

INDUCCIÓN A LA CIENCIA, LA TECNOLOGÍA
Y LA INNOVACIÓN EN LA REGIÓN CENTRO

VOL. III, NUM. 3

Ciencias de la Salud



19° Verano
de la Ciencia
Región Centro



Ciencias de la Salud



Ciencias de la Salud

DESCRIBIR LA EXPOSICIÓN POR AGUA CONTAMINADA CON ARSÉNICO EN GUANAMÉ SLP EN MUJERES EMBARAZADAS POR MEDIO DE UNA ENTREVISTA SEMI-ESTRUCTURADA Y UNA FRECUENCIA DE ALIMENTOS. **8**

Valeria Abigail Vázquez Obregón y **Alicia Villagómez Carvajal**

IDENTIFICACIÓN DE CITOSINAS Y ADIPOCITOQUINAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN **14**

Nancy Jazmín Pérez Rodríguez y **Lizeth García Torres**

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES DE DIABETES MELLITUS, CONOCIMIENTOS Y ESTILOS DE VIDA EN DOS GRUPOS UNIVERSITARIOS DE IRAPUATO: ESTUDIO COMPARATIVO **16**

Aldaco Ramírez Sandra Patricia¹ y **Barreto Arias Ma. Eugenia**²

CORRELACION DE LA INGESTA DE VITAMINA D Y CALCIO CON INDICE DE MASA CORPORAL EN PERSONAS CON Y SIN ANTECEDENTES DE DIABETES TIPO 2. **20**

Reyna Guadalupe Escamilla Hernández¹ y **Dr. Nicolás Padilla Raygoza**², **Dra. Silvia del Carmen Delgado Sandoval**³

DISRUPTORES ENDOCRINOS **24**

Pedro Israel Silva Martínez y **Antonio de León Rodríguez**
Universidad Autónoma de Zacatecas.

EFFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO FRENTE A LA EXPOSICIÓN DE ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO SOBRE CÉLULAS NEURALES TRONCALES HUMANAS (Co-tratamiento) **29**

Gutiérrez Colunga, M1. y **Castillo Martín del Campo, C. G2.**

RIESGOS QUE CORREN LOS ESTUDIANTES DE LA LICENCIATURA DE NUTRICIÓN DE DESARROLLAR ALGÚN TRASTORNO DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA EN UNA UNIVERSIDAD DE SAN LUIS POTOSÍ **33**

Sofía González García¹ y **Lizeth García Torres**²

FRECUENCIA DE NEUROPATÍA DIAGNOSTICADA POR TERMOGRAFÍA EN INDIVIDUOS SIN DIABETES Y SIN CARGA GENÉTICA PARA DIABETES MELLITUS 2, INDIVIDUOS SIN DIABETES Y CON CARGA GENÉTICA PARA DIABETES MELLITUS 2 Y PACIENTES CON DIABETES MELLITUS 2.

Cueli Bárcena, S; Hernández Gómez, J.F.; Rodríguez Leyva, I.

DESARROLLO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA MEDIR CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS J774.

Cueli Bárcena, S; Hernández Gómez, J.F.; Rodríguez Leyva, I.

MODIFICACIÓN DE LA DENTINA CON HIPOCLORITO DE SODIO AL 2.25% COMO IRRIGANTE ENDODONTICO APLICADO A DIFERENTES TIEMPOS

Omar Pérez Reséndiz¹ María Verónica Méndez González ², Ana María González Amaro²

INVESTIGACIÓN-ACCIÓN PARTICIPATIVA PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL ENTORNO SOCIO-AMBIENTAL DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN VILLA DE REYES, SAN LUIS POTOSÍ

Mitzi Montserrat Castillo Hernandez¹; Hernández-Ibarra, Luis Eduardo²., Y; Zacarías, Juan Manuel².

HONGOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS ¿CÓMO IDENTIFICARLOS RÁPIDAMENTE EN INFECCIONES HOSPITALARIAS?

Luna Mena, M , Hernández Carreón, J.O.A y Castaño Navarro, I.B. ²

DETERMINACIÓN DE MARCADORES CONDUCTUALES Y PROTÉICOS EN UN MODELO TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Sánchez Romero, María Luisa.¹; Niño Esquivel, Sandra A.²; Zarazúa Guzmán Sergio²; Salgado, Roberto³

USO DE ROSUVASTATINA EN PACIENTES CON QUEMADURAS EN LA DISMINUCIÓN DE INTERLEUCINAS INFLAMATORIAS

Montes Rodríguez María Fernanda¹ y Sánchez Aguilar Jesús Martín².

COMPARACIÓN ENTRE PCR EN TIEMPO REAL Y PCR DIGITAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN PACIENTES EMBARAZADAS, CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Hernández García Katia Ximena¹, Martínez Martínez Rita Elizabeth²

36

42

47

50

53

57

62

65

Micronúcleos como biomarcador en pacientes femeninos con factores de riesgo para adquirir el virus del papiloma humano (VPH) **68**

Karla Alhelí Prezas Pichardol y Luz Eugenia Alcántara Quintana²

EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE LA DENTINA DESPUÉS DEL USO DE ÁCIDO ETILENDIAMINO TETRAACÉTICO (EDTA) AL 10% Y 17% COMO AGENTE DE IRRIGACIÓN EN LA TERAPIA ENDODÓNTICA, POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y ESPECTROSCOPIA RAMAN. **71**

Sánchez Medina Juan Gerardo¹ y Méndez Gonzales María Verónica²

ANÁLISIS DE MORTALIDAD ASOCIADA A VIRUS DE INFLUENZA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA POR REGIONES DE LA REPÚBLICA MEXICANA **76**

Gerardo Rivera Alfarol y Daniel Ernesto Noyola Cherpitel²

EPIDEMIOLOGÍA DE SALMONELLA SPP Y BRUCELLA SPP EN POBLACIÓN INFANTIL DE UNA REGIÓN NORTE CENTRO DE MÉXICO **81**

Barajas Morales Gabriela Abigail y Silva Cazares Macrina Beatriz

EXPERIENCIAS EN LA RESTRICCIÓN DE LÍQUIDOS DE PERSONAS EN HEMODIÁLISIS. UN ESTUDIO CUALITATIVO EN SAN LUIS POTOSÍ. **84**

Andrea Cristina Montejano Alvaradol y Luis Eduardo Hernández Ibarra

PURIFICACIÓN DE LA GP70 RECOMBINANTE DE Sporothrix brasiliensis EXPRESADA EN EL SISTEMA PROCARIONTE Escherichia coli **88**

Gutiérrez Torres, A1.; Mora Montes, H. M2.

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA-ESTRUCTURAL DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE TRIACILGLICEROLES EN EL ADIPOCITO **92**

Paloma Ríos Medinal y Samuel Lara González²

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA MEDIANTE EL MÉTODO HIDROTERMAL ASISTIDO POR MICROONDAS **96**

Fonseca Maya Omar¹ y Velázquez Castillo Rodrigo Rafael²

DIFERENCIACIÓN DE 3 SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DE LA FRACCIÓN ESTROMAL- VASCULAR DEL TEJIDO ADIPOSEO EN ADIPOCITOS MADUROS

Natalia García-Orihuela Xarubet Ruiz-Herrera² y Yazmin Macotella-Guzmán

LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ARSÉNICO ALTERA RITMO CIRCADIANO ACENTUANDO LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN MODELO 3XTG-AD

Ledesma Mendoza, Brenda¹; Niño Esquivel, Sandra A²; Salgado-Delgado, Roberto³.

RELACIÓN ENTRE EL COMPORTAMIENTO DE AUTOMANEJO Y SINTOMAS DEPRESIVOS EN ADULTOS MAYORES CON ENFERMEDAD CRÓNICA DIAGNOSTICADA

Carrillo-Contreras, Treccy Yohana ; Delabra-Salinas, María Magdalena ; Cordova-Peñarrieta María Isabel

RECUPERACIÓN DE NAPROXENO POR MEDIO DE MEMBRANAS LÍQUIDAS EMULSIONADAS.

CNinfa Anahi Lleverino Sifuentes¹ y Teresa Alejandra Razo Lazcano²

DIFERENCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN RECIÉN NACIDOS CON Y SIN LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA

Pérez-Ruíz Melissa , Delabra-Salinas María Magdalena y Rodríguez Valdez Atenas

EVALUACION DE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES DE LOS HIDRILIZADOS DE B-Lg AISLADA A PARTIR DE UN CONCENTRADO DE SUERO DE LECHE

Ramírez Cuenca Daniela de Jesús ¹ y Ávila Rodríguez Mario ²

EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL N-GLUCOSILACIÓN EN PROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR LC-MS EN PACIENTES CON RIESGO CARDIOVASCULAR.

María Teresa Rivas Medina , Carla Montserrat Ramírez Ponce y Nicté Guadalupe Figueroa Vega .

IMPACTO DE LA DIABETES EN HUESO

Jorge Andrés Dávila-Moreno¹, Gabriel Herrera-Pérez² y Esmeralda Rodríguez-Miranda³

EXPOSICIÓN AMBIENTAL DURANTE EL EMBARAZO Y MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN EL HOSPITAL MATERNO INFANTIL DE IRAPUATO

Jessica Paola Delgado González , Dr. Benigno Linares Segovia y Dra. Virginia Álvarez Jiménez

100

105

110

113

117

121

125

128

133

| | |
|--|------------|
| CAMBIOS CELULARES PRODUCIDOS EN EL SISTEMA NERVIOSO DURANTE EL DESARROLLO LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN RATONES 3xTg-AD. María Fernanda Del Aguila Cabrera ¹ y Sofía Yolanda Díaz Miranda ² | 136 |
| CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA Claudia Elizabeth Ramírez Rodríguez ¹ y Martha Leticia Santos Martínez ² | 140 |
| EVALUACIÓN DEL METABOLISMO ÓSEO EN RATAS WISTAR CON DIABETES EXPERIMENTAL Ramírez-Chan Irasema Sacnicté ¹ Rodríguez-Miranda Esmeralda ² Herrera-Pérez Gabriel ³ | 143 |
| DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES EN MUESTRAS DE AGUA DE BEBEDEROS DE ESCUELAS PÚBLICAS DEL MUNICIPIO DE IRAPUATO. Fernanda Gómez Páramo , Francisco Alejo Iturvide , Maria Azucena Márquez Lucio | 147 |
| VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO TEMPRANO, NO INVASIVO DE CÁNCERES EN HUMANOS, MEDIANTE EL EFECTO RAMAN REALIZADO POR SUPERFICIES (SERS), POR NANOPARTÍCULAS Vela Solís, D.1; Hernández Arteaga A.2; Navarro Contreras H.R.2 | 150 |
| GENERACIÓN DE MUTANTES EN EL HONGO PATÓGENO <i>Sporothrix schenckii</i> Daniela Itzel Sandoval Amézquita ¹ y Héctor Manuel Mora Montes ² | 154 |
| TRANSFORMACION DE E.COLI (DH5 a) PARA LA PRODUCCION DE LAS PROTEINAS: α-LACTOALBUMINA Y LACTOFERRINA HUMANA Lorena Valeria Carmona Martínez y Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez | 158 |
| CONTRIBUCIÓN DE LAS FRUTAS Y LAS HORTALIZAS EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD HUMANA (MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL FRUTO DEL MANGO ATAULFO) Anahi Gudiño Gudiño ¹ y Elhadi Yahia Kazuz ² | 162 |

TITULO: ESTADO NUTRICIONAL, Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES SOCIALES, DEPRESIÓN, IMAGEN CORPORAL, AL ESTILO DE VIDA, ACTIVIDAD FÍSICA Y CALIDAD DEL SUEÑO DEL ADULTO MAYOR DE LA COMARCA LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO.

ESTUDIANTE: LLUVIA CRISTINA SAUZANIÑO Y RESPONSABLE DEL PROYECTO: D.E. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ RINCÓN.

COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN NEONATOS CON Y SIN LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA.

Sánchez-Aguilar Cindy Aleyois ; Delabra-Salinas, María Magdalena ; Rios-Willars, Ernesto

ESTADO NUTRICIONAL, Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES SOCIALES, DEPRESIÓN, IMAGEN CORPORAL, AL ESTILO DE VIDA, ACTIVIDAD FÍSICA Y CALIDAD DEL SUEÑO DEL ADULTO MAYOR DE LA COMARCA LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO.

ESTUDIANTE: ANA MARIA GARCIA CAREAGA Y RESPONSABLE DEL PROYECTO: D.E. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ RINCÓN.

EFFECTO DEL ACEITE DE KRILL SOBRE LA CONDUCTA ALIMENTICIA DE RATAS MACHO ADULTAS SOMETIDAS A RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO DURANTE SU DESARROLLO INTRAUTERINO

Ureño Segura Magali Irais. Flores Mancilla Leopoldo Eduardo

ANTECEDENTES FAMILIARES DE DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER Y EL RIESGO DE CÁNCER DE MAMA

Ilse María Castro Loredó 1 y Carolina Ortega Olvera 2

166

169

175

178

182

DESCRIBIR LA EXPOSICIÓN POR AGUA CONTAMINADA CON ARSÉNICO EN GUANAMÉ SLP EN MUJERES EMBARAZADAS POR MEDIO DE UNA ENTREVISTA SEMI-ESTRUCTURADA Y UNA FRECUENCIA DE ALIMENTOS

Valeria Abigail Vázquez Obregón y Alicia Villagómez Carvajal

RESUMEN

El arsénico es un metaloide que lo podemos encontrar en el aire, agua y suelo, de acuerdo a la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades el ingerir una dosis mayor de 180mg puede ser mortal. El objetivo de esta investigación es presentar la exposición de mujeres embarazadas por agua contaminada con arsénico en Guanamé, SLP. La metodología empleada fue una entrevista semi-estructurada y una frecuencia de alimentos aplicada a dos habitantes de este lugar lo cual dio como resultado que ninguna de ellas presento estar expuestas a arsénico debido a que su consumo diario de agua es potable utilizándola también para la preparación de alimentos que consumen, sin embargo presentan cierto rechazo a el agua proveniente de pozos por el conocimiento de que está contaminada con desechos fecales, como les hicieron saber las autoridades que fueron a hacer las tomas de muestra.

ABSTRACT

Arsenic is a metalloid that we can find it in the air, water and soil, according to Agency for Toxic Substances and Disease Registry the eat a higher dose of 180mg can be fatal. The objective of this research is to present exposure of pregnant women by water contaminated with arsenic in Guaname, SLP. The methodology used was a semi-structured interview and a food frequency applied to two habitants of this place which resulted was that none of them presented be exposed to arsenic because their daily consumption of water is potable use it also for the preparation of foods they eat. However show a certain rejection to the water from wells in the belief that it is contaminated with fecal waste.

As they were informed by the authorities that they were going to make the sample shots

Palabras clave: arsénico, metilación, eritrocitos, queratina, teratógenos, mutagénicos

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide que se encuentra de manera natural, distribuido en el ambiente y suelos. La dispersión de este en el ambiente sucede a causa de procesos comerciales o la minería. Se clasifica en: inorgánicos, orgánicos y gas arsina. Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) el arsénico inorgánico y el gas arsina son más peligrosos que el arsénico orgánico. Los compuestos inorgánicos pueden ser trivalentes o preivalentes, los compuestos inorgánicos trivalentes más comunes son el trióxido de arsénico, el tricloruro de arsénico y el arsenito sódico. Los compuestos inorgánicos preivalentes son el ácido arsénico, los arsenatos, el pentóxido de arsénico, el arsenato de calcio y de plomo.

El agua potable puede contener hasta ciertos microgramos por litro, los compuestos que tienen mayor toxicidad son los trivalentes y en cambio los preivalentes logran causar muy poco efecto sobre la actividad enzimática. El ingerir una dosis mayor de 180mg de arsénico puede llegar a ser mortal. (atsdr, 2013).

El objetivo de este ejercicio de investigación exploratorio es identificar los usos del agua y la posible exposición de mujeres embarazadas a agua contaminada con arsénico en Guanamé, SLP., luego de que la COEPRIS reportó el estado de presencia de arsénico en dicha localidad.

La contaminación del agua enfocada a la salud es la adición de sustancias o residuos al agua que pueden representar un riesgo para el estado de salud de un individuo y puede ser por diferentes factores o mecanismos, siendo considerado un gran problema de salud pública. (UNICAN, 2011), Sin embargo el arsénico se puede encontrar de manera natural en el agua por lo que no se podría considerar propiamente contaminación por el hecho de estar presente. Facsa (2014) Menciona que en este caso se considera contaminación hasta que el contenido de este metal pesado rebasa los límites permisibles.

La ATSDR (2011) explica que la ingesta y la inhalación son las principales vías por las cuales el arsénico puede entrar en nuestro organismo. Lo primero que pasa con el arsénico en el organismo es que se distribuye principalmente al torrente sanguíneo para unirse a los glóbulos blancos y rojos. Después se somete a una metilación en el hígado y menciona que la metilación de los compuestos inorgánicos de arsénico puede ser una ruta de intoxicación. Cuando hay una acumulación de arsénico para metilación en el hígado se reserva en los tejidos blandos. Herrera (2013) señala que el arsénico tiene una afinidad por el bazo. El bazo es un órgano que tiene como función reciclar los eritrocitos que ya están dañados o envejecidos, Cuando el arsénico se une a las membranas de los eritrocitos va a oxidar los lípidos que forman parte de ellos y estos van a perder la

capacidad para realizar sus funciones, al ocurrir esto los eritrocitos van a ser desechados al bazo favoreciendo que el arsénico que se encontraba en los eritrocitos se acumule en este órgano.

El arsénico puede llegar a la placenta y leche materna por medio de la unión a las membranas de los eritrocitos. Posterior a esto se absorbe por las células de algunos tejidos mediante un sistema activo de transporte. Independientemente de que se excrete el arsénico no significa que se excrete completamente todo, lo demás se acumulará en tejidos ricos en queratina (Herrera, 2013).

El arsénico no solo nos provoca riesgos cancerígenos, también hay presencia de efectos mutagénicos y teratogénicos que inducen a la embarazada a abortos prematuros, muerte fetal, y malformaciones al nacer (Córdoba, 2006). Entre otras cosas también estimula la vejez prematura y la esterilidad.

Bueno (2012) expone que en el mundo más de 100 millones de personas están expuestos a arsénico por el consumo de agua que proviene de pozos muy profundos.

METODOLOGIA

El diseño de la investigación se realizó por medio de un método cualitativo con trabajo de campo para registrar las características del lugar en donde viven y hábitos de mujeres embarazadas que las pueden hacer vulnerables a la exposición de arsénico en agua de pozos. Se tomaron en cuenta aspectos como la edad, el peso y el estado socioeconómico. La población son las mujeres de San Luis Potosí y la muestra son las mujeres embarazadas de Guanamé, San Luis Potosí y se utiliza un tipo de muestra aleatorio simple.

Las técnicas para la recolección de la información fue una entrevista semi-estructurada basada en factores a los que se puede someter una persona respecto al arsénico.

Se realizó una recolección de frecuencia de alimentos de los cuales se rescató la información de frutas y verduras entre otros alimentos más consumidos.

Área de estudio

Guanamé es ubicado en el municipio de venado del estado de San Luis Potosí, que consta de 409 habitantes y de acuerdo a América (s.f) hay 162 viviendas de las cuales el 73.3% tienen agua entubada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fue posible aplicarles la técnica de recolección de información a dos mujeres de las cuales obtuvimos las siguientes respuestas.

Estado de su frecuencia de consumo de agua

Esta categoría es referente a la frecuencia que tienen las personas de consumo de agua ya sea diariamente, semanalmente o mensualmente, para tener una perspectiva acerca de cuánta agua es la que ellos están ingiriendo.

E1.-“...Híjole, Pues una botella de estas de 600 ml y a lo mejor me tomaré que será... Una botellita diaria pero también tomo mucho jugo de arándano y de naranja que compro de tienda marca Sams y sería todo lo líquido que consumo al día...”

E2.-“...Consumo de agua diaria de amenos un litro y medio ya que sólo tengo un riñón entonces me es imposible tomar más cantidad de agua, pues me lo prohibió el doctor, no mucha agua...”

Lugar en donde toman el agua que consumen.- Con esta categoría se pretende saber de dónde consiguen el agua para consumirla, ya que puede ser por medio de pozos, del garrafón, embotellada, de algún garrafón rellenable y depende del lugar de donde la toman pueden desarrollarse ciertos factores de riesgo al consumirla.

E1.- “...Normalmente son aguas de éstas, embotellada y cuando se termina la vuelvo a rellenar con agua del garrafón. Ya que la de aquí no esta buena, es muy sucia...”

E2.- “...Del garrafón, ya que viene un camión cada 8 días a surtir el agua potable, el agua de los pozos está muy sucia y contaminada porque todos deshechos de los inodoros se van ahí...”

ATSDR (2013) nos dice que el agua que se consume contaminada con arsénico dependerá de la exposición que se haya tenido con el aire. El agua puede ser contaminada de forma que este en contacto con residuos agrícolas, una mala manipulación al eliminar los residuos de arsénico y la minería.

Estado de hábitos de tabaquismo. Este factor es otro medio de exposición a arsénico.

E1.- “...No, ni antes de embarazarme y tampoco me encuentro alrededor de las personas que fumo...”

E2.- “...No, nunca he fumado y pues tampoco mi esposo, nunca nunca...”

La OMS (2016) menciona la exposición a arsénico inorgánico por medio del consumo de tabaco ya que este obtiene el arsénico de forma natural por las plantas de tabaco.

Descripción de los dolores estomacales. Este factor nos permite reconocer dolores estomacales en caso de haberlos presentado, que pudieran denunciar algún tipo de intoxicación por arsénico.

E1.- "...A un principio del embarazo si, se sentía como gastritis o colitis y se me inflamaba el estómago y pues me dolía..."

E2.- "...Un dolor en la boca del estómago que me ardía y sentía mucho dolor de estómago..."

