997). La dificultad radica en el modo de lograr que dichos factores de crecimiento se liberen de forma continua, útil y práctica.

BIONANOTECNOLOGÍA APLICADA A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La dificultad que representa el lograr concentraciones estables de medicamentos en el tejido cerebral o incluso lograr que atraviesen la barrera hematoencefálica, ha representado un serio obstáculo a superar para el tratamiento de la EP. Por lo anterior es necesario el desarrollar medios a través de los cuales estos fines puedan ser alcanzados.

El campo de la ingeniería biomédica en conjunción con las ciencias de la salud, ha llevado a cabo investigación para el desarrollo de biomateriales que sean capaces de permitir y aumentar la entrega de medicamentos dirigida a sitios específicos así como mantenerlos en concentraciones constantes, para tener los efectos deseados. Lo anterior ha permitido la creación de la bionanotecnología que se encarga de la formación, identificación y aplicación de biomateriales a escala nanométrica; que están siendo utilizados para regeneración y reparación del tejido neuronal en combinación con el implante de células madre para potenciar y/o favorecer la detención del proceso degenerativo (Orive y *col.*, 2009).

Para el desarrollo de materiales neuroprotectores es necesario comprender los mecanismos moleculares por los cuales ocurre la muerte celular, ya que lo que se busca al elaborar dichos sistemas es reducir el proceso inflamatorio, la excitotoxicidad generada por el Glu o el desbalance de Ca^{2+} , intervenir en el cese de la cascada apoptótica o algunas otras causas secundarias de muerte por agresiones intra o extracelulares.

Entre los materiales potencialmente utilizables para lograr estos cometidos se encuentran

polímeros que son capaces de encapsular medicamentos o proteínas, secuencias peptídicas ancladas a estructuras que permitan presentar eficazmente las señales a las células, micelas o microcápsulas con la habilidad de contener medicamentos o células productoras de factores de crecimiento que favorezcan procesos regenerativos y nanofibras que por su estructura provean soporte mecánico y señalización intensa a las células vecinas.

En el caso de la EP el abordaje biotecnológico más exitoso al momento ha sido la implantación de microesferas cargadas de GDNF en el cuerpo estriado de ratas lesionado con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Posterior a la intervención fue observada la recuperación funcional, crecimiento de fibras tirosina-hidroxilasa positivas (TH^+) y reaparición de los transportadores de dopamina. Sin embargo, tras el seguimiento de la evolución de las ratas, se hicieron evidentes recaídas en la función motora, probablemente debidas al agotamiento de GDNF y la degradación de las microesferas (Deierborg y *col.*, 2008).

Estudios aún no publicados por Rivera y *col.*, que se llevan a cabo con la inserción de nanofibras que presentan péptidos bioactivos en su superficie y que promueven la elongación de dendritas y axones (mediante la activación del receptor $\beta 1$ de integrinas), en un modelo de depleción aguda de dopamina, ha demostrado promover la recuperación funcional (Fig. 2). Sin embargo, hubo variaciones relevantes en las conductas de los individuos tratados. En referencia a ello, puede deberse a la estabilidad mecánica del complejo, su tiempo de degradación, la calidad de la señalización o las interacciones desconocidas que pueda tener con