Bueno (2012) menciona que parte de los síntomas de haber estado expuesto al arsénico es un cuadro gastrointestinal caracterizado por dolor abdominal acompañado de vómitos, presencia de diarrea y deshidratación

Cambios en la piel o salpullidos presentados en los últimos meses.- Esta categoría nos permite saber si existe o existió contacto con arsénico

E1.- "...Hubo aparición de lunares como si fueran pequitas, gomas o piquetes pero yo creo es que se debían por lo mismo del embarazo..."

E2.- "...No, no he presentado ninguno de estos cambios..."

Campos (2010) Nos menciona que la exposición a arsénico tiene signos como el presentar un oscurecimiento de la piel en manos, pecho, miembros, encías y espalda. La queratosis es otro signo en donde se presentan nódulos en las plantas de los pies y manos.

Frecuencia de consumo de frutas y verduras.- Esta categoría nos habla de hábitos alimenticios (preparación y consumo) y dietas equilibradas, además de cierto poder adquisitivo, así como de otras sustancias a las que están expuestas como el cloro. De igual manera se deben revisar las concentraciones de arsénico que pudieran tener si es que son cultivadas localmente.

E1.- "...La fruta picada con yogurt ya sea en el desayuno o en la noche la consumo diario y las lavo con agua de garrafón y la verdura igual el consumo diario cocido a vapor con agua del garrafón..."

E2.- "...Las verduras y las frutas las consumo diariamente, las lavo con cloro y agua del garrafón y lo que son las verduras las cocino a vapor igual con agua de garrafón..."

De acuerdo a la OMS, 2016, la exposición al arsénico también puede ser a causa del consumo de alimentos regados con agua contaminada como lo son las frutas y las verduras.

Frecuencia de alimentos diarios.- Esto ayuda a comprender si aparte del agua pueda existir otro medio de exposición al arsénico en la dieta habitual.

E1.- "...Pues aquí frijoles refritos, huevo, consumo arroz 4 días a la semana, carne roja, pollo pero el pescado no, ese sí que es muy difícil de conseguir aquí..."

E2.- "...Normalmente lo básico como lo es el huevo, los frijoles, licuados de papaya con avena y con manzana, papa cruda, arroz, queso, pollo y lo que son las carnicas..."

De acuerdo a Médica B. (2016) la FDA confirmó que se encontraba arsénico inorgánico acumulado en el hígado del pollo. Se han encontrado estudios en los cuales el consumo de arsénico presenta el desarrollo de la enfermedad de bowen. El pollo es otro de los alimentos que pueden estar contaminados con arsénico debido a que el pienso que ellos consumen es mezclado con el arsénico para que crezcan más rápido, con un mejor aspecto como su olor y sabor, con menos alimento.

Uno de los alimentos que consumimos en nuestra dieta habitual es el arroz, alimento que necesita cultivarse en campos inundados de agua según Mosley (2017) este alimento puede contener arsénico inorgánico.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de las entrevistas y las frecuencias realizadas no son suficientes para establecer conclusiones de carácter científico, sin embargo la exploración permite identificar el uso de agua embotellada vendida en tiendas de abarrotes, garrafones de purificadoras de la región, que valdría la pena conocer sus procesos, su calidad, además les llevan agua con una pipa semanalmente por lo que no consumen agua de sus pozos

La población desconoce sobre la presencia de sustancias nocivas en los pozos, sin embargo tiene de cierto que están contaminados con materia fecal de las fosas sépticas, por lo que no toman agua de pozo, ni cocinan con ella por recomendación de autoridades de salud que mantienen a la población tranquila y a salvo pero sin conocimiento real de su condición ambiental.

La repugnancia que sienten del agua de los pozos contaminada con desechos fecales provoca que la pobla-

ción no la consume, sin embargo, la condición de contaminación en los pozos por coliformes fecales es una constante en gran parte del territorio rural del país, por lo que es notable la atención que el municipio pone para abastecer Guanamé de otras fuentes de agua potable, por lo que se puede inferir que la causa de tanto trabajo de las autoridades es mantenerlos a salvo del arsénico.

Queda pendiente hacer una revisión de las concentraciones de arsénico en productos vegetales y animales que se producen en la localidad, al igual que caracterizar la composición de las aguas superficiales, así como identificar la fuente de contaminación de las aguas de los pozos. La finalidad es proponer estrategias alimenticias para compensar los efectos de la exposición para la población.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Adán Vázquez Ávila y Sandra Obregón Martínez por darme todo incluyendo la oportunidad de estudiar y participar en este proyecto de investigación, y a mis tres hermanos por su apoyo y amor incondicional.

A la Mtra. Alicia Villagómez Carvajal por permitirme formar parte de este proyecto de investigación, aportarme mucho conocimiento, apoyarme en cada etapa del proceso, por ser tan accesible y hacer corto el tiempo de estancia con sencillez y amabilidad.

BIBLIOGRAFIA

Libros

Córdoba, D. (2006). Arsénico. En D. Córdoba, Toxicología (págs. 303-306). Bogotá, Colombia: El manual moderno.

Artículos de revista

Bueno, d. M. (2012). Presencia de arsénico y coliformes en agua potable del municipio de Tecuala, Nayarit, México en Internacional de contaminación ambiental, Num.2, Vol. 28, [pp 128-130]

Campos, V. M. (2010). Determinación de arsénico en abastecimientos de agua para consumo humano de la provincia de Cartago, Costa Rica. Acta médica costarricense, Núm. 2, Vol. 52, [pp 96-98]

Herrera, A. (2013). Arsenic bioaccumulation in animal tissues after consumption of contaminated water experimentally.

Artículos en línea

Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades, ATSDR. "La toxicidad del arsénico" en Division of toxicology and Environmental Medicine. Consultado en <https://www.atsdr.cdc.gov> (Fecha de consulta 2 Julio 2017)

UNICAN. (2011). "Contaminación del agua " en ocw unican pp 1-5 consultado en <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/salud-publica-y-atencion-primaria-de-salud/otros-recursos-1/lecturas/bloque-iii/Contaminacion%20del%20agua.pdf> (Fecha de consulta 5 Julio 2017)

Sitio web

América, P. (s,f). Guanamé. México: Pueblos de américa. Recuperado de México.pueblosdeamerica.com/i/Guaname

Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades, ATSDR. (2009). Estudios de caso en medicina ambiental. Atlanta: Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades. Recuperado de https://www.atsdr.cdc.gov/es/esem/arsenic/destino_biologico.html

Facsa, F. (2014). Metales pesados: Facsa ciclo integral del agua. Recuperado de www.facsa.com/el-agua/calidad/metales/20pesados

Médica, B. (2016). FDA admite que la carne de pollo contiene arsénico cancerígeno. Argentina: La biblioteca. Recuperado de www.Biblioteca.medica.com.ar/2016/03

Mosley, M. (2017). Como reducir la cantidad de arsénico que se encuentra en el arroz que consumes. BBC: Mundo. Recuperado de www.bbc.com/mundo/noticias

IDENTIFICACIÓN DE CITOSINAS Y ADIPOCITOQUINAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Nancy Jazmín Pérez Rodríguez y Lizeth García Torres

RESUMEN

En México la obesidad es una pandemia que está actualmente frecuente en la población y presenta en múltiples parámetros fisiológicos como la presión arterial, sensibilidad a la insulina y la concentración sérica de lípidos. Se ha descrito una correlación positiva entre el grado de obesidad y ciertos desórdenes asociados a la obesidad como la hipertensión arterial, dislipidemia y resistencia a la insulina. Las causas de la obesidad y sus consecuencias a nivel fisiológico son objeto de estudio actualmente. Es importante destacar que la obesidad es una causa principal de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. La obesidad se considera un estado de inflamación crónica, es un importante órgano endocrino secretor de muchos factores uno de ellos es el TNF-alfa que se expresa en y se secreta por el tejido adiposo, sus niveles se correlacionan con el grado de adiposidad y la resistencia a la insulina asociada. Orientación de TNF-alfa y / o sus receptores se ha sugerido como un tratamiento para resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

Palabras clave: TNF- α , obesidad, resistencia a la insulina

ABSTRACT

In Mexico the obesity is a pandemic that is that is currently prevalent in the population and presented in multiple physiological parameters such as blood pressure, insulin sensitivity and serum lipid concentration. Actually discover a positive correlation has been found between the degree of obesity and certain disorders associated with obesity such as hypertension, dyslipidemia and insulin resistance. The causes of obesity and its physiological consequences are currently under study. It is important to note that obesity is a major cause of insulin resistance and type 2 diabetes. Obesity is considered a chronic inflammatory state, an important endocrine secreting organ of many factors, one of which is TNF-alpha is expressed in secret by adipose tissue, its levels correlate with the degree of adiposity and associated insulin resistance. Orientation of TNF-alpha and its receptors has been suggested as a treatment for insulin resistance and type 2 diabetes.

INTRODUCCIÓN

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria secretada en el sistema inmunitario por monocitos y macrófagos, por linfocitos T y B, células NK y por leucocitos polimorfonucleares. El TNF- α también puede ser secretado por otros tipos celulares como los adipocitos. Este gen codifica una citosina pro inflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF).

Esta citoquina está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo de lípidos, y la coagulación. Esta citoquina ha sido implicada en una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, resistencia a la insulina, y el cáncer.

Fue uno de los primeros productos del tejido adiposo que se encontró a nivel molecular incrementando en la obesidad y contribuye a la resistencia de la insulina.

Sus concentraciones están relacionados con la adiposidad y se ven disminuidas en individuo con obesidad después de una pérdida de peso mejorando la sensibilidad a la insulina. (Sánchez-Muñoz 2005).

La obesidad, una epidemia con aumento de las tasas a niveles alarmantes, se asocia con comorbilidades incluyendo enfermedades cardiovasculares, artritis, ciertos tipos de cáncer, y enfermedades degenerativas del cerebro y otros órganos. Es importante destacar que la obesidad es una causa principal de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Como evidencia emergente ha demostrado en la última década, la inflamación es uno de los procesos críticos asociados con el desarrollo de resistencia a la insulina, la diabetes y las enfermedades relacionadas, y la obesidad se considera ahora como un estado de inflamación crónica de bajo grado. El tejido adiposo, además de su papel clásico como un depósito de almacenamiento de energía, también es un importante órgano endocrino secretor de muchos factores, cuyos local y niveles circulantes se ven afectados por el grado de adiposidad. La obesidad conduce a la infiltración del tejido adiposo expandido en macrófagos y aumento de los niveles en citoquinas proinflamatorias. La primera indicación de aumento de la liberación de citoquinas en la obesidad fue proporcionada por la identificación de aumento de la expresión de TNF-alfa, una citoquina proinflamatoria, en el tejido adiposo de ratones obesos en la década de 1990 (Tzanavari T 2010)

METODOLOGÍA

Se estandarizó la metodología de medición, utilizando una molécula de referencia como la adiponectina (Acrp30), la cual se sometió a una medición en el Micro-Raman Xplora PLUS (Figura 1) a una longitud de onda de 785nm en un rango de 200-1800 cm^{-1} de corrimiento Raman.



Figura 1. Micro-Raman XploRA PLUS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo el espectro Raman de adiponectina liofilizada para tener una referencia de los picos característicos (huella molecular) (Figura 2). La adiponectina se utilizó como molécula de referencia que está relacionada con la secreción del TNF-alfa, ya que existe una correlación con esta, en donde al aumentar el tejido adiposo se expresa una mayor cantidad de TNF-alfa y hay una disminución de Acrp30 (Kershaw E.E., 2004).

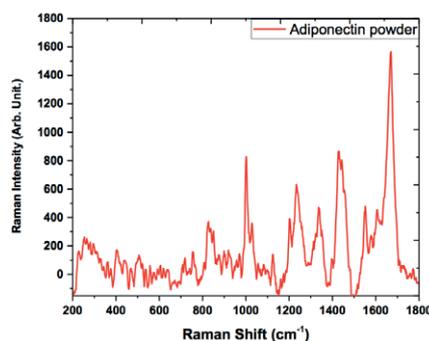


Figura 2. Huella Molecular de adiponectina liofilizada.

CONCLUSIÓN

La espectroscopía Raman es una herramienta que permite obtener la huella molecular de proteínas que pueden ser utilizados como biomarcadores de detección y evaluación de enfermedades crónicas degenerativas, como la obesidad.

La obtención de la huella molecular de adiponectina permite estandarizar la metodología de obtención de huellas moleculares de otras adipocitocinas y citosinas secretadas por el tejido adiposo o en relación a éste.

BIBLIOGRAFÍA

- Chan S., Kwon S., Koo T. W., Lee L. P., Berlin A. A. Surface-Enhanced Raman Scattering of Small Molecules from Silver Coated Silicon Nanopores, *Adv. Mater.* 15, No. 19, 1595-1598 (2003).
- González-Solís L., Martínez- Espinosa J. C., Martínez-Zerega B. E., Palomares-Anda P., Torres-González L. A., Vargas-Rodríguez H., Gallegos-Infante L. A., González-Silva R. A., Juárez-López H. A., Espinoza Padilla P. B. (2012), “Aplicaciones de la técnica de espectroscopia Raman de superficie amplificada en el diagnóstico del cáncer basado en el análisis de muestras de suero sanguíneo”
- Hotamisligil, GS, Arner, P., Caro, JF, Atkinson, RL, y Spiegelman, BM (1995). El aumento de expresión de tejido adiposo de factor de necrosis tumoral alfa en la obesidad humana y resistencia a la insulina. *Journal of Clinical Investigation* , 95 (5), 2409-2415.
- Kershaw Erin E., F. J. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2548-2556.
- Ramirez-Alvarado (2012) El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos .*Nutri.Hosp* http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000600001
- Sánchez-Muñoz (2005) Adipocinas , tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune .*Gaceta Médica de México* http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000600009
- <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf>
- Tzanavari T (2010) TNF-alpha and obesity. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173393>

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES DE DIABETES MELLITUS, CONOCIMIENTOS Y ESTILOS DE VIDA EN DOS GRUPOS UNIVERSITARIOS DE IRAPUATO: ESTUDIO COMPARATIVO

Aldaco Ramírez Sandra Patricia y Barreto Arias Ma. Eugenia²

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad compleja, con prevalencia y morbilidad altas, que cada vez más se presenta a edad temprana, por lo que realizar intervenciones preventivas es importante para disminuir factores de riesgo. Objetivo: Comparar las prácticas en la alimentación, actividad física, medidas antropométricas, percepción corporal y el conocimiento acerca de la Diabetes Mellitus tipo 2 en jóvenes universitarios con y sin AHF para la misma. Metodología: Estudio comparativo, transversal, a dos grupos de estudiantes de licenciatura (enfermería e ingeniería). En 72 participantes se midió antropometría (peso, talla, IMC, perímetro abdominal, circunferencia de cuello), nivel de glucosa en ayuno y conocimientos. Resultados: Ambos grupos presentan condiciones similares de riesgos a excepción en consumo de lípidos (alto en ingeniería).

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a complex disease, with high prevalence and morbidity, which is increasingly present at an early age, so that preventive interventions are important to reduce risk factors. Objective: to compare practices in diet, physical activity, anthropometric measures, body perception and knowledge about type 2 Diabetes mellitus in university students with and without Hereditary Family History (HFH) for de same. Methodology: a cross-sectional comparative study of two groups of undergraduate students (nursing and engineering), 72 participants measured anthropometry (weight, height, body mass index, abdominal circumference, neck circumference), level of glucose during fasting. Results: both groups present the same risk conditions except for lipid consumption (high in engineering).

Palabras Clave: Diabetes Mellitus, factores de riesgo, intervenciones preventivas, consumo de lípidos, ingeniería.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas, particularmente la diabetes mellitus, son las principales causas de mortalidad en México. De acuerdo con la American Diabetes Association (ADA), ("Guías ADA 2016," 2016) la diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia resultante de los defectos de la secreción o la acción de la insulina, o ambas. Existen muchos procesos fisiopatogénicos involucrados en su aparición, que varían desde la destrucción autoinmunitaria de las células beta del páncreas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina. La base de todas las alteraciones metabólicas es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos blanco. Esto último se debe a la secreción inadecuada de insulina o a la disminución de la respuesta tisular en alguno de los distintos puntos de la compleja vía de la hormona.

Este padecimiento está ampliamente relacionado con la obesidad y el síndrome metabólico. Se estima que en México cerca de 60% de los jóvenes entre 18 y 49 años presenta sobrepeso u obesidad y se identifica que la edad en la que inicia es cada vez más temprana, reportando un crecimiento exponencial en torno a un 2.3% cada año. Esta tendencia hará que en 20 años se cuadruple la prevalencia de la DM (American Diabetes Association, 2014). Ante esta situación es importante evaluar anticipadamente las poblaciones para tomar medidas preventivas, y de esta manera comprender los factores que perjudican el futuro de nuestra sociedad juvenil. En el grupo de edad citado, la enfermedad progresa y produce complicaciones de manera más acelerada que en adultos.

La DM se suele asociar a malos estilos de vida y un bajo nivel de actividad física, relación desproporcional de peso-talla (Índice de Masa Corporal en obesidad y sobrepeso), historia familiar de diabetes y nivel deficiente de conocimientos para la misma. Al existir un desequilibrio entre las calorías ingeridas y gastadas se genera un incremento del consumo de alimentos elevados en calorías; así como una disminución de la actividad física a consecuencia de estilos de vida sedentarios cada vez más notorios en la población juvenil, por causa de formas de trabajo-estudio, modos de desplazamientos y una creciente urbanización.

Esto conlleva a un exceso de lípidos postprandiales y glucosa circulante en el flujo sanguíneo que son tomados por el páncreas, hígado y tejido adiposo. Los adipocitos almacenan triglicéridos en gotas de grasa y producen hipertrofia de esta célula. Estas exposiciones en exceso provocan disfunción celular manifestada como anomalías en adipocinas, aumento en la circulación de ácidos grasos libres y un estado proinflamatorio. También afectan el músculo esquelético (acumulación de lípidos, resistencia periférica a la insulina), músculo cardíaco (deposición de lípidos) y disfunción endotelial. La exposición de las células β al exceso de nutrientes promueve la resistencia a la insulina y la exposición de los hepatocitos al exceso de grasas e hidratos de carbono provoca esteatohepatitis y resistencia a la insulina. (De Ferranti, Mozaffarian, & Sánchez Rodríguez, 2009)

Una vez evaluada esta situación se identifica la importancia de realizar un estudio para revisar las condi-

ciones en dos poblaciones universitarias, en enfermería vs ingeniería en gestión empresarial. Se presenta así como objetivo general: Comparar las prácticas en la alimentación, actividad física, medidas antropométricas, percepción corporal y el conocimiento acerca de la Diabetes Mellitus tipo 2 en jóvenes universitarios de Irapuato, Gto. Para ello, se contestará la pregunta de investigación ¿Cuál es la carrera con las mejores prácticas en la alimentación, actividad física, medidas antropométricas, percepción corporal y el conocimiento acerca de la Diabetes Mellitus tipo 2 en jóvenes universitarios de Irapuato, Guanajuato?

METODOLOGÍA

Fue una investigación cuantitativa, comparativa, transversal y observacional. Los participantes fueron 72 estudiantes universitarios de dos instituciones públicas de educación superior del municipio de Irapuato de la Licenciatura en Enfermería y Obstetricia (LEO) del Departamento de Enfermería y Obstetricia de la Universidad de Guanajuato (DEOI) y los de Ingeniería en Gestión Empresarial (IGE) del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). El muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

Las actividades que guiaron esta investigación fueron: 1) Se aplicó el test de conocimientos de DM, alimentación y actividad física, al igual que el Standard Figural Stimuli (SFS) y la medición antropométrica en los jóvenes seleccionados, 2) se interpretó cada test aplicado de acuerdo a los valores establecidos previamente en otros ejercicios de similitud, 3) se realizó el vaciado de los resultados en software IBM-SPSS –STATISTICS versión 22, 4) se realizó análisis estadístico con el software calculando frecuencias y porcentajes; así como las pruebas Chi2 para las variables cintura, cuello y actividad física; y t-Student para muestras independientes al comparar las variables ingesta calórica y macronutrientes y 5) se compararon y analizaron los resultados obtenidos de los grupos estudiados para determinar qué grupo presentaba mayores factores de riesgo a desarrollar la enfermedad. En la tabla 1 se describen los datos evaluados en cada participante:

Tabla. 1. Datos evaluados en los participantes

| | Material de medición | Tipo de material | Operacionalización de las variables | Referencias |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|---|--|
| AHF | Pregunta directa | | Con y sin AHF | - |
| Peso | Bascula mecánica de pesaje humano (kg) | | Valores obtenidos directamente | (Especiales, 2011) |
| Talla | Estadiómetro (cm) | | | |
| IMC | Formula: kg/m ² | Calculadora científica | 1-Desnutricion (16-18.49) 2-Normal (18.5-24.99) 3-Sobrepeso (25-27) 4-Obesidad (27.1-mayor a 40) | Apéndice normativo C (Secretaria de Salud, 2013) |
| Glucosa Capilar en ayunas (GCA) | Medición de glucosa capilar con glucómetro | Glucómetro Accu-Chek Performa | 1=Normal 2=Alto | (Espinoza, n.d.) |
| Circunferencia de Cintura (CC1) | Cinta métrica | | 1=Sin riesgo 2=Con riesgo | Apéndice normativo C1 (Secretaria de Salud, 2013) |
| Circunferencia de Cuello (CC2) | Cinta métrica | | 1=Sin riesgo a Síndrome Metabólico 2=Con riesgo a Síndrome Metabólico | (Pereira et al., 2014) |
| Tensión Arterial (TA) | Baumanómetro Brazalette Estetoscopio | | 1-Hipotenso 2-Normotenso 3-Hipertenso | (Gómez et al. 2016) |
| Nivel de Actividad Física (NAF) | Pregunta directa (qué actividad realiza y durante cuánto tiempo) | | 1-Sedentario 2-Leve 3-Moderado 4-Intensa | (Giannini & Vega, 2011) |
| Conocimientos sobre DM (CDM) | Cuestionario con 20 preguntas | Calificación máxima de 100 puntos | 1-Deficiente (menor a 6.9) 2-Satisfactorio (7.0-8.9) 3-Muy bueno (9.0-10) (base 10) | - |
| Ingesta Calórica (IC) | Descripción de alimentos consumidos en un día | Conteo de calorías | Suma de calorías totales | (Perez, Palacios, & Castro, 2000) |
| Percepción SFS | Siluetas | Psicológico | 1=Subestimación 2=Normal 3=Sobreestimación | (Hernández-Prado, Campuzano, Salmerón Pintos, & Osuna Ramírez, 2006) |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio se tuvo la participación de 38 universitarios de LEO repartidos por género en 18.4% (n=7) para hombres y 81.6% (n=31) mujeres. Por IGE se contó con 34 alumnos, 70.6% (n=24) mujeres y 29.4% (n=10) hombres. La edad promedio de los estudiantes fue de 20.82 (\pm 2.2) años.

Se identificó que en Antecedentes Heredo Familiares (AHF) de DM se presenta un 76.3% (n=29) en estudiantes de LEO vs 29.4% (n=10) para IGE. En la tabla 2 se presentan los comparativos LEO vs IGE de las variables revisadas. Se identifica que los valores no presentan diferencia estadísticamente significativa en los grupos, a excepción del consumo de lípidos donde LEO presenta mayor porcentaje en deficiente e IGE mayor en consumo aumentado.

Es de señalarse que en IMC arriba de la tercera parte presenta alguna categoría superior a la normal y arriba de la mitad tiene una subestimación de su imagen corporal. En cuanto a medidas de cuello, arriba de la tercera parte presenta riesgo. Para cintura es mayor a los parámetros normales (Secretaría de Salud, 2013). La mayoría es sedentario. Finalmente, se presenta un consumo de hidratos de carbono en más de la mitad con valores no normales.

Respecto a la subestimación sobre su percepción corporal (test Standard Figural Stimuli), que como se mencionó es alto para ambos grupos, se podría explicar ya que los jóvenes tienden a adquirir ciertos hábitos dietéticos y descuido en el peso; mismo que expone a la población a adquirir mayores riesgos para desarrollar la enfermedad. Lo anterior, manifiesta diversos factores de riesgo que deberán ser atendidos.

Finalmente se evaluó consumo de macronutrientes realizando el cálculo acorde a los requerimientos diarios según la edad por la FAO/OMS/ONU. Se seleccionó a aquellos alumnos en los que había un equilibrio en el consumo de proteínas, lípidos e HC; demostrando que el 26.3% (n=10) de los jóvenes de Enfermería presentan un mejor equilibrio en el consumo de éstos en comparación con el 11.7% (n=4) universitarios del ITESI. Se considera falsa la hipótesis planteada ya que se obtuvo que sólo consumo de lípidos presenta diferencia estadística y en el resto el comportamiento se considera igual.

Tabla. 2. Comparación carreras con los factores de riesgo de DM

| | | LEO | | IGE | | |
|---------------------|----------------|-----|------|-----|------|----------------|
| | | f | % | f | % | c ² |
| IMC | Desnutrición | 1 | 2.6 | 0 | 0 | 1.14 |
| | Normal | 22 | 57.9 | 19 | 55.9 | |
| | Sobrepeso | 6 | 15.8 | 5 | 14.7 | |
| | Obesidad | 9 | 23.7 | 10 | 29.4 | |
| Cintura | Sin riesgo SM | 30 | 78.9 | 29 | 85.3 | 0.48 |
| | Con riesgo SM | 8 | 21.1 | 5 | 14.7 | |
| Cuello | Sin riesgo | 24 | 63.2 | 24 | 70.6 | 0.44 |
| | Con riesgo | 14 | 36.8 | 10 | 29.4 | |
| TA | Hipotenso | 13 | 34.2 | 13 | 38.2 | 0.12 |
| | Normotenso | 25 | 65.8 | 21 | 61.8 | |
| Glucosa | Normal | 36 | 94.7 | 30 | 88.2 | 0.99 |
| | Alto | 2 | 5.3 | 4 | 11.8 | |
| Percepción SFS | Subestimación | 22 | 57.9 | 21 | 61.8 | 0.62 |
| | Normal | 9 | 23.7 | 9 | 26.5 | |
| | Sobrestimación | 7 | 18.4 | 4 | 11.8 | |
| Act. Física | Sedentario | 21 | 55.3 | 25 | 73.5 | |
| | Leve | 5 | 13.2 | 4 | 11.8 | |
| | Moderado | 10 | 26.3 | 5 | 14.7 | |
| | Intenso | 2 | 5.3 | 0 | 0 | |
| Proteína | Deficiente | 0 | 0 | 1 | 2.9 | 3.49 |
| | Normal | 4 | 10.5 | 8 | 22.5 | |
| | Aumentado | 34 | 89.5 | 25 | 73.3 | |
| Lípidos | Deficiente | 22 | 57.9 | 11 | 32.4 | 14.77 |
| | Normal | 15 | 39.5 | 10 | 29.4 | |
| | Aumentado | 1 | 2.6 | 13 | 38.2 | |
| Hidratos de carbono | Deficiente | 8 | 21.1 | 13 | 38.2 | 3.15 |
| | Normal | 11 | 28.9 | 10 | 29.4 | |
| | Aumentado | 19 | 50 | 11 | 32.4 | |
| Conocimientos | Deficiente | 1 | 2.6 | 7 | 29.6 | 7.2 |
| | Satisfactorio | 37 | 97.4 | 26 | 76. | |
| | sobresaliente | 0 | 0 | 1 | | |

Fuente. Directa.

Los resultados descritos presentan importancia significativa ya que exponen variables similares como factores de riesgo para diabetes mellitus que fueron encontradas en otros estudios (Soares et al, 2014).

CONCLUSIONES

Se encuentra que la población del IGE cuenta con mayores factores de riesgo para DM sin manifestar una diferencia estadísticamente significativa; por lo que se consideran tendencias iguales para los grupos. Se identifica que los estudiantes cuentan con un nivel aceptable de conocimientos sobre la enfermedad, malas prácticas nutricionales, vida sedentaria, índices en CCI altos y GCA altos.

En un futuro aumentarán los índices de sobrepeso y obesidad en esta población. Es un dato alarmante, ya que se le suman los demás factores de riesgo. Por lo anterior, se deben tomar medidas e implementar estrategias que permitan proteger al estudiante. Como recomendación, impera la realización de intervenciones educativas en la formación académica de asesoramiento nutricional, Diabetes mellitus y actividades deportivas.

BIBLIOGRAFÍA

Artículos de revista

- De Ferranti, S., Mozaffarian, D., & Sánchez Rodríguez, M. A. (2009). La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. *Volumen Abril-Junio*, 34(2), [pp. 95–108].
- Gómez-Leon Mandujano A; Morales Lopez S; Alvarez Diaz C de J. (2016). Técnica para una correcta toma de la presión arterial en el paciente ambulatorio. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 59(3), [pp. 49–58]. Consultada en <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2016/un163j.pdf>
- Pereira, D. C. R., Araújo, M. F. M. de, Freitas, R. W. J. F. de, Teixeira, C. R. de S., Zanetti, M. L., & Damasceno, M. M. C. (2014). Neck circumference as a potential marker of metabolic syndrome among college students. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 22(6), [pp. 973–979]. Consultada en <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3565.2505>
- Secretaría de Salud. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. *Diario Oficial de La Federación*, 24(1), [pp. 24–79].
- Soares Adman, Moura Marcio, Freire Roberto, Zanetti, M. L., Almeida, P. C. De, & Damasceno, M. M. C. (2014). Risk factors for Type 2 Diabetes Mellitus in college students: association with sociodemographic variables. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 22(3), [pp. 484–490]. Consultada en <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3053.2441>

Artículos en línea

- American Diabetes Association. (2014). Datos sobre la diabetes. Consultada en: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/datos-sobre-la-diabetes/?referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F%3Freferrer?referrer=https://www.facebook.com/> (fecha de consulta 19-07-2017).
- Espinoza, A. (n.d.). TOMA DE MUESTRA DE GLUCOSA CAPILAR. UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN, 5. Consultada en <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2016/un163j.pdf> (fecha de consulta 22-07-2017).
- Hernández-Prado, B., Campuzano, J. C., Salmerón Pintos, J., & Osuna Ramírez, I. (2006). Índice de masa corporal y percepción de la imagen corporal en una población adulta mexicana: la precisión del autorreporte. *Salud Pública de México*, 48(2), pp. 94–103. Consultada en <https://doi.org/10.1590/S0036-36342006000200003> (fecha de consulta 22-07-2017).
- Giannini, F., & Vega, S. A. (2011). *Nutrición y Deporte*, pp. 1–16. Consultada en <file:///C:/Users/SonyVaio/Downloads/Contenidos-Unidad2.pdf> (fecha de consulta 21-06-2017).
- Guías ADA 2016. (2016), pp. 1–3 Consultada en http://cnp.org.pe/wp-content/uploads/2016/12/GU%C3%8DA-ADA-2016_RESUMEN-CLASIFICACI%C3%93N-Y-DIAGN%C3%93STICO-DE-LA-DIABETES.pdf (fecha de consulta 19-07-2017).
- Perez, A. B., Palacios, B., & Castro, A. L. (2000). Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. Consultada en <https://vizcayanutricion.files.wordpress.com/2013/09/sistemamexicanodealimentos equivalentes.pdf> (fecha de consulta 22-07-2017).
- Especiales, C. G. D. P. Y. P. (2011). *Peso Y Estatura*, 1, pp. 1–8. Consultada en http://www.cdi.gob.mx/albergues/medicion_peso_talla.pdf (fecha de consulta 21-07-2017).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la maestra Elvira Acosta por haber sembrado la inquietud en mí para participar en este verano, a los coordinadores del verano de la región centro por permitirme ser parte del 19º Verano de la Ciencia.

A la doctora Ma. Eugenia Barreto Arias, por aceptarme en la colaboración del proyecto, gracias por su guía ayuda y sobre todo paciencia; de igual manera, por transmitirme sus conocimientos hacia mi persona, cada uno serán muy útiles a lo largo de mi trayecto estudiantil y profesional. Quiero agradecer al profesor Juan Carlos por su gran enseñanza durante este verano; gracias a ambos por preocuparse por nosotros y sobre todo por demostrar su gran calidad de personas.

A mis compañeros de verano Everardo y Antonio por haber compartido este tiempo conmigo, formar nuevas experiencias y hacer de estos días algo muy ameno.

A mi familia por apoyarme en este verano, comprenderme y más que nada entender mis ausencias, ellos saben que esto que realicé es benéfico para mi persona y en un futuro también para ellos.

CORRELACION DE LA INGESTA DE VITAMINA D Y CALCIO CON INDICE DE MASA CORPORAL EN PERSONAS CON Y SIN ANTECEDENTES DE DIABETES TIPO 2.

Reyna Guadalupe Escamilla Hernández¹ y Dr. Nicolás Padilla Raygoza², Dra. Silvia del Carmen Delgado Sandoval³

RESUMEN

Ingesta de vitamina D y calcio, mantiene índice de masa corporal bajo. El objetivo fue relacionar la ingesta de vitamina D y calcio con Índice de Masa Corporal en personas con familiares con diabetes mellitus tipo 2. Estudio transversal, observacional, analítico. La ingesta de vitamina D y calcio se obtuvo por el análisis de la encuesta SNUT y el Índice de Masas Corporal con antropometría. La correlación de la ingesta de vitamina D y calcio con el Índice de Masa Corporal fue leve ($r < 0.14$) y no hubo relación lineal significativa ($p > .05$). Se concluye: en la muestra, no existe correlación entre consumo de vitamina D y calcio con Índice de Masa Corporal, debido a tamaño de muestra insuficiente.

ABSTRACT

Intake of vitamin D and calcium, keeps body mass index low. The objective was related to the intake of vitamin D and calcium with the Body Mass Index in people with relatives with type 2 diabetes mellitus. Transversal, observational, analytical study. Intake of vitamin D and calcium was obtained by the analysis of the SNUT survey and the Body Mass Index with anthropometry. The correlation between intake of vitamin D and calcium with the body mass index was slight ($r < 0.14$) and there was no significant linear relationship ($p > .05$). There is no correlation between consumption of vitamin D and calcium with Body Mass Index, due to an insufficient sample size.

Palabras Clave: *Índice de masa corporal; Obesidad; Sobrepeso; Vitamina D; Calcio; Diabetes Mellitus tipo 2.*

INTRODUCCIÓN

La investigación en nutrición ha promovido un abordaje basado en el análisis de nutrientes; sin embargo, más recientemente el análisis de patrones dietarios ha sido ampliamente utilizado para evaluar el apego de la población a las recomendaciones dietéticas. (Autier, Boniol, Pizot, Mullie, 2014)

Una mayor atención a la definición de los patrones dietéticos de diferentes poblaciones es crítica para proporcionar resultados significativos. Sin embargo, la investigación de patrones dietéticos tiene un gran potencial para su uso en la política de nutrición, en particular, ya que demuestra la importancia de la dieta total en la promoción de la salud. (Ross, Taylor, Yaktine, 2010)

La prevalencia de obesidad en la adolescencia está experimentando un gran aumento en los últimos tiempos, llegándose a considerar según la OMS como la epidemia del siglo XXI. Las consecuencias más graves de la obesidad en el adolescente aparecen en la edad adulta debido a la grave comorbilidad asociada (diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer, etc.)(2009)

El sobrepeso y la obesidad se asocian con un aumento de la morbimortalidad. Este incremento está claramente relacionado con el grado de obesidad. En estos sujetos se detecta un aumento del riesgo de sufrir distintas enfermedades, tales como alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, hipertensión arterial, enfermedad coronaria, insuficiencia venosa, síndrome de ovario poliquístico, artrosis, síndrome de apnea del sueño, litiasis biliar, esteatosis hepática, hipertensión endocraneal benigna, aumento de la prevalencia de diferentes tipos de cánceres, etc. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado el interés por la vitamina D debido a que múltiples estudios muestran déficit de vitamina D en la población general y también en las personas con obesidad mórbida (OM).(2009)

La vitamina D y el calcio son dos nutrientes importantes relacionados principalmente a la salud ósea, y también con una variedad de otras enfermedades y condiciones de salud; la obesidad y sobrepeso son un problema de salud, teniendo en cuenta que son los principales factores de riesgo para desarrollar diferentes enfermedades crónicas degenerativas, entre ellas la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la cual es la principal causa de morbimortalidad en el país durante los últimos 17 años. (Jan, 2014)

Las bajas concentraciones séricas de vitamina D, se han asociado con muchos trastornos no esqueléticos. Sin embargo, se desconoce si es baja la Vitamina D la causa o el resultado de la mala salud. (Jan, 2014)

El calcio como nutriente se asocia más comúnmente con la formación y el metabolismo del hueso. Más del 99 por ciento del calcio total del cuerpo se encuentra en los huesos y los dientes, donde proporciona el tejido

duro con su fuerza. El calcio en el sistema circulatorio, el líquido extracelular, el músculo y otros tejidos es crítico para mediar la contracción vascular y la vasodilatación, la función muscular, la transmisión nerviosa, la señalización intracelular y la secreción hormonal. El tejido óseo sirve como reservorio y fuente de calcio para estas necesidades metabólicas críticas a través del proceso de remodelación ósea. (Washington, 2011)

Durante los estados de deficiencia de vitamina D, el metabolismo óseo se ve afectado significativamente como resultado de la reducción de la absorción de calcio activo. Esto conduce a una secreción aumentada de PTH, ya que el receptor de detección de calcio en la glándula paratiroidea detecta cambios en el calcio iónico circulante. A su vez, el calcitriol estimula la absorción de calcio mejorada desde el intestino. No es sorprendente que la interacción entre la dinámica del calcio y la vitamina D a menudo complique la interpretación de los datos relativos a los requerimientos de calcio, los estados de deficiencia y el consumo excesivo. (2010)

La evidencia científica indica que el calcio y la vitamina D tienen funciones clave en la salud ósea. La evidencia actual, sin embargo, no apoya otros beneficios del consumo de vitamina D o de calcio. No se ha demostrado que las concentraciones mayores confieran mayores beneficios; de hecho, éstas se han relacionado con otros problemas de salud, como sobrepeso u obesidad, que es lo que ha incrementado por consumo excesivo de calcio y gran almacenamiento de cálculos biliares; lo que desafía el concepto de que “más es mejor”. (Revista del climaterio, 2011)

Relacionar el índice de masa corporal, con el consumo de vitamina D y calcio en pacientes con antecedentes hereditarios de diabetes mellitus tipo 2.

INTRODUCCIÓN

DISEÑO DE ESTUDIO: transversal y analítico.

Sitio del estudio: estudiantes de universidad pública de Celaya.

Universo: había 1910 estudiantes registrados en la Universidad Pública de Celaya, Gto.

Criterios de inclusión: hombres y mujeres de 18 o más años, registrados como estudiantes en una Universidad Pública de Celaya, Gto; que acepten participar por escrito, firmando el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: hombres y mujeres que no aceptaron participar.

Muestreo: se invitara a participar a todos los estudiantes de una Universidad Pública de Celaya.

Procedimiento al ingreso del estudio: a los sujetos participantes se les explicara los objetivos del estudio, así como las ventajas y desventajas por participar. Se le solicitará firmar el consentimiento informado. Después de hacerlo, se procederá a aplicar la encuesta de identificación determinado si tiene familiares de primer grado (padres o hermanos con diabetes), la encuesta SNUT y se realizara antropometría con peso y estatura. Variables. Sociodemográficas. Edad, género, estado civil, familiares con diabetes tipo 2, peso, estatura, IMC. Independientes. Promedio de ingesta diaria de calcio: para las personas que tienen entre 19 y 50 años de edad, la dosis recomendada es de 1000 mg al día, el consumo de alimentos con calcio, sin embargo, es importante en todas las edades, porque el mineral entra y sale del hueso en diferente proporción según la edad y peso.

Promedio de ingesta diaria de vitamina D: las cantidades promedio diarias de vitamina D, expresadas en unidades internacionales (IU), que recomienda el Comité de Nutrición y de Alimentos que necesita una persona es de 600 IU.

Dependiente. Índice de Masa Corporal. Es un sencillo índice sobre la relación entre el peso y la altura, generalmente utilizado para clasificar el peso insuficiente, el peso excesivo y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso en kilogramos por el cuadrado de la altura en metros (kg/m^2).

Tamaño de muestra.

Asumiendo una r de Pearson de 0.7 entre la ingesta de calcio e IMC, el tamaño mínimo de muestra fue de 12 con 95% de precisión y 90% de poder (Epidat 4.1, 2014, Xunta de Galicia, OPS, Universidad CES).

Análisis estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva para las variables sociodemográficas. Para demostrar correlación y regresión lineal, se calculó el índice de correlación, r de Pearson y ecuación de regresión lineal; para demostrar relación lineal, se calculó t de Student y valor de p . Para demostrar significancia estadística de los resultados el valor de p , se fijó en .05

El análisis estadístico se realizó en STATA 13.0® (STATA Corp., College Station, TX, EUA)

RESULTADOS

En ambos grupos predominaron las mujeres de zona urbana y siendo solteras.

Tabla 1 Distribución de variables sociodemográficas categóricas por grupo de antecedentes familiares y sin ellos de diabetes tipo 2.

| | Antecedentes familiares de diabetes tipo 2 | | | | χ^2 | gl | Valor de P |
|--------------------|--|-------|----------------|-------|----------|----|------------|
| | Sí (n= 104) | | No (n= 163) | | | | |
| | f | % | f | % | | | |
| Genero | | | | | 0.02 | 1 | .89 |
| Hombre | 26 | 25.00 | 42 | 25.77 | | | |
| Mujer | 78 | 75.00 | 121 | 74.23 | | | |
| Residencia | | | | | 2.08 | 2 | .35 |
| Urbana | 75 | 72.12 | 130 | 79.75 | | | |
| Suburbana | 21 | 20.19 | 24 | 14.72 | | | |
| Rural | 8 | 7.69 | 9 | 0.552 | | | |
| Edo. Civil. | | | | | | | |
| Soltero | 98 | 94.23 | 154 | 94.48 | 0.09* | | .9 |
| Casado | 4 | 3.85 | 6 | 3.68 | -0.07* | | .9 |
| Separado | 0 | 0.0 | 1 | 0.61 | 0.8* | | .4 |
| Víudo | 2 | 1.92 | 2 | 1.23 | -0.45* | | .7 |

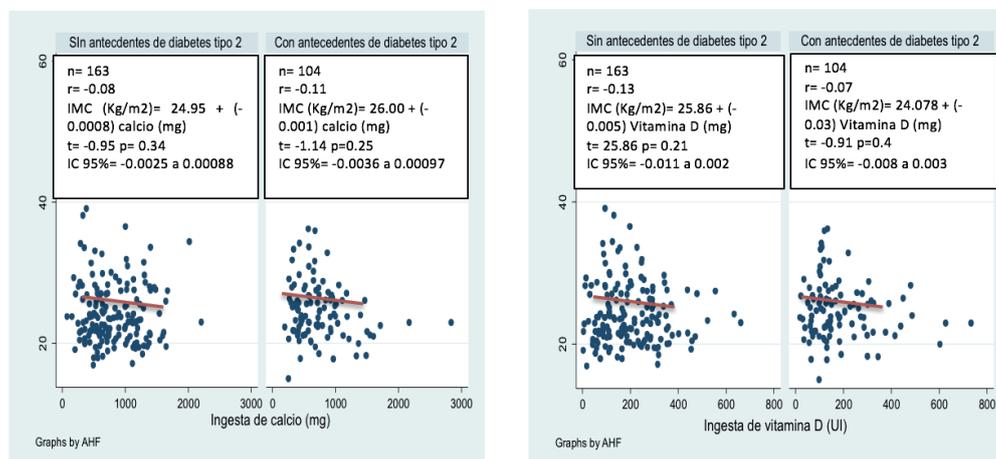
*Z para dos proporciones independientes.

El promedio de edad fue de 21 años para ambos grupos.