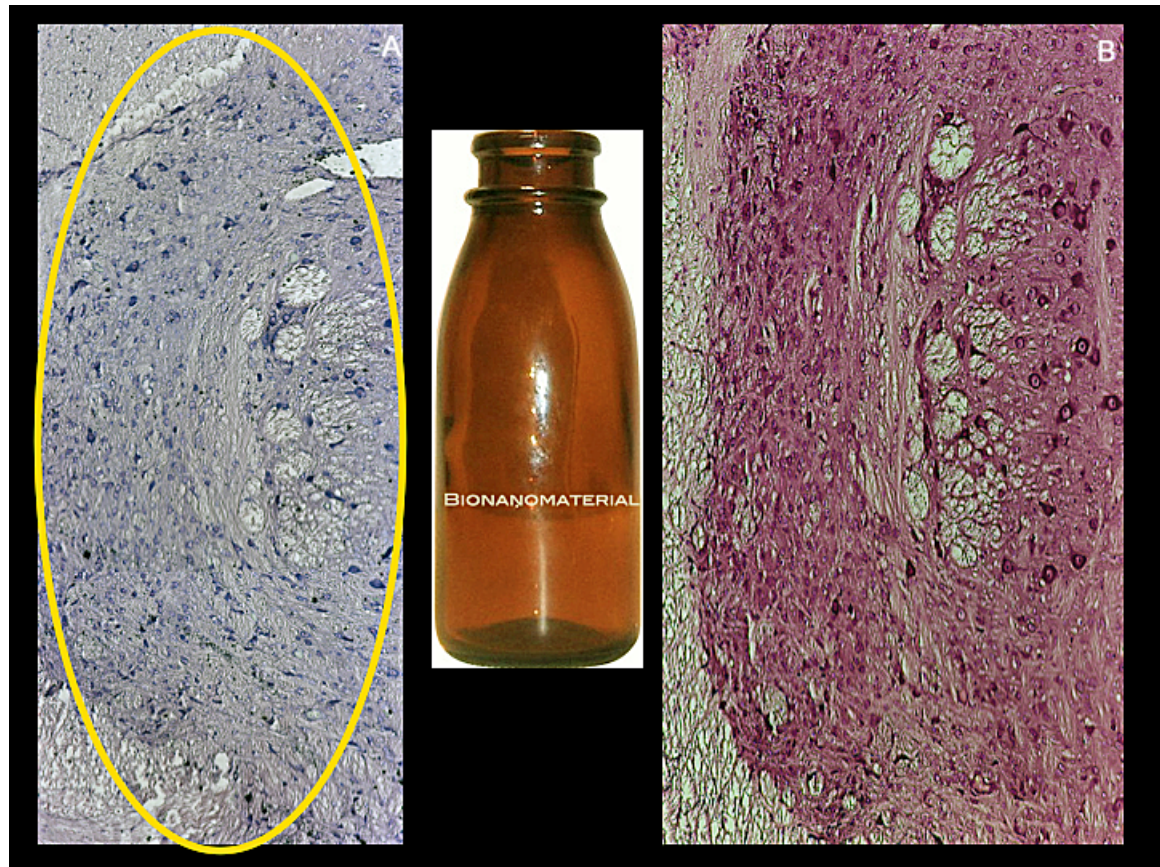


Fig. 2. Efecto neuroprotector observado en la sustancia negra pars compacta de un ratón con depleción severa de dopamina tras la inyección intracerebral de un nanomaterial bioactivo derivado de la laminina. **A.** Tinción de Nissl de la sustancia negra pars compacta de un ratón tratado con reserpina a razón de 5 mg kg^{-1} , intraperitoneal por 5 días consecutivos, lo que produce un déficit severo de dopamina cerebral, una disminución en la sinapsis glutamatergicas y en las espinas de las neuronas estriatopálidas medias (134x). **B.** Después de 30 días de la administración del bionanomaterial, se observa una recuperación de la región de estudio (134x).

receptores celulares, enzimas o neurotransmisores.

Otro abordaje que resulta interesante y que involucra la producción constante de GDNF dentro del parénquima cerebral, es la inserción de virus por diseño con ADN recombinante que sean capaces de transferir genes *in situ* y así lograr la estabilidad de liberación del compuesto, que no puede ser alcanzado con las

microesferas o bombas de infusión externas. Sin embargo, el riesgo de utilizarlos es que pueden desencadenar una reacción inmunológica severa y así comprometer el resultado terapéutico que se espera (Tabla 2).

CONCLUSIÓN

La comprensión de los principios básicos del funcionamiento biológico permitirá a los

Tabla 2. Eficacia de diferentes vectores transportadores de GDNF (lentivirus, adeno-virus asociados y adenovirus) para inducir la tirosina hidroxilasa (TH) en el mesencéfalo de diferentes modelos animales de EP.

Virus	Tiempo	Especie	Tipo de lesión	Eficacia Células TH+	Duración de la expresión	Toxicidad	Referencia
Lentivirus	1 semana previa	Rata	MFB axotomía	100% incr.	1 semana	NA	Deglon y col. (2000)
	2 semanas previas	Ratón	Estriatal 6-OHDA	100% incr.	NA	NA	Bensadoun y col. (2000)
	1 semana previa	Rata	Estriatal 6-OHDA	126% incr.	4 semanas	NA	Rosenblad y col. (2000)
Adeno- virus asociados	1 semana previa	Rata	MPP+	No cambio	1 semana	Ninguna	Eberhardt y col. (2000)
	3 semanas previas	Rata	Estriatal 6-OHDA	73% incr.	10 semanas	NA	Mandel y col. (1997)
	15 min después de la lesión	Rata	Estriatal 6-OHDA	60% incr.	2 semanas	NA	Mandel y col. (1999)
Adenovirus	1 semana previa	Rata	Estriatal 6-OHDA	200% incr.	7 semanas	Ninguna	Choi-Lundberg y col. (1997)
	1 semana previa	Rata vieja	Estriatal 6-OHDA	86% incr.	6 semanas	Toxicidad del vector	Connor y col. (1999)

dedicados a la ingeniería biomédica desarrollar mecanismos de neuroprotección que eventualmente tendrían un potencial terapéutico. Deberá tomarse en cuenta que la elaboración de bionanomateriales que sean aptos para tratar o prevenir la EP debe cumplir los siguientes requisitos: ser biocompatible, biodegradable, química y mecánicamente estable, no tóxico, maleable y controlable. Creemos que el camino que se presenta frente a nosotros, depara grandes retos para poder lograr los efectos neuroprotectores deseados para la EP.