Tabla 2 Distribución de edad por grupo de antecedentes familiares o sin ellos de diabetes tipo 2

| | Antecedentes heredofamiliares n=104 | Sin antecedentes heredofamiliares n=163 |
|---------------------|-------------------------------------|---|
| Edad (años) | | |
| Rango | 17 a 49 | 17 a 40 |
| Media | 21.14 | 21.35 |
| Desviación estándar | 2.47 | 3.42 |
| | t= - 0.55 gl 265 | p = 0.58 |

Gráfico 1 Correlación y regresión lineal entre ingesta de calcio y vitamina D con Índice de Masa Corporal/



CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados no existe correlación ni secuencia lineal en el gráfico posiblemente por el tamaño de muestra no adecuado.

Ya que de acuerdo a la ingesta de vitamina D y calcio se representa más en mujeres jóvenes porque son las que más patrones de salud siguen y toman en cuenta para tener un índice de masa corporal bajo.

BIBLIOGRAFÍA

Libros

Autier, P., Boniol, M., Pizot, C., & Mullie, P. (2014). Vitamin D status and ill health: A systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2:76-89.

Artículos de libros

Southon, S., Wright, A.J.A., Finglas, P.M., Bailey, A.H., Loughridge, J.M., & Walker, A.D. (2009). Dietary intake and micronutrient status of adolescents: effect of vitamin and trace element supplementation on indices of status and performance of verbal and nonverbal intelligence. *Br J Nutr*, 2009, 111:987-997

Stafford, R.S., Drieling, R.L. & Hersh, A.L. (2010). Nutritional trends in osteoporosis visits and osteoporosis treatment, 1988-2003. *Intern Med* 2010, 159:1525-30

Artículos de revista

Carrera, P.M., Gao, X., Tucker, K.L. (2010). A study of dietary patterns in the Mexican-American population and their association with obesity. *Diet. Assoc.* 107(10): 1735-1742.

Sturdee, D.W. & Pines, A. (2011). Actualización de las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Menopausia en relación con la terapia hormonal en la posmenopausia y estrategias preventivas para la salud en la mediana edad. *Revista del climaterio, México*, 2011., Sep- Oct, pág 205-228.

Ross, A.C., Taylor, C.L., Yaktine, A.L. & Del Valle, H.B. (eds) (2011). *Reference Intakes for Vitamin D and Calcium*; Washington (DC): National Academies Press ; 2011.

Artículos en línea

Youl, P.H., Janda, M. & Kimlin, M. (2009). Vitamin D and sun protection: the impact of mixed public health messages in Australia. *J Cancer*. 124(8):1963-70.

DISRUPTORES ENDOCRINOS

Pedro Israel Silva Martínez y Antonio de León Rodríguez
Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Ciencias Químicas. Carretera
Zacatecas-Guadalajara Km. 6, ejido "La Escondida", Ciudad Universitaria Campus Siglo
XXI. C.P. 98160, Zacatecas, Zac. pismtam@hotmail.com

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Departamento de Biología
Molecular. Camino a la Presa de San José #2055. Lomas 4ta Sección. CP: 78230. San Luis
Potosí, S.L.P. aleonr@ipicyt.edu.mx

RESUMEN

Este trabajo habla un poco de la influencia que pueden tener las moléculas químicas de interés (ftalatos) con relación a diferentes síndromes metabólicos que tengan que ver con el funcionamiento de controladores del organismo conocidos como sirtuinas. Se desarrolló mediante protocolos ya establecidos, se busca conocer si estos afectan o no a la producción que se consideraría normal de estas sirtuinas, lo cual indicaría o no la posible aparición de enfermedades, tales como diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, etc. Es importante tener en cuenta, que ya se tienen indicios y resultados aprobatorios de que los ftalatos están relacionados con afecciones a nivel gonadal, cómo, infertilidad y disminución de apetito sexual, en los cuales, se ven relacionadas las sirtuinas y esto nos da un indicativo de que pueden afectar también a la presencia de enfermedades metabólicas.

ABSTRACT

This paper talks a little about the influence that chemical molecules of interest (phthalates) can have on the relation of the different syndromes that have to do with the functioning of the controllers of the organism known as Sirtuins. It was developed through protocols and establishments, it is sought to know if these affect or not the production that are considered normal of these sirtuins, which is not indicated in the possible occurrence of diseases, such as diabetes, obesity, CVD, etc. Take into account that you already have indications and approval results that children are related to gonadal conditions, such as infertility and decreased sexual appetite, in which the sirtuins are related and there is no indication that they also affect to the presence of metabolic diseases.

PALABRAS CLAVE: célula, disruptor, metabolismo, enfermedad, ftalatos y endocrino.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, ha habido un cambio dramático y rápido deterioro de debido principalmente al surgimiento de una epidemia de obesidad y diabetes. Con un alarmante costo anual de salud relacionado con la obesidad.

Las causas principales son más frecuentes factores genéticos y de comportamiento, como la dieta y la inactividad. Algunos químicos ambientales, tales como ftalatos plastificantes, son factores de riesgo poco estudiados en comparación con la dieta y el estilo de vida en el desarrollo de la diabetes y obesidad. Además, los mecanismos epigenéticos están poco asociados con el ambiente y están poco estudiados. La interacción entre los genes y el medio ambiente ha surgido como una nueva frontera para el descubrimiento de procesos cómo la modificación de genes que pueden producir patologías. ¹

Un grupo emergente de reguladores epigenéticos son las sirtuinas, que actúan como sensores celulares para detectar la disponibilidad de energía y modular algunos procesos metabólicos. Hay siete tipos de sirtuinas, Sirt1 y Sirt3 que han sido los más ampliamente investigados. Sirt4, 5 y 7 también han demostrado tener importancia funcional en la regulación fisiológica. Estudios previos han demostraron que el ratón alimentado con una dieta alta en grasas mostró una disminución de la expresión y actividad de Sirt3 y desarrollaron rasgos clínicos que imitan de cerca al ser humano cómo el síndrome metabólico, incluyendo obesidad, DT2, resistencia a la insulina, anomalías lipídicas y esteatohepatitis.

En los humanos, la Sirt3 está asociada con la esperanza de vida y con toda la energía metabólica.

Los ftalatos son un grupo de disruptores endocrinos que han tenido una especial atención por la posibilidad de desarrollar efectos adversos en los humanos. En la actualidad, se relacionan con la hipótesis del obesogen, el cual propone que algunos compuestos químicos pueden desarrollar desbalances metabólicos, y provocar incremento para desarrollar obesidad, DM2, enfermedades cardiovasculares.

En especial, se ha demostrado que hay presencia de ftalatos en orina de personas con estas enfermedades, por lo cual, se ha propuesto estudiar los efectos específicos de los diversos ftalatos para el desarrollo de dichas enfermedades.

Uno de los plastificantes conocidos, el Butilbencilftalato (BBP), se utiliza principalmente para mejorar la Industrial y se encuentra principalmente en papeles utilizados como materiales de embalaje para productos acuosos, grasos y alimentos secos. El uso omnipresente de los plastificantes en múltiples productos y habrá

una exposición extensa a los seres humanos, se ha convertido en parte inevitable de la vida moderna. La mayoría de los estudios se han centrado en células o animales de laboratorio, tales como muerte celular, diferenciación sexual, defectos reproductivos y estrés. 2

En el trabajo de investigación se trabaja con células obtenidas de ratón (RAW) las cuales provienen de linfomas. No se trabajó en este caso con células humanas. 2

METODOLOGÍA.

1.- Cultivo celular y tratamiento con ftalatos.

Las células RAW fueron obtenidas del tratamiento de ratones “knock out” tratadas con una especie de linfoma para producir un gran número de estas células. Las células fueron cultivadas en medio DMEM con suero bovino al 10%, 100U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Fueron conservadas en una atmósfera de 5% CO₂. En el cultivo con los diferentes ftalatos, fueron distintas concentraciones (0.1 microgramo a 100 microgramos/mL). 2

2.- Ensayo MTT

Las células RAW (1*10⁴ células por pocillo) se depositaron en 96 pocillos de las placas de cultivo y se incubaron con diferentes concentraciones de DINP Y DEHP durante 48 h. Las células se incubaron en oscuridad con MTT (10 ml por pocillo, solución madre 5 mg / ml de PBS) durante 4 h a 37 °C. El medio se retiró y los cristales de formazano se disolvieron en 100 ml de DMSO con agitación durante 30 s. Las densidades ópticas de las soluciones resultantes se determinaron

Colorimétricamente a 540 nm utilizando un lector de microplacas. Se compararon las densidades ópticas de las células Incubado con las concentraciones variables de ftalatos y DMSO. 2

3.- Extracción de RNA de las células

A la muestra se le agrega 1 mL de Trizol por cada 100 mg de tejido y se deja incubar 5 minutos. Se transfiere a un tubo nuevo. Se separa agregando 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Se pasa al Vortex 15 segundos y se incuba 3 minutos. Se centrifuga a 12 000 g por 15 minutos de 2-8°C. El RNA se encuentra en la fase acuosa (superior) y se transfiere esta fase. Se precipita el RNA agregando 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Triazol. Se incuban 10 minutos de 15-30 grados y se centrifuga 12 000 g por 10 minutos de 2-4°C. Para lavar el RNA se quita el sobrenadante, se agrega etanol al 75 (1 ml por cada ml de Triazol utilizado). Se mezcla en el vortex por 15 segundos. Se centrifuga a 7500 g por 5 minutos, de 2-8°C y se repite este paso una vez más. Se deja reposar unos minutos para que se evapore el alcohol. Para análisis siguientes se debe resuspender el RNA con agua miliq. 3

4. Medición RNA en el NanoDrop.

En este aparato se mide la cantidad de material genético, así, como su nivel de pureza. El equipo es un espectrofotómetro capaz de determinar concentraciones de ácidos nucleicos, DNA y RNA. Estos resultados nos ayudan para conocer que tan bien fue hecha la extracción del material genético y si hay una contaminación de alguno de los reactivos. La pureza se obtiene con una relación de absorbancias a 260 y 280nm. La cual en el caso del RNA debe ser cercano a 2 para que se considere como apto este RNA. 4

5.- Preparación del cDNA

El cDNA es una hebra de DNA de doble cadena, una de las cuales se constituye de una secuencia complementaria a un mRNA a partir del cual es sintetizado. Por medio del RNA obtenido en las mediciones del NanoDrop y una ecuación predeterminada, se prepara una solución para obtener el cDNA (se divide el RNA obtenido entre 600 µL, el cual da un volumen determinado y este volumen se le resta 13.2, que es una medida estandarizada para conocer los volúmenes de RNA re suspendido y de agua que se tienen que agregar para que la solución quede a la concentración deseada). Después de ya tener esta solución con el RNA deseado, se pasa la muestra al termociclador, donde se pone a una temperatura inicial de 105°C. Se pasa a 25°C por 10 minutos, luego a 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos y a 4°C por siempre. Este proceso para una muestra de 20 µL.5

6. -Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se agregan 1.5 µL de DNA, 0.2 µL de Taq Polimerasa, 5 µL de Buffer de la polimerasa, 0.4 µL de DNTP, 2 µL de Primer Forward y 2 µL de Primer Reverse, el resto es con agua miliq, para dar un volumen aproximado de 48,5 µL por muestra. Se colocan las diferentes muestras a diferentes rangos de temperaturas (60°-70°C). Se corre el PCR (2 horas aproximadamente). 3

7.- Electroforesis.

Se monta el equipo como se ha indicado y se prepara el gel de 10-15%. A cada pocillo se le agregan 6 µL de la muestra y 1 µL de buffer de montaje. Se agrega un marcador 1 Kb CON 1 µL de buffer de carga. Se llena la cámara hasta la marca con el buffer 1x indicado y se corre la electroforesis a 90V por 1 hora, aproximadamente. Se debe observar la separación de las muestras, manchas verdes y azules, las cuales dan a notar la separación de las bases por las propiedades de tinción de las bases y la separación de las mismas. Se compara el tamaño del material de muestra según la referencia del marcador utilizado. 6

8.- Resultados.

8.1.- Preparación de la muestra para PCR

Con la cantidad de RNA obtenido de cada muestra se debe preparar (como se indica en la metodología).

Tabla. 1. Preparación de las muestras para correr e PCR

| Sample | Conc.(ng/ul) | Vol/ng(ul) | Water(ul) |
|--------------------|--------------|------------|-----------|
| 0.1 ug DEHP EtOH 2 | 77.11 | 7.78 | 5.42 |
| 10 ug DINP DMSO 1 | 61.74 | 8.10 | 5.10 |
| 100 ug DINP DMSO 1 | 304.19 | 1.64 | 11.56 |
| 0.1 ug DINP DMSO 1 | 72.46 | 6.90 | 6.30 |
| 0.1 ug DINP DMSO 2 | 111.3 | 4.49 | 8.71 |
| 0.1 ug DINP EtOH 3 | 71.97 | 6.95 | 6.25 |
| 10 ug DINP EtOH 2 | 112.47 | 4.45 | 8.75 |
| 0.1ug DEHP EtOH 1 | 47.06 | 10.62 | 2.58 |
| 10 ug DINP EtOH 3 | 101.96 | 4.90 | 8.30 |
| 100 ug DEHP DMSO 2 | 286.05 | 1.75 | 11.45 |
| 100 ug DEHP EtOH 1 | 67.96 | 7.36 | 5.84 |
| 100 ug DINP EtOH 3 | 43.61 | 11.47 | 1.73 |
| 0.1 ug DINP EtOH 1 | 118.19 | 4.23 | 8.97 |
| 10 ug DINP EtOH 1 | 156.94 | 3.19 | 10.01 |
| 0.1ug DINP EtOH 2 | 44.36 | 11.22 | 1.98 |
| 100 ug DEHP DMSO 1 | 40.16 | 12.45 | 0.75 |
| DMSO 1 | 58.73 | 8.51 | 4.69 |
| EtOH 1 | 137.93 | 3.63 | 9.57 |
| 100ug DINP EtOH 2 | 171.6 | 2.91 | 10.29 |

8.2.- Electroforesis

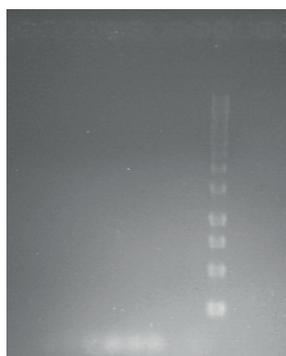


Figura 1. Electroforesis de las muestras. Sólo en cuatro muestras se encontró resultado comparativo con el marcador de referencia.

8.3.- Ensayo MTT.

Las diferentes células se cultivaron a diferentes concentraciones, se especifica en cada gráfico el tipo de ftalato al que fueron expuestas las células, condiciones de químicos, cómo DMSO, etanol, DINP, DEHP y medio de cultivo.

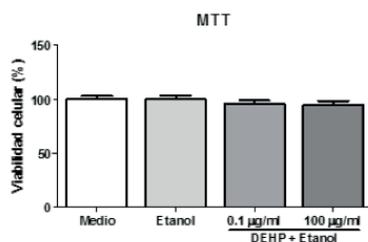


Figura 2. Gráfico de células cultivadas con DEHP y Etanol. Ambas concentraciones tuvieron resultados similares, aunque hay una diferencia importante entre las mismas concentraciones.

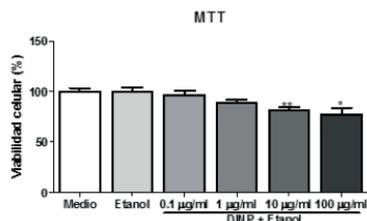


Figura 2. Gráfico de células cultivadas con DINP y Etanol. En este comparativo si hay diferencias importante, a menor concentración de los disruptores, mayor viabilidad de la célula.

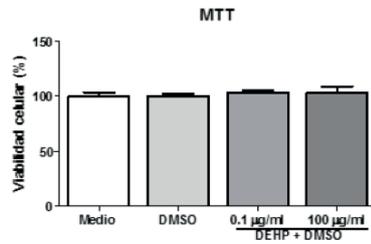


Figura 3. Gráfico de células cultivadas con DEHP y DMSO. En este cultivo, la viabilidad es mayor a mayor concentración de DMSO.

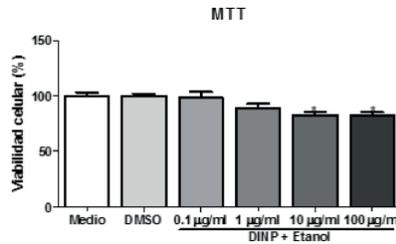


Figura 4. Gráfico de células cultivadas con DINP y Etanol. En estos resultados, a mayor concentración del ftalato y del alcohol, la viabilidad disminuye importantemente.

9.- Discusión.

Con base a los resultados obtenidos en este proceso, podemos decir que en realidad si hay una variación importante en la producción de RNA de las diferentes células cultivadas a diferentes condiciones, lo que da un indicio de que en realidad la interacción con químicos como en este caso los ftalatos, pueden perjudicar a la fisiología normal del ser humano. Primeramente, al extraer las diferentes muestras de células, se observó que algunas no cumplían con lo estipulado en la teoría de la relación de las absorbancias a 260/280, superaban el valor cercano a 2 que es lo recomendable y el valor obtenido de RNA era poco y estaba contaminado, ya sea por la naturaleza de la muestra o los reactivos utilizados en su obtención. Por lo que sólo se realizó el proceso de cDNA al RNA que nosotros consideramos mejor y que cumplía con los estatutos de calidad.

También, al realizar la electroforesis de las distintas muestras, pudimos notar que en realidad sólo cuatro muestras fueron observadas en el gel, sólo esas muestras pudieron ser comparativas con el marcador de 1Kb que se utilizó en la técnica. Esto nos indica que en realidad el RNA obtenido no es de tan buena calidad, debido ya sea al mismo proceso de extracción, al proceso de cultivo o a errores técnicos del analista. Se recomienda, en este caso, realizar todos los procesos de nuevo, buscar cual pudo haber sido el error y corregirlo. Al final, se hizo el ensayo de viabilidad y se obtuvo que si hay una variación importante de las distintas concentraciones, ftalatos utilizados, alcohol, DMSO y medio. Se demostró que los dos ftalatos afectan a las células, aunque en diferente medida. Se demuestra que a estas condiciones, el DINP tiende a disminuir a mayor concentración del ftalato la viabilidad de las células y aunque en ambos ftalatos se observa esta propiedad, en el DINP es más notorio. Es importante recalcar, que en la literatura revisada y analizada, se hacen procesos más completos y complejos para comprobar, tanto la presencia del ftalato, como las propiedades de viabilidad de las diferentes muestras obtenidas. Para hacer un estudio más completo y que tenga una mayor relevancia, se deben revisar aspectos como, la energía de Gibbs, hacer un modelo in silico de los resultados, un estudio estadístico comparativo y hacer muchas pruebas, para demostrar que en realidad si hay un indicio importante para considerar que en realidad los ftalatos funcionan como disruptores de las sirtuinas, lo cual demostraría que estas moléculas son de importancia clínica y social y con ello, tratar de hacer una conscientización en la gente y en la industria para la disminución de la utilización de estos químicos en la producción en general.

10.- Conclusiones.

Es necesario conocer y entender los diferentes mecanismos para el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes, obesidad, afecciones cardíacas, etc. Ya que la evidencia de que químicos como los ftalatos tienen importancia en el desarrollo de estas enfermedades, es preocupante. Las pruebas de influencia ambiental han aumentado, aun no se conoce a ciencia cierta todos estos mecanismos, saber en realidad cuales son los factores de mayor importancia para que se den estas enfermedades. Se busca con este estudio aportar un conocimiento importante sobre estos estresores ambientales, ya que se demuestra (aunque falta desarrollarse aun más) que los ftalatos pueden interrumpir selectivamente diferentes sirtuinas de interés, lo cual, como la literatura lo dice, puede afectar en gran medida para provocar enfermedades metabólicas. Falta hacerse más estudios y comprobar estas teorías, pero se va por muy buen camino.

REFERENCIAS.

- 1.Lan F, Waikel A, Caicedo J, Ido Y. Resveratrol-Induced AMP-Activated Protein Kinase Activation Is Cell-Type Dependent: Lessons from Basic Research for Clinical Application. *Nutrients*. 751(2017): 5-14.
- 2.Zhang J, Ali H, Bedi Y, Choudhury M. 2015. The plasticizer BBP selectively inhibits epigenetic regulator sirtuins. *ELSEVIER*. 338 (2015):130–141.
- 3.Anand A, Heller G, Wan M, Herkal A, Petel C, Khanin R, Schultz N, Fleisher M. Prostate-specific mRNA detection in whole blood as an analytically validated prognostic biomarker for patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Jornual Clinical Oncology*. 45 (2013): 20-31.
- 4.Cai Y, Gup H, Li Z, Wang W, Zhang Y. MicroRNA differential expression profile in tuberous sclerosis complex cell line TSC2-/- MEFs and normal cell line TSC2+/+ MEFs. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 49 (2017): 580-584.
- 5.Capping G, Spiga M, Moncada Y, Ferrati A, Beyeler M, Bianchessi m, Decosterd L, Buclin Y, Guiducci C. Label-free detection of tobramycin in serum by transmission-localized surface plasmon resonance. *Analisis Chemistry*. 87 (2015): 78-85.
- 6.Sarg B, Faserl K, Lindner H. Identification of Novel Site-Specific Alterations in the Modification Level of Myelin Basic Protein Isolated from Mouse Brain at Different Ages Using Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry. 17(2017): 15-22.
- 7.Ding R, Bao J, Deng C. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. *International Jornual Biology*. 13(2017): 852-867.

EFFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO FRENTE A LA EXPOSICIÓN DE ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO SOBRE CÉLULAS NEURALES TRONCALES HUMANAS (Co-tratamiento)

Gutiérrez Colunga, M1. y Castillo Martín del Campo, C. G2.

1Licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma de Zacatecas. Jardín Juárez #147 Centro Histórico, C.P. 98000, Zacatecas, México. 32130742@uaz.edu.mx. 2CIACYT. Facultad De Medicina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2a. Sección, Cp 78210 Claudia.castillo@uaslp.mx

RESUMEN

La enfermedad de Huntington es un padecimiento neurológico del cuál hasta la fecha se desconoce su cura. Actualmente el tratamiento de esta enfermedad va encaminado solamente a aminorar los principales síntomas que son las alteraciones psicomotoras y a ayudar al paciente a tener una mejor calidad de vida. En el presente trabajo se realizó un co-tratamiento utilizando ácido linoleico conjugado (CLA) en células neurales que habían sido inducidas con ácido 3 nitropropiónico (3-NP), el cual se ha demostrado tiene efectos similares al de la neurotoxicidad presente en la enfermedad de Huntington, esto con la finalidad de generar un conocimiento más amplio de los efectos del CLA y su posible uso como tratamiento en esta enfermedad. Los resultados reflejaron que los tratamientos de CLA solo mostraron un efecto positivo utilizando 3NP al 2.5, lo que sugiere que para posibles investigaciones a futuro se debe de hacer un mayor énfasis utilizando esta concentración.

ABSTRACT

Huntington's disease is a neurological condition which cure is unknown. Currently the treatment of this disease is aimed only at reducing the main symptoms of psychomotor disorders and helping the patient to have a better quality of life. In the present work a co-treatment was performed using conjugated linoleic acid (CLA) in neural cells that had been induced with 3-nitropropionic acid (3-NP), which has been shown to have effects similar to that of the neurotoxicity present in the disease of Huntington, in order to generate a broader understanding of the effects of CLA and its possible use as a treatment in this disease. The results showed that CLA treatments only showed a positive effect using 3NP at 2.5, suggesting that for future research, greater emphasis should be placed on this concentration.

Palabras clave: Enfermedad de Huntington, ácido linoleico conjugado, células neurales

INTRODUCCIÓN

La corea hereditaria o enfermedad de Huntington (EH) es un proceso neurodegenerativo autosómico dominante que afecta al núcleo estriado (núcleos caudado y putamen) dando lugar a discinesias, corea, alteraciones psicomotoras, demencia, entre otros. La hipótesis de que las disfunciones mitocondriales contribuyen a la patogénesis de EH se probó por primera vez farmacológicamente mediante el uso de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa que ha logrado mimetizar la neurotoxicidad exhibida en la EH en modelos celulares y animales con la finalidad de estudiar mecanismos moleculares patogénicos de la enfermedad, así como nuevas dianas terapéuticas.

Los mecanismos que siguen a la administración de 3-NP es el desarrollo de disfunciones mitocondriales implican el deterioro bioenergético, estrés oxidativo-nitrativo, agotamiento de los sistemas antioxidantes, excitotoxicidad y muerte neuronal. Los aumentos citosólicos de calcio (Ca^{2+}), inducidos por el 3-NP, y la consiguiente activación de óxido nítrico sintasa (NOS) con la producción de óxido nítrico (NO) desempeña el papel principal de EN. Así mismo, la entrada del calcio extracelular por apertura de los canales de membrana dependiente de voltaje y receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) promueve muerte neuronal por excitotoxicidad glutamatergica. No obstante, recientemente se ha evidenciado que la presencia de astrocitos reduce significativamente la vulnerabilidad neuronal al 3-NP.

En la actualidad, no hay tratamientos eficaces contra la EH. Las terapias se centran en los síntomas neurológicos y psiquiátricos que apuntan a mejorar la calidad de vida. El ácido linoleico conjugado (CLA), una mezcla isomérica de ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono con enlaces dobles conjugados derivados del ácido linoleico, ha demostrado proteger a cultivos neuronales embrionarios de ratón de la excitotoxicidad glutamato, mediante el incremento de Bcl-2 neuronal y la disipación del potencial de la membrana mitocondrial inducida por glutamato, sugiriendo una influencia estabilizadora en la función mitocondrial. No obstante, el papel del CLA no ha sido estudiado en modelos de enfermedad de Huntington.

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del CLA sobre la toxicidad inducida por 3-NP en células neurales troncales humanas diferenciadas durante siete días (cultivos mixtos de neuronas y astrocitos) con la finalidad de propiciar un conocimiento más amplio de su posible efecto protector.

MARCO TEÓRICO

El ácido linoleico, es un ácido graso esencial omega-6 muy abundante en el reino vegetal y también animal. La gran mayoría de los aceites vegetales (con algunas excepciones como el aceite de oliva, el de palma, o el aceite de coco) aportan cantidades significativas de ácido linoleico. En la grasa animal también se le encuentra, junto con los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Con la incorporación de una mejor tecnología para el análisis y la identificación de los ácidos grasos componentes de grasas, aceites o de muestras de tejidos (aplicación de cromatografía gaseosa capilar, HPLC de alta resolución, y espectrometría de masas), fue posible identificar que en toda muestra de aceite o de grasa, particularmente en aquellas de origen animal, siempre está presente una pequeña cantidad de ALC. Este ácido graso se presenta con diferente isomería (7c-9t, 9c-11t, 11c-13t, principalmente), aunque siempre predomina la estructura 9c-11t. Si bien el ALC se encuentra en pequeñas proporciones en los aceites vegetales, su concentración es particularmente alta en la carne y en la leche de los rumiantes, donde puede alcanzar hasta un 0,65% de los lípidos totales.

Efectos nutricionales y en la salud derivados de CLA.

Efectos hipocolesterolémicos.

En modelos experimentales de hipercolesterolemia, el CLA ha demostrado producir disminución de los niveles plasmáticos de colesterol, con respuestas muy similares a las que se obtienen con los ácidos grasos omega-3, aunque el ALC no pertenece a esta serie de ácidos grasos. Estudios realizados en conejos, han demostrado que la adición de tan solo 0,5 g/día de ALC a una dieta semisintética que aporta 14% de grasa, produce una disminución significativa del colesterol-LDL y de los triglicéridos plasmáticos, produciendo al mismo tiempo una disminución de la relación colesterol-LDL/colesterol-HDL, y una disminución de la acumulación de placas ateroscleróticas en los grandes vasos.

Efectos en el sistema inmune.

Los efectos del ALC sobre el sistema inmune constituyen conocimientos más recientes y se refieren, principalmente en el estímulo que ejerce en la síntesis de IgA, IgG, IgM y a la disminución significativa de los niveles de IgE, por lo cual se presume que el ácido graso podría tener efectos favorables en la prevención y/o tratamiento de ciertas alergias alimentarias. Estudios similares han demostrado, en una relación dosis dependiente, que el ALC aumenta el nivel de linfocitos en el bazo de ratones y la secreción de IgG e IgM por parte de estas células.

Efectos anticarcinogénicos

Dentro de los diferentes tipos de cáncer en los que se ha estudiado el efecto de ALC, su acción sobre el cáncer mamario parece ser la más significativa. El ALC es más eficiente en su efecto de prevención de este tipo de cáncer que el ácido oleico, linoleico y que los ácidos grasos omega-3 eicosapentaenoico y docosahexaenoico. El mecanismo de los efectos inhibitorios que ejerce el ALC sobre la diferenciación celular anormal, que finalmente conduce al desarrollo de un cáncer, no es conocido en la actualidad, y la investigación apunta a caracterizar su acción a nivel de la expresión de ciertos tipos de mRNA que codifican para receptores de membrana involucrados en la transducción de señales, o en la traducción de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)

Efectos sobre el peso corporal

La acción reductora del peso corporal atribuida al ALC, ha derivado en una creciente explotación comercial del ácido graso sin tener, por el momento, un sustento científico sólido. La administración de una dieta que contiene 5% de aceite de maíz suplementada con un 0,5 % de ALC a ratas desde las seis semanas de edad, produce a las cuatro semanas de administración de la dieta, una reducción del 60% del contenido de grasa del tejido adiposo.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del CIACYT de la UASLP. Consistió de tres fases principales.

1. Tripsinización y cultivo celular. Después de descongelar las células se procede a realizar el procedimiento de tripsinización, para esto primero se utiliza PBS con la finalidad de quitar posibles inhibidores de la tripsina, en el caso de las placas de P35 se utiliza 1ml de PBS y en el de las de P100 2ml. Se retira el PBS para luego desecharlo. Se agrega 1ml y 2ml de tripsina para P35 y P100 respectivamente y se deja incubar durante 5 minutos. Se agrega 1ml de medio de lavado con la finalidad de desprender las células de la placa, se extrae el líquido y se agrega a un tubo falcón para luego centrifugar a 1500 RPM, durante 5 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante, se agrega 1 ml de medio específico y se resuspende el botón celular. Por último la placa se agita para homogenizar su contenido y se introduce a la incubadora a 37°C de CO₂ y a 10% de humedad. Se sembraron 10,000 células por pozo en un total de 3 placas con 96 pozos cada una. A cada pozo se le agregó 100µM de medio de proliferación (20:20). Después de 24 horas se cambia el medio de proliferación por medio de diferenciación. 72 horas después se reemplaza el medio por más medio nuevo.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|----------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Medio | | | | | | | | | | | |
| B | Medio | | | | | | | | | | | |
| C | Medio | | | | | | | | | | | |
| D | Medio | | | DMSO 0.1% | | | CLA 10uM | | | CLA 30uM | | |
| E | Medio | | | | | | | | | | | |
| F | Medio | | | | | | | | | | | |
| G | Medio | | | | | | | | | | | |
| H | Medio | | | | | | | | | | | |

Medio

3-NP [0.1 mM]

3-NP [0.25 mM]

3-NP [5 mM]

3-NP [1 mM]

3-NP [2.5 mM]

H2O2 100uM

Figura 1. Acomodo de tratamientos en placa de 96 pozos

2. Tratamiento con CLA. Se dividieron las placas en 6 secciones diferentes. En la primer y segunda fila (A1:A12 y B1:B12) se colocó solamente medio de diferenciación para así tomar esta como el controles positivos. En el primer cuadrante se colocó medio y 3NP a diferentes concentraciones por filas, las cuales eran 0.1 mM, 0.25 mM, 5 mM, 1 mM y 2.5 mM. En el segundo cuadrante se puso DMSO 0.1% junto con las mismas cantidades de 3NP para comprobar que tanto influía el vehículo en la viabilidad de las células. En el tercer y cuarto cuadrante se colocó CLA a 10µM y 25µM junto con las cantidades antes mencionadas de 3NP. Por último, en la fila H se colocó medio más H2O2 100µM considerante este como el control negativo de viabilidad celular.

3. Ensayo de MTT. En el último día se retiró el medio de cultivo de las células y se reemplazó por 100µM de MTT en cada pozo. Se dejó incubar durante 2 horas hasta que se pudo apreciar el color violeta. Por último se procedió a realizar la lectura de las placas en el espectrómetro 595 nm de absorbancia con un batido previo de 1 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos mostraron resultados favorables únicamente utilizando 3NP a una concentración de 2.5 µM. Bajo esta concentración podemos notar que el comportamiento de las células resulta ser más congruente en comparación de los tratamientos con las otras concentraciones, ya que ante la influencia del 3NP 2.5 combinado con el medio de cultivo y con el vehículo (DMSO) la viabilidad de las células disminuye, mientras que combinando el 3NP con CLA a concentración 10 y 25 la viabilidad celular aumenta; mientras que en las diferentes concentraciones sucede todo lo contrario, la viabilidad aumenta en aquellas células donde no se está utilizando un tratamiento.

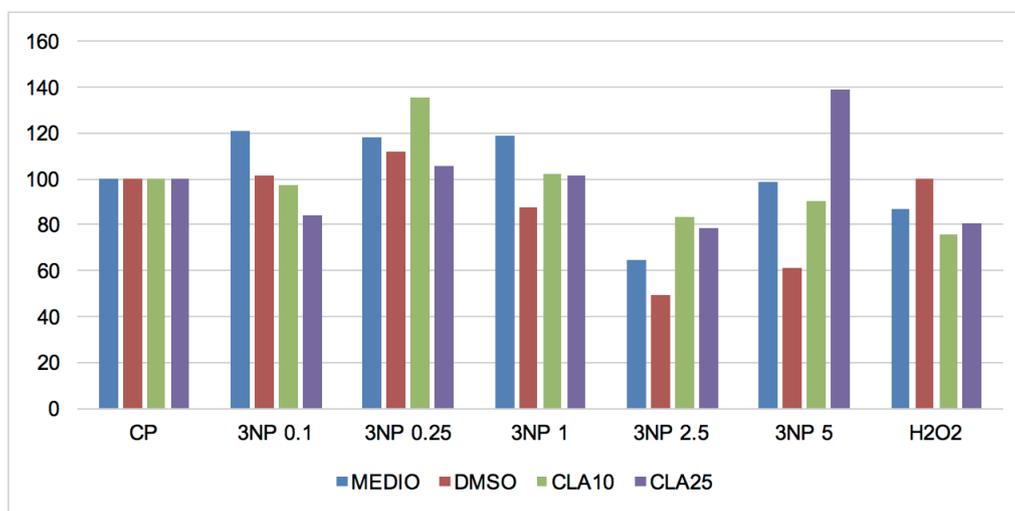


Figura 2. Resultados de viabilidad celular

CONCLUSIONES

Debido a que los resultados solo fueron relevantes bajo la concentración de 2.5 se sugiere este trabajo sirva como antecedente para investigaciones posteriores, de manera que se haga un mayor énfasis sobre esta concentración y que los resultados lleguen a ser más favorables.

BIBLIOGRAFÍA

Sanhueza, J., Nieto, S., & Valenzuela, A. (2002). Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso. *Revista Chilena de Nutrición*.

Hunt, W. T., Kamboj, A., Anderson, H. D., & Anderson, C. M. (2010). Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. *Journal of neurochemistry*, 115(1), 123-130.



Joo, N. E., & Park, C. S. (2003). Inhibition of excitotoxicity in cultured rat cortical neurons by a mixture of conjugated linoleic acid isomers. *Pharmacologicalresearch*, 47(4), 305-310.

Túnez, I., & Santamaría, A. (2009). Modelo de enfermedad de Huntington inducido con ácido 3-nitropropiónico. *Revista de neurología*, 48(8), 430-434.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Caludia. Por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de vivir esta aventura. Mil gracias. Dra. Sonia. Por la paciencia para explicarme las cosas y ayudarme en todo este proceso. Edson, Jazz y Erick. Sin ustedes SLP no hubiera sido lo mismo. Gracias por tantas risas y aventuras. Mtra. Betty. Sin usted esto no habría sido posible. Donde quiera que este mil gracias por su apoyo para que yo pudiera participar en este proyecto. Un abrazo hasta el cielo maestrira.

RIESGOS QUE CORREN LOS ESTUDIANTES DE LA LICENCIATURA DE NUTRICIÓN DE DESARROLLAR ALGÚN TRASTORNO DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA EN UNA UNIVERSIDAD DE SAN LUIS POTOSÍ

Sofía González García¹ y Lizeth García Torres²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue el de realizar una exhaustiva búsqueda tanto internacional como nacionalmente, que permitiera conocer si existe el riesgo de desarrollar algún Trastorno de la Conducta Alimentaria (TCA) como consecuencia de ser estudiante de la licenciatura en Nutrición. Mediante los resultados de las diferentes investigaciones, se eligieron dos instrumentos que lograran relacionar los principales aspectos psicológicos (deseo de delgadez, desconfianza, etc.) con las creencias acerca de los alimentos, esto con la finalidad de realizar una correlación entre los factores psicológicos y nutricionales; dichos instrumentos serán validados por un comité de bioética, los cuales si se llegaran a aprobar se aplicarían en una población de la Universidad del Centro de México en el estado de San Luis Potosí.

ABSTRACT

The objective of this study was to carry out an exhaustive search both internationally and nationally, to determine if there is a risk of developing an eating disorder as a result of being a student of the degree in Nutrition. Through the results of the different investigations found, two instruments were chosen to relate the main psychological aspects (desire for thinness, body dissatisfaction, distrust, etc.) to beliefs about food, in order to correlate Psychological and nutritional factors; these instruments will be validated by a bioethics committee, which if approved would be applied in a population of the University of Central Mexico in the state of San Luis Potosí.

Palabras Clave: Nutrición, trastornos alimenticios, creencias, presión social.

INTRODUCCIÓN

La licenciatura de Nutrición, es una disciplina que se encarga de promover y mejorar la alimentación y la nutrición de la población, mediante el diagnóstico del estado nutricional en condiciones normales o patológicas a lo largo del ciclo de la vida en lo individual y colectivo que le permita realizar una intervención nutricional; por lo cual los estudiantes de dicha licenciatura “deben” de mostrar una imagen hacia la sociedad que concuerde con lo que ejercen, sin embargo se ha dejado de lado los riesgos que corren los estudiantes al tratar de llevar y mantener dicha imagen.

Aunado a esta presión que se ejerce sobre los estudiantes, también es importante destacar que en la sociedad actual existe una cultura de delgadez extrema, en donde los jóvenes muestran una preocupación excesiva por mantener una estética corporal; como consecuencia de todas estas presiones se tiene como resultado el desarrollo de trastornos de la conducta alimentaria (TCA), los cuales son un grupo de patologías que se caracterizan por serios disturbios en la ingesta, como restricción de alimentos, episodios de apetito voraz (atracones), excesiva preocupación por la figura corporal y/o por el peso (Becker A, 1999).

En las diversas investigaciones internacionales, se ha descubierto que existe un foco de alerta en los estudiantes de Nutrición, siendo una población en riesgo de desarrollar trastornos alimentarios, esto como consecuencia de las presiones sociales anteriormente mencionadas, lo cual ha desencadenado que los porcentajes encontrados acerca de este fenómeno hayan aumentado en las últimas décadas. A pesar de esta situación sumamente preocupante, en la población mexicana, existen pocas investigaciones que ahonden acerca de la relación entre la población de estudiantes de Nutrición y la probabilidad que éstos tienen de desarrollar algún trastorno alimenticio a lo largo de la carrera, es por esta razón que con esta investigación se pretende incrementar la conciencia acerca de este factor de alerta, así como también conocer acerca del sistema de apoyo con el que cuentan dichos estudiantes, de igual manera y, mediante la aplicación de los cuestionarios de Escala de Creencias Irracionales de los Alimentos y el Eating Disorder Inventory-2 de Garner (EDI-2), se indagará acerca de los aspectos psicológicos y conductuales acerca de los TCA, lo cual se relacionará con su creencia acerca de los alimentos y, por lo tanto con la carrera de Nutrición; la obtención de dichos datos se llevará a cabo en una muestra de la Universidad del Centro de México en el estado de San Luis Potosí.

MARCO TEÓRICO

En la actualidad existe una reciente cultura en donde se exige una imagen cada vez más esbelta, de igual manera, se puede observar que el ambiente universitario propicia situaciones estresantes que alteran el funcionamiento psicológico y somático de los estudiantes (Guglielmone, 2012), reflejándose en crisis depresivas, estrés, ansiedad, etc., siendo éstos, factores de riesgo que pueden desencadenar un trastorno alimentario.

Diversos estudios han demostrado que existe una prevalencia de síntomas compatibles con TCA en los estu-

diantes de las carreras de ciencias de la salud, específicamente de Nutrición. Drake, M. (1989) informa que el 24% de las estudiantes de nutrición presentaban características compatibles con anorexia nerviosa e indican que algunas de ellas específicamente elegían su carrera debido a sus experiencias personales y obsesión con la comida. En la Universidad de Buenos Aires, Torresani (2003), hizo un estudio con 158 estudiantes de la Escuela de Nutrición, encontrando que 64% de las estudiantes consumía productos dietéticos, 22% llevaba a cabo un régimen hipocalórico y 24% ingería alimentos en exceso en un corto tiempo. Con relación a la figura corporal, 30% sentía inconformidad con su cuerpo y 35% se preocupaba por su peso; dentro de las conductas compensatorias, 6% utilizaba diuréticos o laxantes y 2% se provocaba el vómito. De igual manera, en la Universidad FASTA (Argentina) se evaluó la relación entre el año alcanzado de la Licenciatura en Nutrición con el riesgo de desarrollar Trastornos de la Alimentación, el Estado Nutricional y el Grado de Ansiedad, en este estudio se encontró que en el 35% total de estudiantes existe una prevalencia de riesgo de desarrollar Trastornos de la Alimentación (Guglielmone, 2012).

En la población mexicana, existen pocas investigaciones que ahonden acerca de la relación entre la población de estudiantes de Nutrición y la probabilidad que éstos tienen de desarrollar algún trastorno alimenticio a lo largo de la carrera, sin embargo cabe destacar que en el estado de Yucatán, específicamente en una universidad de Mérida, se realizó un estudio en donde el objetivo principal era identificar la relación entre la restricción alimentaria y otras conductas de riesgo de trastornos alimentarios en estudiantes de nutrición; se utilizó una muestra de 111 estudiantes, de los cuales 88 fueron mujeres y 23 varones, con promedio de edad de 20 años. Los resultados indican que los varones manifiestan una mayor sintomatología de trastornos alimentarios, insatisfacción corporal y conductas de riesgo que las mujeres, comprobando que efectivamente existe un porcentaje de la población en donde la carrera influye para que los jóvenes tiendan a desarrollar algún TCA; otro aspecto que cabe destacar es que el porcentaje de la población varonil en las diferentes categorías (síntomas relacionados con bulimia e insatisfacción con la imagen corporal) es mayor, descartando que estos trastornos se presentan frecuentemente en mujeres (Borjorquez, Ávila, Sobrino, & Díaz, 2008).

Por otro lado, en el estado de Veracruz en la universidad de Xalapa, se realizó un estudio donde se determinaron los factores asociados a la presencia de trastornos de la conducta alimentaria, en estudiantes de la Facultad de Nutrición donde a través de un test validado de actitudes alimentarias (Eating Attitude Test EAT-26), se encontró que existía prevalencia de 9.6/100 en esta población. Se concluyó que de las variables estudiadas las que influyen más para que las personas tengan o desarrollen algún trastorno en la conducta alimentaria son el desear pesar menos que su peso actual, aun cuando se encuentren en su peso normal, situación que tiene que ver con la satisfacción personal en relación a su composición corporal, el sobrepeso u obesidad en la infancia y adolescencia, además de la presión ejercida por los padres para dejar de comer (Ramírez, 2009); de igual manera existe una presión sociocultural que la profesión ejerce sobre la motivación para tener un cuerpo delgado, ya que es de suponerse que los licenciados en Nutrición deben representar lo que predicán.