REFERENCIAS

Apfel SC (1997) Clinical Applications of Neurotrophic Factors. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Beal MF (1996) Therapeutic effects of nitric oxide synthesis inhibition in neuronal injury. In: Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease. Olanow CW, Jenner P, Youdim M, (eds). Academic Press, London pp. 91-101.

Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD & Aebischer P (2000) Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp. Neurol.* 164: 15–24.

Bredesen DE (1995) Neural apoptosis. *Ann. Neurol.* 38: 839-845.

Chen BT, Avshalumov MV & Rice ME (2002) Modulation of somatodendritic dopamine

- release by endogenous H₂O₂: susceptibility in substantia nigra but resistance in VTA. *J. Neurophysiol* 87: 1155-8.
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL & Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL & Bohn MC (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275: 838–841.
- Commissiong JW, Takeshima T, Johnston JM & Shimoda K (1997) Effects of transforming growth factors on dopaminergic neurons in culture. *Neurochem.* 30: 393-399.
- Connor B, Kozlowski DA, Schallert T, Tillerson JL, Davidson BL & Bohn MC (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged parkinsonian rat. *Gene Ther.* 6: 1936–1951.
- De Lau KM & Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5: 525-535.
- Deglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, & Aebischer P (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11: 179–190.
- Deierborg T, Soulet D, Roybon L, Hall V & Brundin P (2008) Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Progress Neurobiology* 85: 407–432.
- Dewey RB, Jr. (2004) Management of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology*, 62 (Suppl. 4): S3-S7.
- Eberhardt O, Coelln RV, Kugler S, Lindenau J, Rathke-Hartlieb S, Gerhardt E, Haid S, Isenmann S, Gravel C, Srinivasan A, Bahr M, Weller M, Dichgans J & Schulz JB (2000) Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinemodel of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 20: 9126–9134.
- Finberg JP, Lamensdorf I & Armoni T (2000) Modification release by selective inhibitors of MAO-B. *Neurobiology* 8: 137-142.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchack PA, Collins F, Hoffer, BJ & Gerhardt GA (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380: 252-255.
- Gille G, Hung ST, Reichmann H & Rausch WD (2006) Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Annals New York Acad. Sci.* 1018: 533-540.
- Goldstein P & Kroemer G (2006) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32: 37-43.
- González-Torres LC & Armendáriz-Borunda J (2005) Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson Immunologic aspects in the Parkinson disease. *Arch. Neurocién.* 10: 168-169.
- Griffiths PD, Dobson BR, Jones GR & Clarke DT (1999) Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease an *in vitro* study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* 122: 667-673.
- Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S & Jenne P (2002) Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration.

Artículos

- Neuroscience* 110: 49-58.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 368-376.
- Ju WYL, Holland DP, Tai C & Kwan M (1994) (-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis. *J. Neurochem.* 63: 1572-1575.
- Kienzi E, Jellinger K, Stachelberger H & Linert W (1999) Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Life Sci.* 65: 1973-1976.
- Mandel RJ, Snyder RO & Leff SE (1999) Recombinant adeno-associated viral vector-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer protects nigral dopamine neurons after onset of progressive degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 160: 205-214.
- Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO & Leff SE (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4083-4088.
- Moussaoui S, Obinu MC, Daniel N, Reibaud M & Blanchard V (2000) The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 166: 235-245.
- Mytilineou C, Radcliffe PM & Olanow CW (1997) L-(-)-Desmethylselegiline, a metabolite of L-(-)-selegiline, protects mesencephalic dopamine neurons from excitotoxicity in vitro. *J. Neurochem.* 68: 434-436.
- Nicotera P & Leist M (1997) Apoptosis and control of cell death. In: *Neuroprotection in CNS Diseases*. Bär PR, Flint Beal M, (eds). Marcel Dekker, NY. Pp. 319-330.
- Nussbaum RL & Ellis CE (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New Engl. J. Med.* 348: 356-1364.
- Orive G, Anitua E, Pedraz J & Emerich D (2009) Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 682-692.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J & Shen J. (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279: 18614-18622.
- Rosenblad C, Kirik D & Bjorklund A (2000) Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Exp. Neurol.* 161: 503-516.
- Schapira AHV (2008) Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7: 97-109.
- Youdim MBH, Edmondson D & Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 295-309.



www.smbb.com.mx