MÉTODOS Y MATERIALES

Al observar que efectivamente existe una presión sociocultural en donde los estudiantes de la licenciatura en Nutrición deben mantener una imagen, se realizó una búsqueda y recolección de investigaciones, las cuales pudieran respaldar este trabajo. Estas investigaciones ayudaron a profundizar más en diferentes ámbitos de este fenómeno, por ejemplo las creencias erróneas o adecuadas que se tienen acerca de los alimentos y, mediante los resultados obtenidos se relacionará con el estado psicológico que los estudiantes de Nutrición muestran, para que a su vez, se puedan detectar a tiempo los factores de riesgo para desarrollar algún TCA y por lo tanto, llevar a cabo medidas preventivas que incidan en la vida de los estudiantes.

Para obtener aspectos psicológicos y las creencias que se tienen acerca de los alimentos, se utilizarán los siguientes cuestionarios:

-IRRATIONAL FOOD BELIEFS SCALE (Spanish version) (Osberg, Poland, Aguayo, and MacDougall, 2008. Adaptation and validation by Jáuregui and Bolaños, 2010) analiza los conocimientos acerca de la alimentación. Consta de 57 ítems, mostrando algunos de ellos pensamientos irracionales y otros pensamientos racionales, que los sujetos tendrán que contestar en una escala de 1-4, siendo 1 muy en desacuerdo, 2 en desacuerdo, 3 de acuerdo y 4 completamente de acuerdo.

-Eating Disorder Inventory-2 (EDI-2) se trata de una prueba que proporciona datos sobre los aspectos psicológicos y conductuales de estos trastornos. Consta de diferentes subescalas: deseo de delgadez, síntomas bulímicos, insatisfacción corporal, ineficacia, perfeccionismo, desconfianza interpersonal, conciencia interoceptiva, miedo a madurar, ascetismo, impulsividad e inseguridad social. En esta prueba la puntuación de cada subescala tiene más valor que la puntuación total, no hay puntos de corte.

RESULTADOS

Mediante la exhaustiva búsqueda de diversas investigaciones tanto internacionales como nacionales, se tuvo como resultado la obtención del marco teórico, en donde se logró encontrar que efectivamente existen diversos riesgos en donde la población de la licenciatura de Nutrición puede llegar a desarrollar algún TCA

como principal consecuencia de las presiones sociales en donde se les exige tener una imagen esbelta como concordancia con su carrera. De igual manera, se descubrió que en México existen pocas investigaciones acerca de este fenómeno creciente, en donde es de suma importancia comenzar a crear diversas herramientas que fortalezcan a los alumnos, para que de esta manera los posibles riesgos de desarrollar algún TCA, vayan disminuyendo y como consecuencia se tenga una población con mayor salud mental.

Con base a las diferentes investigaciones encontradas, se escogieron los dos instrumentos que se aplicarán para la obtención de los aspectos psicológicos y conductuales y las creencias que se tienen acerca de los alimentos. Esto se decidió gracias a que son pruebas validadas y estandarizadas en una población latinoamericana y, que los estudios encontrados se realizaron precisamente en estas poblaciones, así como también en algunos estados de la república mexicana. En Chile mediante la aplicación del EDI-2, se encontró que las conductas y sintomatologías más prevalentes en el grupo de riesgo fueron insatisfacción corporal ($p=0,01$), motivación por la delgadez ($p=0,01$) y perfeccionismo ($p=0,05$). Se detectó una mayor tendencia hacia la presencia de conductas anoréxicas con relación a la bulimica. Así mismo, en Colombia en la Universidad de Manizales, se realizó una investigación en 165 estudiantes, en donde los resultados reflejaron que en un 12.7% de la población se presentaron conductas alimentarias de riesgo. En México, se encontró que en la Universidad de Guadalajara, se realizó una investigación ligada al tema de las conductas alimentarias de riesgo y los resultados obtenidos mostraron que el 50.5% de las mujeres tendía a presentar pensamientos o a darse atracones de comida incontrolables, característica distintiva de la bulimia. El 36.8% presentaban pobre autoestima, autoevaluación negativa, incluidos sentimientos de vacío y soledad.

En cuanto a Irrational Food Beliefs Scale (IFBS), no se encontraron investigaciones que hayan utilizado este instrumento, sin embargo es una prueba estandarizada en población española y por lo tanto validada, que puede aportar a esta investigación los requisitos psicométricos para medir las creencias racionales-irracionales acerca de los alimentos, lo cual se relaciona directamente con la licenciatura en Nutrición y al mismo tiempo, aporta aspectos psicológicos que se podrán relacionar con los resultados obtenidos del EDI-2.

CONCLUSIONES

Al analizar la cultura actual, en donde se exige una figura esbelta y se deja de lado los aspectos importantes de la persona, como su salud física y mental, y al observar que en México existen muy pocas investigaciones en donde se le dé la relevancia necesaria a este fenómeno creciente, en donde los jóvenes están permanentemente preocupados por mantener una imagen cada vez más distorsionada, se realizó esta investigación, la cual podemos aterrizar al añadirle una variable poco estudiada en estos trastornos: ¿existe un riesgo de que los estudiantes de Nutrición desarrollen algún TCA? Esto como consecuencia de los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera aunado a la presión social ya mencionada. Por lo tanto, se realizó una exhaustiva búsqueda de diversas investigaciones tanto internacionales como nacionales, las cuales nos permitieran ahondar acerca de estudios que también muestran interés en este problema y, que buscan una explicación psicológica y nutricional ante esta situación, ya que el ser humano al ser un ser biopsicosocial, es necesario analizar los diversos factores que involucran el ambiente de los estudiantes.

Como forma de complementar esta investigación, se eligieron dos instrumentos (Irrational Food Beliefs Scale y el Eating Disorder Inventory-2) que ayudaran a proporcionar los aspectos psicológicos y las creencias que se tienen acerca de los alimentos, para que de esta manera se pueda conocer si realmente existe una relación entre los trastornos alimenticios con la licenciatura en Nutrición; sin embargo al ser una investigación derivada de un estudio más grande, dichos instrumentos deberán pasar por un comité de bioética, el cual decidirá si son aptos para obtener información acerca de los objetivos planteados.

BIBLIOGRAFÍA

- Becker A, G. S. (1999). Eating disorders. *N Engl J Med*, [pp. 1092-1098].
- Behar R, Alviña M. (2007). “Trastornos de la conducta alimentaria en estudiantes de la carrera de Nutrición y Dietética” en *Revista Chilena Nutricional*
- Borjorquez, R. M., Ávila, M. L., Sobrino, M. d., & Díaz, R. V. (2008). Restricción alimentaria y conductas de riesgo de trastornos alimentarios en estudiantes de Nutrición. *Psicología y salud*, [pp. 189-198].
- Cano A., Castaño J., Corredor D.A., García A.M., González M., Lloreaga O.L., et al. (2007). Factores de riesgo para trastornos de la alimentación de la Universidad de Manizales en *MedUNAB*, 10 (3) [pp. 187-194]
- Drake M. (1989). Symptoms of anorexia nervosa in female university dietetic major. *American Psychiatric Association*, [pp. 97- 98].
- Guglielmone, M. E. (2012). Trastornos alimentarios, ansiedad y estado nutricional en estudiantes de nutrición. Departamento de Metodología de la Investigación, [pp. 1-93].
- Robles S., Hernández A. (2007). Trastornos de la alimentación en mujeres estudiantes del CUCEA de la universidad de Guadalajara (perfil y algunos factores predisponentes). Mérida, Yucatán, México. Consultado el 24 de junio de 2017. Disponible en: <http://www.comie.org.mx/congreso/memoria/v9/ponencias/at10/PRE1178132505.pdf>
- Torresani, M. (2003). Conductas alimentarias y prevalencia del riesgo de padecer trastornos alimentarios en estudiantes de nutrición. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 9(1), [pp. 30-33].

FRECUENCIA DE NEUROPATÍA DIAGNOSTICADA POR TERMOGRAFÍA EN INDIVIDUOS SIN DIABETES Y SIN CARGA GENÉTICA PARA DIABETES MELLITUS 2, INDIVIDUOS SIN DIABETES Y CON CARGA GENÉTICA PARA DIABETES MELLITUS 2 Y PACIENTES CON DIABETES MELLITUS 2.

Cueli Bárcena, S; Hernández Gómez, J.F.; Rodríguez Leyva, I.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina;
Av. Venustiano Carranza 2405, Col. Los Filtros,
C.P. 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México, scuelib94@gmail.com, ildefonso.rodriguez@uaslp.mx

RESUMEN

Se ha observado un aumento en la frecuencia de neuropatía en individuos con Diabetes Mellitus 2 (DM2), secundario a la hiperglucemia asociada; sin embargo, se desconoce la frecuencia de esta patología en nuestro medio, y en especial en individuos sanos con carga genética para DM2. El objetivo fue comparar la frecuencia de neuropatía periférica en individuos sanos con y sin carga genética para DM2, y pacientes con DM2, evaluados por termografía plantar. Se obtuvo información de tres grupos de estudio integrados por pacientes de la consulta externa del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto". El primero consistió en 34 pacientes con DM2, el segundo en 34 pacientes sanos con carga genética para DM2 y el tercer grupo de 32 controles sanos sin carga para DM2. Para su estudio, se utilizó una cámara termográfica marca Flir, y se realizó la prueba de termografía plantar. Las imágenes fueron analizadas con el programa Flir Tools. Los datos fueron analizados con STATISTICA 12. En los diabéticos la frecuencia de neuropatía fue de 76.47% (26/34), a diferencia de los sanos que fue de 46.87% (15/32), OR=0.27 (IC 95%=0.09-0.77) p=0.01. En el grupo de sanos con carga genética, al comparar el promedio de familiares con DM2 de sujetos con neuropatía contra normales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (2.7 vs 0.9 familiares, p=0.004). Se observó un riesgo aumentado de presentar neuropatía al padecer DM2. Se encontró asociación entre el número de familiares de primer grado con DM2 y neuropatía en el grupo sano con carga genética.

ABSTRACT

Introduction: An increased frequency of neuropathy has been observed in individuals with Diabetes Mellitus 2 (DM2), secondary to associated hyperglycemia; However, the frequency of this pathology in our environment is unknown, and especially in healthy individuals with genetic load for DM2.

Objective: To compare the frequency of peripheral neuropathy in healthy individuals with and without genetic load for DM2, and patients with DM2, evaluated by plantar thermography.

Material and methods: Three study groups were integrated by patients from the external consultation of the Central Hospital "Dr. Ignacio Morones Prieto". The first consisted of 34 patients with DM2, the second in 34 healthy patients with a genetic load for DM2 and the third group of 32 healthy controls with no DM2 load. A Flir thermographic camera was used for the study, and the plantar thermography test was performed. The images were analyzed with the program Flir Tools. The data was analyzed with STATISTICA 12. Results: In diabetics, the frequency of neuropathy was 76.47% (26/34), unlike the healthy ones that was 46.87% (15/32), OR = 0.27 (95% CI, = 0.09-0.77) p = 0.01. In the group of healthy subjects with a genetic load, a statistically significant difference was found (2.7 vs 0.9 relatives, p=0.004) when comparing the average family members with DM2 of subjects with neuropathy versus normal.

Conclusions: An increased risk of developing neuropathy due to DM2 was observed. We found an association between the number of first-degree relatives with DM2 and neuropathy in the healthy group with genetic load.

Palabras Clave: neuropatía periférica, diabetes mellitus tipo 2, termografía plantar

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica degenerativa cuyo impacto en la morbimortalidad de los adultos mayores la han convertido en uno de los principales problemas de salud pública. El número de personas con diabetes se incrementa debido al crecimiento poblacional, envejecimiento, urbanización e

obesidad e inactividad física. La prevalencia de diabetes mellitus en México fue de 9.17% en adultos en 2012. Del total de diabéticos, 46.95% reportó también diagnóstico de hipertensión y en el 54.46% se encontró an-

tecedentes familiares de diabetes. Debido a la morbimortalidad asociada con esta patología, se ha resaltado la importancia de identificar nuevas estrategias para retrasar o prevenir el desarrollo de esta enfermedad. Los factores de riesgo para diabetes tipo 2 han sido bien establecidos e incluyen la susceptibilidad genética subyacente. Se ha demostrado que la evaluación cuidadosa de los antecedentes familiares en el interrogatorio de una persona con factores de riesgo para padecer la enfermedad puede ser una valiosa herramienta en el campo de la salud pública. Por ejemplo, un estudio de seguimiento a largo plazo conducido entre la población Pima demostró que la historia familiar de diabetes incrementó hasta dos veces el riesgo de desarrollarla comparados con los hombres sin este antecedente (riesgo relativo ajustado de 2.01, IC 95% 1.54-2.64). Es por esto que se ha incluido en una variedad de herramientas diagnósticas designadas para la población en riesgo de desarrollar diabetes, sobre todo dado el hecho de que esta patología tiene una fase asintomática prolongada, desde la cual se inicia el desarrollo de las complicaciones como retinopatía, nefropatía y polineuropatía, incluso aún antes de demostrarse las alteraciones bioquímicas características de la diabetes.

La polineuropatía diabética afecta 100,000 personas al año en la comunidad y representa el tercer trastorno neurológico más frecuente, superado únicamente por el accidente cerebrovascular y la infección por herpes zoster (14). Estudios poblacionales previos han reportado tasas de prevalencia de polineuropatía que van desde 8 a 54% en pacientes diabéticos tipo 1, y de 13 a 46% en pacientes diabéticos tipo 2. Los factores de riesgo más consistentemente asociados con polineuropatía en pacientes con diabetes tipo 2 a nivel poblacional fueron edad avanzada, duración de la diabetes, altura, y pobre control glucémico evidenciado en hemoglobina glucosilada (A1C), así como la presencia de retinopatía y nefropatía. El método de evaluación habitual para el diagnóstico de la neuropatía es el MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument), que incluye la inspección de los pies (evaluando deformidades, piel seca, callos e infección, la presencia de úlceras y reflejos osteotendinosos) ya que la electromiografía, la cual es considerada el estándar de oro, resulta invasiva y de difícil acceso; sin embargo, la variabilidad intra e interobservador ha obligado a buscar nuevas alternativas diagnósticas, emergiendo la termografía plantar, la cual ha sido validada versus el estándar de oro con una sensibilidad del 81.3%, y con un índice de correlación intraclass del 95 al 100%.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de realización: Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí, México. Universo del estudio, grupos de estudio:

a) Individuos sin diabetes mellitus, sin carga genética para DM2 demostrado al interrogatorio y con evidencia bioquímica de glucemia en ayuno menor a 100 mg/dl. b) Individuos sin diabetes mellitus, con carga genética para DM2 demostrado al interrogatorio y con evidencia bioquímica de glucemia en ayuno menor a 100 mg/dl.

c) Pacientes con diagnóstico de DM2 demostrado con evidencia bioquímica de glucemia en ayuno mayor a 125 mg/dl, hemoglobina glucosilada mayor a 6.5%, glucemia mayor a 200 mg/dl en una toma aleatoria o dos horas posteriores a una carga de 75 g de glucosa vía oral, o bien antecedente de tratamiento para dicha enfermedad con hipoglucemiantes o insulina.

Criterios de selección:

1.- Inclusión: • Consentimiento informado para participar en el estudio • Cualquier sexo • Edad mayor a 18 años • Residentes de la ciudad de SLP

2.- Exclusión: • Enfermedades autoinmunes por interrogatorio • Insuficiencia vascular periférica por exploración física dermatológica • Traumatismos en miembros inferiores en los últimos tres meses • Hernia de disco por interrogatorio y exploración física. • Infección de piel o tejidos blandos de miembros inferiores por evaluación dermatológica. • Vasculitis por antecedente y tratamiento específico • Edema de miembros inferiores al EF • Uso alguna vez de anticomiciales por interrogatorio • Diabetes mellitus tipo 1 por interrogatorio. • Antecedente de fenómeno de Raynaud

3.- Eliminación: • No aplica.

Variables en el estudio:

a) Individuos sin diabetes mellitus 2: glucemia en ayuno menor a 100 mg/dl ni antecedentes personales de la enfermedad.

b) Carga genética para DM2: Al menos un familiar en primer grado diagnosticado y en tratamiento de DM2 al interrogatorio.

c) Diabetes Mellitus tipo 2: Antecedente de glucemia en ayuno mayor a 125 mg/dl, glucosa en sangre de 200 mg/dl de dos horas posteriores a la ingesta de 75 g de glucosa, hemoglobina glucosilada mayor a 6.5%, glucosa mayor a 200 mg/dl en cualquier momento o en tratamiento actual con hipoglucemiantes orales o insulina por diagnóstico de DM2.

d) Neuropatía periférica diagnosticada por termografía: Índice de recuperación termal (IRT) alterado, calculado como la razón entre la temperatura plantar promedio de 10 sitios de interés (ambos talones, ortijos mayores y cabezas metatarso-falángicas 1, 3 y 5) en reposo y tras la exposición a agua a 15 grados centígrados por un minuto. Una relación $< a 90\%$ o $> a 100\%$ posterior a dicha prueba se considera alterada.

Variables de confusión:

Sexo: Interrogatorio (masculino o femenino) Escala de medición nominal Edad: Interrogatorio (en años cumplidos) Escala de medición continua

Tiempo de Evolución de DM2 (en años cumplidos) Escala de medición: continua. Tipo de muestreo: No probabilístico por conveniencia

Cálculo del tamaño de la muestra:

Dado que el análisis estadístico incluye la comparación de proporciones múltiples se considera la mínima distancia entre dos grupos 10% vs 30% con una confianza del 95% y poder del 80% a dos colas, obteniéndose $n= 100$ para el total de los tres grupos. Los confusores fueron manejados mediante regresión logística.

(Feinstein AR, Multivariable analysis, an Introduction. New Haven, Yale University Press, 1996.) Análisis estadístico: Comparación por chi 2 de Mantel y Haenzel. significancia si $p \leq 0.05$

Aspectos éticos: Investigación sin riesgo. Los pacientes que resultaron positivos para neuropatía o para diabetes mellitus tipo 2 fueron canalizados a las consultas de endocrinología y neurología.

Plan de trabajo:

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 fueron seleccionados de la consulta externa de endocrinología. Los individuos sin diabetes mellitus fueron elegidos si cualquier glucemia en ayuno fuera inferior a 100 mg/dl , aceptaran participar en el estudio, cumplieran con los criterios de selección expuestos anteriormente y firmaran consentimiento informado. Se les interrogó sobre los antecedentes de diabetes mellitus y se realizó termografía con cámara termográfica marca FLIR. Se realizó la medición termográfica de acuerdo a los lineamientos de la Asociación Americana de Termografía (41). La prueba consistió en la toma de una fotografía térmica basal de las plantas de los pies de los individuos posterior a una aclimatación de 15 minutos de duración a temperatura ambiente. Posterior a ello se cubrieron los pies de los sujetos con una bolsa plástica para evitar el contacto con el agua, y se sumergieron en agua a 15 grados centígrados durante 60 segundos. Se tomó una nueva fotografía termográfica a los 10 minutos de haber retirado los pies del agua. Estas imágenes fueron evaluadas por medio de un software especializado, y se promediaron las temperaturas de 10 áreas de interés en los pies de los individuos. Se calculó el índice de recuperación termal (IRT) por medio de una división de la temperatura basal entre la temperatura posterior a la prueba de estrés al frío, quedando como valor positivo para neuropatía un índice $< a 90\%$ o $> a 100\%$. Los pacientes que resulten positivos para neuropatía o para diabetes mellitus tipo 2 fueron canalizados a las consultas de endocrinología y neurología.

El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA 12.

RESULTADOS

El presente estudio se realizó en la Ciudad de San Luis Potosí, entre octubre del 2016 y julio del 2017. Se incluyeron un total de 100 pacientes: 34 pertenecientes al grupo con diabetes mellitus, 34 pertenecientes al grupo sano con carga genética para DM2 y 32 del grupo de sanos sin dicha carga genética. Las edades oscilaron entre 23 y 85 años (media 55 años, $DE= 11.3$ años), con predominio del sexo femenino en un 77% . El tiempo de evolución promedio fue de 14.14 años ($DE=10.31$ años). La frecuencia de hipertensión arterial sistémica (HAS) fue de 43% .

En la tabla 1 se muestra el comparativo de las variables confusión por grupo de estudio. Como se puede observar existió diferencia estadísticamente significativa en la edad entre los grupos, con una $p=.001$ entre el grupo 1 y 2, y de 0.026 entre el 2 y 3. Ver figura 1. De igual manera se observó diferencia en la frecuencia de HAS y síntomas de neuropatía, ver figura 2.

La distribución de la edad se consideró normal mediante Shapiro Wilk, $p=0.09$. Índice de recuperación termal: Se encontraron 64 pacientes con IRT alterado, de los cuales 26 pertenecieron al grupo de diabéticos, 23 al grupo de no diabéticos con carga genética para DM2 y 15 al grupo de sanos sin carga genética ($p=0.003$).

La edad promedio encontrada para el grupo con IRT alterado fue de 56.6 años ($DE= 11.19$ años) en comparación con el grupo con IRT normal, que fue de 52.08 ($DE=11.9$ años), $P=NS$. En cuanto al sexo se encontró que el 76.6% de los pacientes con IRT alterado fueron mujeres, de forma similar al grupo sin alteración con 77.7 , $P=NS$.

Por otro lado, la frecuencia de HAS fue de 53% en el grupo de IRT alterado prácticamente el doble de los pacientes con IRT normal (25%). Cuando se comparó la frecuencia de neuropatía diagnosticada por termo-

grafía plantar (IRT alterado) se encontró que en el grupo de diabéticos la frecuencia fue de 76.47% (26/34), a diferencia de los sanos sin carga genética para diabetes de 46.87% (15/32), OR=0.27 (IC 95%=0.09-0.77) p=0.01. De igual manera se observó una tendencia al comparar el grupo de sanos con carga genética 67.64% (23/34) p=0.09.

Se encontró que los pacientes con IRT positivo presentaron síntomas de neuropatía en el 87.5% de los casos. Por último, al comparar el promedio de familiares de primer grado con DM2 en el grupo de sanos (grupo 2) con IRT alterado contra IRT normal, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (2.7 vs 0.9 familiares, U de Mann Whitney, p=0.004)

El análisis multivariado por regresión logística múltiple se realizó, por lo tanto, incluyendo únicamente grupo de estudio e hipertensión como variables predictoras del IRT alterado.

La significancia del modelo se probó mediante chi², con una P = 0.0035 (ver tabla 2).

DISCUSIÓN

La neuropatía diabética es de suma importancia como complicación temprana de la diabetes, que además se puede manifestar antes de que se exista la presentación clínica de la enfermedad. Nuestros resultados, en lo que respecta a variables sociodemográficas, demostraron una muestra representativa de la población de estudio. Aunque los grupos no fueron comparables en cuanto HAS, se manejaron en el análisis. En cuando a los hallazgos encontrados en el IRT de los tres grupos, se observó disminución de riesgo de padecer polineuropatía al comparar el grupo de sujetos sanos contra los diabéticos. Además, el tener familiares de primer grado con DM2 mostró una tendencia a manifestar más frecuentemente la neuropatía. Probablemente uno de los resultados más importantes fue que se demostró una fuerte asociación entre el número de familiares en primer grado con DM2 y la padecer neuropatía diagnosticada por termografía, lo cual nos refleja la importancia de la carga genética de DM2 en el riesgo de presentar complicaciones incluso antes de manifestar la enfermedad. Este estudio tiene implicaciones en el diagnóstico, el screening y el tratamiento prematuro de los pacientes con DM2, pero especialmente, en los que no la padecen pero que tienen factores de riesgo. Idealmente, esta prueba se podrá usar en un futuro para detectar complicaciones tempranas de la DM2, así como para la detección de sujetos en riesgo, en los que se podrá tener una intervención preventiva. La principal limitación del estudio radicó en la prueba misma, que tendió a sobreestimar la polineuropatía de manera proporcional

en todos los grupos. Otra de ellas fue que los grupos no fueron comparables de entrada, por lo que recomendamos que estudios futuros usen una mayor n, preferentemente con sujetos proporcionales en edad y sexo para cada grupo.

CONCLUSIONES

Se observó un riesgo aumentado de presentar neuropatía diagnosticada por termografía al padecer DM2. La presencia de neuropatía en los pacientes es independiente de edad, sexo y HAS. Se observó una tendencia a presentar neuropatía diagnosticada por termografía al tener por lo menos un familiar en primer grado con DM2. Se encontró asociación entre el número de familiares de primer grado con DM2 y neuropatía en el grupo sano con carga genética. No existieron complicaciones durante el estudio. Es necesario ampliar este estudio, buscando una correlación más estrecha con las manifestaciones tempranas de la diabetes para poder definir los usos y aplicabilidad de esta valiosa prueba en la prevención de las complicaciones de la diabetes, tales como la polineuropatía.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-1053.
2. Hernández-Ávila M, Gutiérrez J, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México [Internet]*. 2013 [citado en 25 Enero 2016];55:s129-s136. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013000800009&lng=es.
3. Harrison T, Hindorff L, Kim H, Wines R, Bowen D, McGrath B et al. Family history of diabetes as a potential public health tool. *American Journal of Preventive Medicine*. 2003;24(2):152-159.
4. Shaten BJ, Smith GD, Kuller LH, Neaton JD. Risk factors for the development of type II diabetes among men enrolled in the usual care group of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16:1331-9
5. Valdez R. Detecting Undiagnosed Type 2 Diabetes: Family History as a Risk Factor and Screening Tool. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009;3(4):722-726.
6. Nguyen T, Wang J, Wong T. Retinal Vascular Changes in Pre-Diabetes and Prehypertension: New fin-

- dings and their research and clinical implications. *Diabetes Care*. 2007;30(10):2708-2715.
- 7.Wong TY, Barr EL, Tapp RJ, Harper CA, Taylor HR, Zimmet PZ, Shaw JE: Retinopathy in persons with impaired glucose metabolism: the Australian Diabetes Obesity and Lifestyle (AusDiab) study. *Am J Ophthalmol* 140:1157–1159, 2005
 - 8.The prevalence of retinopathy in impaired glucose tolerance and recent-onset diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabet Med* 24:137–144, 2007
 - 9.Mogensen CE, Chachati A, Christensen CK, Deckert T, Hommel E, Kastrup J, et al. Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. *Uremia Invest* 1986;9:85–95.
 - 10.Parving H-H, Oxenbøll B, Svendsen PAA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy: a longitudinal study of urinary albumin excretion rate. *Acta Endocrinol* 1982;100:550–5.
 - 11.Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982;i:1430–2.
 - 12.Mogensen CE, Christensen C. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984;311:189–93.
 - 13.Mathiesen ER, Oxenbøll B, Johansen K, Svendsen PAA, Deckert T. Incipient nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1984;26:406–10.
 - 14.MacDonald BK, Cockerell OC, Sander JW, Shorvon SD: The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain* 123:665–676, 2000
 - 15.Knuiman MW, Welborn TA, McCann VJ, Stanton KG, Constable IJ: Prevalence of diabetic complications in relation to risk factors. *Diabetes* 35:1332–1339, 1986
 - 16.Fujimoto WY, Leonetti DL, Kinyoun JL, Shuman WP, Stolov WC, Wahl PW: Prevalence of complications among second generation Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance, or normal glucose tolerance. *Diabetes* 36: 730–739, 1987
 - 17.Franklin GM, Kahn LB, Baxter J, Marshall JA, Hamman RF Sensory neuropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 131:633–643
 - 18.Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ 3d, Service FJ: The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43:817–824, 1993
 - 19.Harris M, Eastman R, Cowie C: Symptoms of sensory neuropathy in adults with NIDDM in the U.S. population. *Diabetes Care* 16:1446–1452, 1993
 - 20.Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, Dowse GK, Gareeboo H, Tuomilehto J, Alberti KGMM, Zimmet PZ: Diabetic neuropathy in Mauritius: prevalence and risk factors. *Diabetes Res Clin Prac* 42:131– 139, 1998
 - 21.Verhoeven S, van Ballegoie E, Casparie AF: Impact of late complications in type 2 diabetes in a Dutch population. *Diabet Med* 8:435– 438, 1991
 - 22.Walters DP, Gattling W, Mullee MA, Hill RD: The prevalence of diabetic distal sensory neuropathy in an English community. *Diabet Med* 9:349–353, 1992
 - 23.Gregg EW, Sorlie P, Paulose-Ram R, Gu Q, Eberhardt MS, Wolz M, Burt V, Curtin L, Engelgau M, Geiss L; 1999–2000 national health and nutrition examination survey: Prevalence of lower-extremity disease in the U.S. adult population 40 years of age with and without diabetes: 1999–2000 National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 27:1591–1597, 2004
 - 24.Tapp RJ, Shaw JE, de Courten MP, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ; Aus- Diab Study Group: Foot complications in type 2 diabetes: an Australian populationbased study. *Diabet Med* 20:105–113, 2003
 - 25.Hanley AJ, Harris SB, Mamakeesick M, Goodwin K, Fiddler E, Hegele RA, Spence JD, House AA, Brown E, Schoales B, McLaughlin JR, Klein R, Zinman B: Complications of type 2 diabetes among Aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors. *Diabetes Care* 28: 2054–2057, 2005
 - 26.Cheng YJ, Gregg EW, Kahn HS, Williams DE, De Rekeneire N, Narayan KM: Peripheral insensate neuropathy—a tall problem for US adults? *Am J Epidemiol* 164:873–880, 2006

27. Koopman RJ, Mainous AG, Liszka HA, Colwell JA, Slate EH, Carnemolla MA, Everett CJ: Evidence of nephropathy and peripheral neuropathy in US adults with undiagnosed diabetes. *Ann Fam Med* 4:427–432, 2006
28. Dyck PJ, Davies JL, Wilson DM, Service FJ, Melton LJ, O'Brien PC: Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Diabetes Care* 22:1479–1486, 1999
29. Dyck PJ, Davies JL, Clark VM, Litchy WJ, Dyck PJ, Klein CJ, Rizza RA, Pach JM, Klein R, Larson TS, Melton LJ, O'Brien PC: Modeling chronic glycemic exposure variables as correlates and predictors of microvascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 29:2282–2288, 2006
30. Franklin GM, Shetterly SM, Cohen JA, Baxter J, Hamman RF: Risk factors for distal symmetric neuropathy in NIDDM: The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care* 17:1172–1177, 1994
31. de Neeling JN, Beks PJ, Bertelsmann FW, Heine RJ, Bouter LM: Peripheral somatic nerve function in relation to glucose tolerance in an elderly Caucasian population: the Hoorn study. *Diabet Med* 13:960–966, 1996
32. Singleton JR, Smith AG: Therapy insight: neurological complications of prediabetes. *Nat Clin Pract Neurol* 2:276–282, 2006
33. Hoffman-Snyder C, Smith BE, Ross MA, Hernandez J, Bosch EP: Value of the oral glucose tolerance test in the evaluation of chronic idiopathic axonal polyneuropathy. *Arch Neurol* 63:1075–1079, 2006
34. Smith AG, Singleton JR: Idiopathic neuropathy, prediabetes and the metabolic syndrome. *J Neurol Sci* 242:9–14, 2006
35. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A: Prevalence of Polyneuropathy in Pre-Diabetes and Diabetes Is Associated With Abdominal Obesity and Macroangiopathy: The MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care*. 2007;31(3):464-469.
36. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA: A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 17:1281–1289, 1994
37. Balbinot L, Canani L, Robinson C, Achaval M, Zaro M: Plantar thermography is useful in the early diagnosis of diabetic neuropathy. *Clinics*. 2012;67(12) 1419-1425.
38. Balbinot L, Robinson C, Achaval M, Zaro M, Brioschi M: Repeatability of Infrared Plantar Thermography in Diabetes Patients: A Pilot Study. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2013;7(5):1130-1137.
39. William T. Cefalu, MD, Standards of Medical Care in Diabetes—2016 *Diabetes Care* 2016;39(Suppl. 1):S13–S22 | DOI: 10.2337/dcl6-S005
40. Mamatha Pasnoor, MDa,*; Mazen M. Dimachkie, MDa; Patricia Kluding, PT, PhD; Richard J. Barohn, MDa Diabetic Neuropathy Part 1 Overview and Symmetric Phenotypes *Neurol Clin* 31 (2013) 425–445
41. Bharara M, Cobb JE, Claremont DJ: Thermography and Thermometry in the assessment of diabetic neuropathic foot: a case for furthering the role of thermal techniques. *Int J Low Extrem Wounds*. 2006;5(4):250–60.
42. Handelsman, Y., Bloomgarden, Z., Grunberger, G., Umpierrez, G., Zimmerman, R., Bailey, T., Blonde, L., Bray, G., Cohen, A., Dagogo-Jack, S., Davidson, J., Einhorn, D., Ganda, O., Garber, A., Garvey, W., Henry, R., Hirsch, I., Horton, E., Hurley, D., Jellinger, P., Jovanović, L., Lebovitz, H., LeRoith, D., Levy, P., McGill, J., Mechanick, J., Mestman, J., Moghissi, E., Orzack, E., Pessah-Pollack, R., Rosenblit, P., Vinik, A., Wyne, K. and Zangeneh, F. (2015). AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY – CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR DEVELOPING A DIABETES MELLITUS COMPREHENSIVE CARE PLAN – 2015. *Endocrine Practice*, 21(Supplement 1), pp.1-87.

DESARROLLO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA MEDIR CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS J774.

Cueli Bárcena, S; Hernández Gómez, J.F.; Rodríguez Leyva, I.

Penélope Herrera Galván y Gabriela Pérez Flores
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Rafael Curiel, C.P. 79060 Cd Valles, S.L.P., MÉXICO;
penelope.herrera2@outlook.com
gabriela.perez@uaslp.mx

RESUMEN

El receptor P2X7 es activado por altas concentraciones de ATP, activa el inflamasoma que conduce a la liberación de IL-1 β . Su estimulación prolongada da lugar a muerte celular, por lo que se analizaron condiciones experimentales para medir IL-1 β liberada por mecanismos inflamatorios. Los tratamientos consistieron en 4 horas de LPS produciendo la forma inmadura de IL-1 β para luego estimular con ATP para su maduración. La estimulación con 3 mM de ATP durante 0.5 o 1 hora es adecuado para medir la liberación de IL-1 β por células J774. Para bloquear a los canales de potasio se recomienda hacer una mezcla de sodio/TEA. Queda por establecer mejores condiciones experimentales para medir IL-1 β por WB, siendo lo más recomendable empezar con dot blot.

PALABRAS CLAVE

P2X7, IL-1 β , Inflamación, muerte celular.

ABSTRACT

P2X7 receptor is activated by high concentrations of ATP, induce the assembly of the inflammasome and the maturation of IL-1 β . P2X7 prolonged stimulation results in cell death. In this work, we carry on experimental conditions to measure IL-1 β maturation by inflammatory mechanisms. The treatments consisted of 4 hours of LPS producing the immature form of IL-1 β and then stimulated with ATP for IL-1 β maturation. Stimulation with 3 mM ATP for 0.5 or 1 hour is adequate to measure the release of IL-1 β by J774 cells. To block the potassium channels it is recommended to make a sodium /TEA mixture. It remains to establish the best experimental conditions for measuring IL-1 β by WB, and we suggested it is best to start with dot blot.

KEY WORDS: P2X7, IL-1 β , Inflammation, death cell.

INTRODUCCIÓN

Los receptores purinérgicos participan en las diversas funciones fisiológicas. Un miembro de la familia, el receptor P2X7, regula la expresión y secreción de varias citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , por lo que se asocia a procesos inflamatorios agudo. La inflamación es una parte de la respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares a los estímulos nocivos, tales como agentes patógenos, células dañadas o irritantes (Mehta et al. 2014). Sin embargo, si la respuesta inflamatoria aguda no logra eliminar al patógeno, la enfermedad de la infección puede progresar y complicarse. La inflamación crónica en sí mismo puede causar muchas enfermedades como alergias, autoinmunidad, y muchos otros (Garib et al. 2016).

En el proceso inflamatorio, las células del sistema inmune innato, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, expresan receptores de reconocimiento de patrones codificados en línea germinal (PRRs), por ejemplo los Toll-like receptors (TLR). Estos PRRs detectan patógenos extracelulares e intracelulares a través de receptores que detectan una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) conservados evolutivamente incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono. El reconocimiento de PAMP por PRRs específicos impulsa las respuestas pro-inflamatorias que luego de otros estímulos resultan en la activación de un complejo molecular denominado inflamasoma (Bierschenk et al. 2017). Uno de los estímulos conocidos para activar el inflamasoma es la adenosina 5 'trifosfato extracelular (ATP). La señalización por inflamasoma desencadena respuestas pro-inflamatorias, dando como resultado la producción de una variedad de citocinas y quimiocinas, y la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular y los inmunorreceptores (Kojima et al. 2014). A la fecha no es completamente claro cuáles son todos los actores de los fenómenos celulares que se presentan tras la activación de P2X7 por ATP, que resulta en la activación de inflamasoma y posterior maduración de citocinas proinflamatorias. Muchos trabajos en la literatura muestran la medición de IL-1 β luego de estímulos largos con altas concentraciones de ATP, pero es difícil discernir la liberación por mecanismos fisiológicos versus mecanismos asociados a la muerte celular. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue desarrollar las condiciones experimentales para evaluar la liberación de IL-1 β como un reflejo de la activación del inflamasoma sin contribución de la liberación de la citocina por la muerte celular.

MARCO TEÓRICO

El ATP se libera en el espacio extracelular en respuesta a diversos estímulos, tales como, inflamación, la lesión o la muerte de las células (Nakanishi et al. 2016). El ATP activa a una familia de receptores conocidos como P2X que funcionan principalmente como receptores tipo canales catiónicos no selectivos. Los receptores purinérgicos participan en las diversas funciones celulares tales como la reactividad vascular, la apoptosis y la secreción de citocinas. El receptor P2X7 se expresa en las células inmunes, como macrófagos y es activado por alta concentración de ATP extracelular (rango milimolar), está implicado en varios procesos relacionados con la inmunomodulación y la inflamación (Colomar et al. 2003). P2X7 regula la expresión y secreción de varias citocinas incluyendo IL-1b (Mehta et al 2014).

En los últimos años, la terapéutica de la inflamación a fijado su atención en el receptor P2X7, este receptor se caracteriza por una baja afinidad por ATP y que expresa ampliamente en varias células inmunes (macrófagos, linfocitos, y microglia). En la última década, la IL-1beta también ha surgido como un objetivo terapéutico para un número creciente de condiciones inflamatorias sistémicas y locales denominadas "enfermedades autoinflamatorias".

Aún se desconocen muchos elementos de la vía de señalización activada por P2X7, por lo cual es importante el estudio de la participación de receptores membranales y citosólicos que se activan por P2X7 y que participan en la formación del inflamasoma. Sin embargo, uno de los efectos de una estimulación prolongada de P2X7 induce la muerte celular. Muchos trabajos en la literatura muestran la medición de IL-1beta luego de estímulos largos con altas concentraciones de ATP, pero es difícil discernir la liberación por mecanismos fisiológicos versus mecanismos asociados a la muerte celular. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue desarrollar las condiciones experimentales para evaluar la liberación de IL-1beta como un reflejo de la activación del inflamasoma sin contribución de la liberación de la citocina por la muerte celular.

MARCO TEÓRICO

Condiciones de Cultivo

La línea celular de macrófagos J774 provenientes de ratón se cultivaron en medio DMEM-Advanced suplementado con 5% Suero Bovino Fetal (SBF; HyClone, Logan, Utah, USA) 10% FBS, 1% L-Glutamina y 1% Penicilina-Estreptomicina (Gipco, Grand Island, NY, USA). Esta línea celular se mantuvo bajo una atmósfera húmeda con 5% CO₂ a 37° C y en una confluencia de entre 0.5 -1x10⁶ cel/ml (60-70%) durante 24 horas en cajas de Petri posteriormente se agregó 1 ml de medio Hanks a la caja de Petri durante 5 minutos. Se retiró el medio Hanks para posteriormente agregar medio DMEM suplementado y resuspender las células en un volumen final de 2 ml en una caja de 100 mm para la técnica de Western blot.

Preparación de los tratamientos.

Después de que las células J774 alcanzaran una confluencia de 85-90%, se procedió a retirar el medio DMEM y se reizaron 4 tratamientos por duplicado, al tratamiento control se adicionaron 5 ml de solución fisiológica (NaCl 120 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, Hepes 238 mM, Ph 7.4 osmolaridad 316 mmol/kg). En los tratamientos 2, 3 y 4 se colocaron 5 ml de LPS 1µg/ml durante 4 horas a 37° C. Después de retirar la solución fisiológica y LPS, en el tratamiento 3 se agregaron 4 ml de ATP 3 mM adicionando 5 ml de solución fisiológica a los demás tratamientos durante 1 hora, respecto a el tratamiento 4, se agregaron 4 ml de ATP 3 mM+ TEA durante 1 hora. Los sobrenadantes fueron recogidos en tubos para los ensayos de lactato deshidrogenasa. En las cajas que contenían las células, se añadió el buffer de lisis diluido (50 mM Tris base, 0.25 M NaCl, 10 mM EDTA, de 0,5% NP40, 1% Triton X - 100, NaF de 4 mM, pH 7.5) con 1 x inhibidor de proteasas durante 30 minutos. Finalmente se recuperaron los lisados y fueron colocados en tubos eppendorf y congelados a -20 grados centígrados hasta su cuantificación y valoración por western blot.

Ensayo lactato deshidrogenasa (LDH)

La cuantificación de la liberación de LDH en las células se realizó mediante un kit de detección de citotoxicidad (Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH)-Roche), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de los tratamientos con LPS, ATP 1 hora, ATP 30 minutos y ATP+ TEA, se recogieron los sobrenadantes y se midió el contenido de LDH. La liberación de LDH se expresa como un porcentaje del contenido total determinado lisando una cantidad igual de células con Triton X-100 al 2%.

Western blot

Después de lisado se centrifugó a 15.000 g a 4 ° C por 15 minutos para realizar la cuantificación de proteínas por el método de BSA. Las muestras fueron reducidas por calentamiento a 95°C en buffer lammeli por 5 min. Al finalizar el calentamiento, 50 µg de proteínas fueron cargadas y separadas en geles de poliacrilamida 10%. Al terminar la electroforesis DSD-PAGE se realizó la transferencia a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubaron toda la noche a 4 ° C con anticuerpos primarios contra IL-1β (1:1000 ratón monoclonal C4, Santa Cruz, Sc-47778). Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 5 minutos con buffer de TBST de la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 5 minutos los inmunoblots fueron visualizados por quimioluminiscencia con SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer ensayo consistió en revisar si los tratamientos de interés no inducen por sí mismos la muerte celular de la línea celular J774. Se ha reportado que la estimulación prolongada con altas concentraciones de ATP en células inmunes y otros tipos celulares induce la muerte celular por mecanismos que incluyen apoptosis y necrosis (North 2002). La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) participa en el proceso de glucólisis que se lleva a cabo en el citosol celular. En condiciones control esta enzima no se libera por arriba del 10 % en comparación a un lisado total. En figura 1 mostramos los resultados de ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa. Todos los datos se normalizaron al control de lisis total que consistió en un tratamiento de las células con el detergente Triton x100 durante 1 hora. El tratamiento control y el tratamiento con LPS dio un porcentaje de liberación a al final del tratamiento de $5.4 \pm 0.56 \%$ y $6.7 \pm 0.78 \%$ respectivamente, que está de acuerdo a reportes previos (Pérez-Flores et al. 2015). El tratamiento con ATP que probamos consistió en una concentración de 3 mM, que algunas publicaciones han mostrado ser efectivas para favorecer la liberación de IL-1b (Colomar et al., 2003). Otros autores han utilizado concentraciones de hasta 5 mM, sin embargo no han mostrado resultados de muerte celular. También decidimos probar dos tiempos de exposición al ATP, una hora y media hora, ya que la muerte celular es dependiente del tiempo de exposición (North 2002). Los resultados para ATP 1 hora y ATP 0.5 hora fueron de 5.1 ± 0.83 y 6.5 ± 0.51 respectivamente, el análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos con ATP versus el tratamiento control. Por lo que podemos utilizar hasta 1 hora de exposición con 3 mM de ATP. Adicionalmente se agregó un tratamiento que incluye Tetraetilamonio (TEA) en lugar de sodio, por la posterior intención de bloquear los canales de potasio. La porcentaje de liberación en el tratamiento TEA fue de 19.8 ± 3.5 el cual es significativamente diferente al control ($p = 0.003$).

Si el receptor P2X7 es expuesto al agonista por tiempos prolongados (más de 20 minutos) se produce muerte celular (North, 2002). Los primeros eventos observados tras la activación del receptor P2X7 son una entrada masiva e iones sodio, calcio y salida de potasio, lo que despolariza la célula. Posteriormente hay un hinchamiento y cambios en el arreglo del citoesqueleto. Se desconoce de que manera contribuyen estos cambios a la muerte celular. En las células del sistema inmune, el ATP extracelular puede permeabilizar y causar lisis de timocitos por apoptosis, como lo reportaron Zheng y cols (1991).

La muerte inducida por ATP en células como microglia, macrófagos y células mesangiales es mediada por apoptosis y necrosis (Le Feuvre et al., 2002). De manera que parece haber varios mecanismos involucrados en la muerte inducida por ATP que dependen del tiempo de incubación, dosis del agonista y del tipo celular. Los datos encontrados muestran que la condición de exposición a 3 mM de ATP por una hora o treinta minutos no fueron diferentes del control. Lo que indica que la evaluación de la liberación de IL-1b bajo estas condiciones estaría mostrando una liberación independiente de la muerte celular de J774. Uno de los tratamientos evaluados que consistió en sustituir totalmente 140 mM de sodio por el catión TEA mostró una liberación de LDH significativamente más alta en comparación al control, lo que indica que este tratamiento genera daño celular. El tratamiento con TEA es importante para el bloqueo de canales de potasio, un posible elemento de la vía P2X7-Inflamasoma. El dato de muerte celular sugiere que debe modificarse la condición de sustitución total por TEA, posiblemente a través de la una mezcla sodio/TEA.

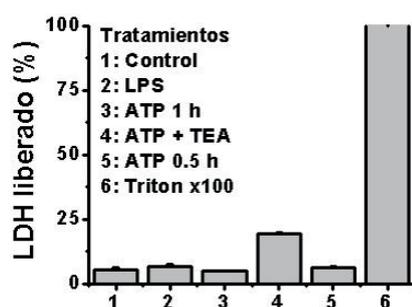


Figura 1. La liberación de LDH como un reflejo de muerte celular. En la gráfica de barras se muestra el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa a los tratamientos control, con LPS, ATP 3 Mm 1 hora, ATP+TEA 1 hora y ATP 3 Mm 30 minutos, y Triton 100x. Los datos se muestran como el promedio \pm error estandar, $n = 4$.

La IL-1b es una citocina proinflamatoria producida por macrófagos en respuesta a estímulos dañinos. La secreción de IL-1b provoca señales que da por resultado la infiltración de leucocitos pro-inflamatorios, dando lugar a una respuesta inflamatoria. La síntesis de pro-IL-1b es iniciado por activación de Toll-like receptor (TLR), como LPS. La Pro-IL-1b se escinde por caspasa-1 para generar IL-1 madura que es biológicamente activa. (Toki et al. 2015). Es de interes para el laboratorio establecer las condiciones experimentales para medir la producción y liberación de IL-1b por células J774. Se analizó la liberación de IL-1 β en respuesta a tratamientos con 3 mM de ATP por 1h, 3 mM de ATP por 0.5 h, ATP+ TEA 1h. Se muestra un imagen de la membrana tratada con un anticuerpo anti-IL-1b de ratón en la figura 2.

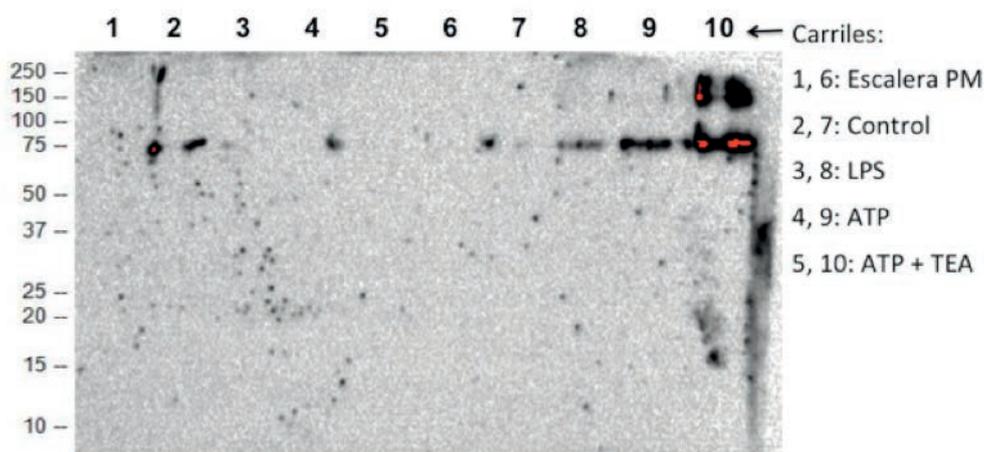


Figura 2. La producción citosólica de IL-1 β en células J774. Se muestra una imagen representativa del WB bajo las condiciones evaluadas y descritas en materiales y métodos. La lista de número de la derecha corresponde a la escalera de peso molecular en KDa. La lista de la izquierda representa la muestra con el tratamiento correspondiente que se cargo en los diferentes carriles. Se observan bandas a 75 kDa en los carriles 8-10, y se insinúa en el carril 2.

Los datos mostraron algunos carriles con bandas a un peso molecular aproximado de 75 Kda. Otros autores han mostrado que el peso molecular de IL-1 β madura e inmadura es de 17 y 34 Kda respectivamente (Colomar et al., 2003). El peso de la banda marcada en nuestros experimentos quedo muy alto en comparación a reportes previos. Adicionalmente dados los tratamientos utilizados, se esperaba una señal en todos los tratamientos utilizados en el experimento. Las razones más comunes por las que las señales de WB no se detectan se deben principalmente a la sensibilidad y especificidad del anticuerpo. En esta ocasión se utilizó una dilución de 1:1000 de anticuerpo y un tiempo de incubación de 10 horas, lo que permite evaluar diferentes condiciones como disminuir la dilución o incrementar el tiempo de incubación para intentar detectar bandas. Una cosa en contra del anticuerpo es que parece ser inespecifico al detectar una banda en peso molecular alto, cuando otros reportes no muestran bandas a ese peso molecular. En el experimento cargamos 10 microgramos de proteína total, una posibilidad que también queda abierta es que a expresión de la proteína sea baja. Una recomendación para próximos experimentos será cargar una concentración más alta de proteína en el gel de poliacrilamida. La búsqueda en la literatura también arrojó como una posible solución realizar dot blot para establecer primero las condiciones de dilución del anticuerpo para eficientizar las condiciones experimentales.

CONCLUSIÓN

En este trabajo nos interesamos en establecer las condiciones experimentales para medir IL-1 β liberada por mecanismos inflamatorios, pero no por mecanismos asociados a muerte celular. La estimulación con 3 mM de ATP durante 0.5 o 1 hora es adecuado para medir la liberación de IL-1 β por células J774. Para bloquear a los canales de potasio se recomienda hacer una mezcla de sodio/TEA. Queda por establecer las mejores condiciones experimentales para medir IL-1 β por WB, siendo lo más recomendable empezar con dot blot.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bierschenk, D.; Boucher, D. y Schroder K. Salmonella-induced inflammasome activation in humans. 2017. *Molecular Immunology* 86, 38–43.
2. Colomar, A.; Vincent Marty, V.; Médina, C.; Combe C.; Parnet, P. y Amédée, T. 2003. Maturation and Release of Interleukin-1 β by Lipopolysaccharide-primed Mouse Schwann Cells Require the Stimulation of P2X7 Receptors. *The Journal of Biological Vol.* 278, No. 33, 30732–30740.
3. Garib, F.; Rizopulu, A.; Kuchmiy, A., y Garib V. 2016. Inactivation of Inflammasomes by Pathogens Regulates Inflammation. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 81, No. 11, pp. 1326-1339.
4. Giuliani, A. L.; Sarti A. C.; Falzoni, S. y Di Virgilio F. 2017. The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Front. Pharmacol.* 8:123. doi: 10.3389/fphar.2017.00123.
5. Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K & Rothell NJ (2002). Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem* Feb 1; 277(5):3210-8.
6. Kojima, S.; Negishi, Y., Tsukimoto M.; Takenouchi T.; Kitani, H. Y Takeda. K. 2014. Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology* 321, 13–20.
7. Mehta, N.; Kaur, M.; Singh, M.; Chand, S.; Vyas B.; Silakari P.; Singh M. y Om Silakari O. 2014. Purinergic receptor P2X7: A novel target for anti-inflammatory therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 54–88

- 
8. Nakanishi, K.; Tsukimoto, M.; Tanuma, S.; Takeda, K. y Kojima S. 2016. Silica nanoparticles activate purinergic signaling via P2X7 receptor in dendritic cells, leading to production of pro-inflammatory cytokines, *Toxicology in Vitro* 35, 202–211.
 9. North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82(4): 1013-67.
 10. Pérez-Flores, G., Lévesque, S. A., Pacheco, J., Vaca, L., Lacroix, S., Pérez-Cornejo, P., & Arreola, J. (2015). The P2X7/P2X4 interaction shapes the purinergic response in murine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(3), 484-490.
 11. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, & Young JD (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112: 279-88.

MODIFICACIÓN DE LA DENTINA CON HIPOCLORITO DE SODIO AL 2.25% COMO IRRIGANTE ENDODONTICO APLICADO A DIFERENTES TIEMPOS

Omar Pérez Reséndiz¹ María Verónica Méndez González², Ana María González Amaro²

Penélope Herrera Galván y Gabriela Pérez Flores
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Rafael Curiel, C.P. 79060 Cd Valles, S.L.P., MÉXICO;
penelope.herrera2@outlook.com
gabriela.perez@uaslp.mx

RESUMEN

El tratamiento endodóntico pretende eliminar todo el contenido del sistema de conductos, para esto es importante la instrumentación pero la irrigación es un factor importante para lograrlo. El hipoclorito de sodio es el irrigante más utilizado y a pesar de no cumplir todos los parámetros de irrigante ideal, este ha funcionado, es por eso que observamos la modificación que este provoca en la dentina evaluando la limpieza y daño provocado. Para el proceso fueron seleccionados raíces dentales unirradiculares con ciertas especificaciones formando 4 grupos, realizamos el tratamiento de conductos aplicando hipoclorito de sodio al 2.25% y a cada grupo se aplicó un tiempo diferente, la evaluación fue realizada con imágenes capturadas en el Microscopio Electrónico de Barrido. Es necesario hacer evaluar el procedimiento de la endodoncia para saber la calidad del tratamiento.

ABSTRACT

The endodontic treatment aims to eliminate all the contents of the duct system, for this the instrumentation is important, but irrigation is an important factor to achieve this. Sodium hypochlorite is the most used irrigant and despite not meeting all parameters of ideal irrigant, this has worked, that is why we observe the modification that causes in the dentine evaluating the cleaning and damage caused. For the process, unirradicular dental roots were selected with certain specifications, forming 4 groups, conducting the treatment of sodium hypochlorite with 2.25% and each group applied a different time, the evaluation was done with images captured in the Scanning Electron Microscope. It is necessary to have the endodontic procedure evaluated to know the quality of the treatment.

Palabras clave: Sodium hypochlorite, Scanning Electron Microscope, endodontic treatment.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de la endodoncia pretende la eliminación completa y cuidadosa de las bacterias, tejido remanente pulpar y barrillo dentinario del sistema de conductos provocado por la instrumentación. Esta es considerada la principal maniobra del tratamiento pero la irrigación es considerada el auxiliar decisivo para el éxito del tratamiento endodóntico (1, 5).

El instrumental para endodoncia con el cual realizamos el desbridamiento del contenido del conducto radicular no puede hacer contacto con toda la superficie, para esto es imprescindible el uso del irrigante (5). Para este proceso contamos con el hipoclorito de sodio que es el más utilizado en endodoncia, a diferentes concentraciones, pero este no cumple los requisitos (2).

Canalda y Rodríguez-Ponce mencionan que la irrigación durante el tratamiento de conductos tiene los siguientes objetivos básicos:

Arrastrar el contenido del conducto.

Disolver restos pulpaes vitales o necróticos.

Limpiar las paredes de los conductos para eliminar los residuos que las cubren y que taponean la entrada de los túbulos dentinarios y conductos accesorios.

Destruir las bacterias y neutralizar sus productos y componentes antigénicos.

Lubricar los instrumentos para facilitar su paso y su capacidad de corte.

Prevenir el oscurecimiento de la corona (5).

Para obtener un tratamiento favorable debemos usar un irrigante con las siguientes propiedades: solvente de tejidos o residuos orgánicos, tener baja toxicidad, baja tensión superficial, ser lubricante, realizar por lo menos desinfección, ser capaz de eliminar el barrillo dentinario y otros factores que se relacionan con la utilidad del irrigante e incluyen disponibilidad, costo moderado, conveniencia, tiempo de vida adecuado en almacén y fácil almacenaje. Un requisito adicional es que el químico no debe neutralizarse con facilidad en el conducto para conservar su eficacia. Sin embargo, no existe una solución irrigadora ideal, por lo que se debe combinar dos o más para conseguir las propiedades y objetivos mencionados (5).

Por eso tenemos como objetivo observar que tiempo de aplicación del hipoclorito de sodio al 2.25% muestra mejores resultados en el tratamiento endodóntico.

METODOLOGIA

Se recolectaron dientes unirradiculares (incisivos, caninos y premolares) con un conducto radicular recto, fueron llevados al Laboratorio de la Maestría de Endodoncia de la Facultad de Estomatología de la UASLP para descoronarse (con un disco diamante) obteniendo muestras radiculares de una longitud de 15 centímetros teniendo como limite la Unión Amelocementaria.

Las muestras se llevaron a un recipiente (con solución salina) para lavarse en el ultrasonido (4 minutos por ciclo) las veces necesarias hasta obtener el agua limpia. Las raíces fueron aleatorizadas en una página web (PINETOOLS) obteniendo 4 grupos de 8 dientes: el grupo A; manejó un tiempo de 30 segundos, el grupo B de 1 minuto, el grupo C de 2 ½ minutos y el grupo D a 5 minutos, cada irrigación tubo un volumen de 2 ml de hipoclorito de sodio al 2.25% .

El proceso fue la toma de la conductometría con lima 15 de 21 mm de las limas K FlexoFile, se inició la instrumentación con esta lima con 5 movimientos de intrusión y tracción siguiendo las manecillas del reloj, se irriga (con una aguja Endo-Eze) y continua con la siguiente lima hasta llegar a la lima 30 y termina la conformación del tercio apical. Con la lima 35 se inicia la técnica de retroceso y conformación del tercio medio y cervical del conducto radicular, se instrumenta y recapitula con una lima 25 y se irriga hasta llegar a la lima 50, al final se alisan las paredes con una lima Hedstrom 30 de 21 mm a conductometría.

Las raíces se cortaron longitudinalmente y deshidrataron para ser observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido del Instituto de Metalurgia de la UASLP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron dos evaluaciones, una para la observar cuantos tubulillos dentinarios abiertos se encontraron con los tiempos de irrigación y la otra evaluación para comparar las grietas provocadas por los diferentes tiempos ambos registros se llevaron a cabo con imágenes del Microscopio Electrónico de Barrido a 1000x, cada una tomadas a 1 y 3 milímetros del foramen apical.

Dentro de la evaluación de tubulillos dentinarios abiertos encontramos que no hubo diferencia entre los tiempos a evaluar, además casi la totalidad marcaron 0% de tabulillos abiertos.

En la valoración de grietas mostraron menor número a 1 mm del foramen apical, probablemente el irrigante no llego a esa área, y las muestras más dañadas fueron a las que se les aplico el hipoclorito de sodio por 5 minutos.

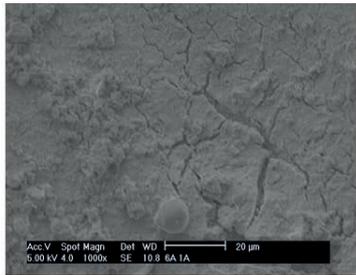


Fig. 1 Se muestra una imagen a 1000x a 1 mm del foramen apical sin tubulillos dentinarios visibles y grietas de diferentes tamaños fue aplicado hipoclorito de sodio por 30 segundos.

Fig. 2 Se muestra una imagen a 1000x a 3 mm del foramen apical con tubulillos dentinarios visibles pero con barrillo dentinario y sin grietas, se le aplico hipoclorito por 2 minutos y medio.

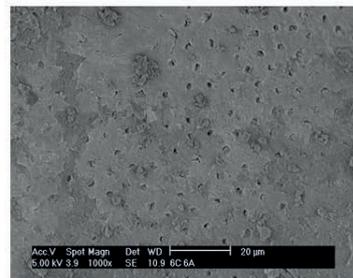


Fig. 3 Se muestra una imagen a 1000x a 3 mm del foramen apical sin tubulillos dentinarios visibles, grietas y fragmentos de dentina, se le aplico hipoclorito por 5 minutos.

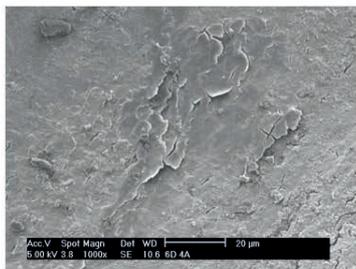
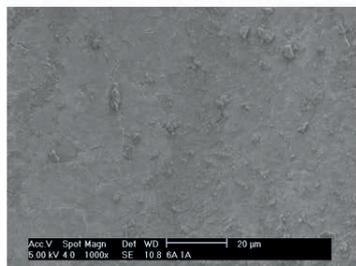


Fig. 4 Se muestra una imagen a 1000x a 3 mm del foramen apical sin tubulillos dentinarios visibles, grietas pequeñas fue aplicado hipoclorito por 5 minutos.



CONCLUSIONES

Se recomienda la aplicación de varias sustancias para la irrigación como se describe en la literatura, además de evaluar cada proceso del tratamiento de conductos para observar cuál de estos se puede mejorar. No se encontró como tal un tiempo recomendable para la aplicación de hipoclorito a pesar de que se menciona que con mayor tiempo de aplicación tiene mejores beneficios.

No se observaron diferencias de limpieza entre el uso de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos entre cada grupo, pero se puede mejorar la técnica para tener éxito en el tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

DEBBIE T.S. WONG, GARY S.P. CHEUNG. (2013) Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules, *Journal of Endodontics*, 1-5.

JAMES K.T. CULLEN, JAMES A. WEALLEANS, TIMOTHY C. KIRKPATRICK, JOHN M. YACCINO. (2015), The Effect of 8.25% Sodium Hypochlorite on Dental Pulp Dissolution and Dentin Flexural Strength and Modulus, *Journal of Endodontics*, 1-5.

GEORGE G. STEWART (1998), A Scanning Electron Microscopic Study of the Cleansing Effectiveness of Three Irrigating Modalities on the Tubular Structure of Dentin, *Journal of Endodontics* 24, 485-486

IRIS SLUTZKY-GOLDBERG, AIHAM HANUT, SHLOMO MATALON, VALERY BAEV, HAGAY SLUTZKY (2013), The Effect of Dentin on the Pulp Tissue Dissolution Capacity of Sodium Hypochlorite and Calcium Hydroxide, *Journal of Endodontics*, 39, 980-983.

MARIA TERESA ARIAS-MOLIZ, ANA MORAGO, RONALD ORDINOLA-ZAPATA, CARMEN MARÍA FERRER LUQUE, MATILDE RUIZ-LINARES, PILAR BACA (2016), Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid, *Journal of Endodontics*, 1-5.

INVESTIGACIÓN-ACCIÓN PARTICIPATIVA PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL ENTORNO SOCIO-AMBIENTAL DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN VILLA DE REYES, SAN LUIS POTOSÍ

Mitzi Montserrat Castillo Hernandez¹; Hernández-Ibarra, Luis Eduardo², Y; Zacarías, Juan Manuel².

RESUMEN

Objetivos: Definir y caracterizar el entorno social de la ERC en la cabecera municipal de Villa de Reyes, S.L.P. **Materiales y métodos:** El presente estudio es de corte cualitativo y participativo desde la mirada de los que padecen ERC y sus cuidadores que por medio de técnicas de investigación como entrevistas, talleres grupales enfocados en mapeos colectivos y relatos cartográficos permiten conocer el entorno social de la ERC. **Resultados:** El grupo de edad encontrado fue entre los 23 a 69 años, siendo la mayoría jóvenes con diagnóstico de ERC. Los participantes perciben su ambiente como riesgoso y existen factores sociales y ambientales detectados por los participantes que apuntan a desigualdades sociales al momento de recibir atención sanitaria.

ABSTRACT

Objective: Define and characterize the social environment regarding the CKD in the municipality of Villa de Reyes, S.L.P. **Materials and methods:** The present study is qualitative and participatory, from the perspective of those with CKD and their caregivers. Through research techniques such as interviews, group workshops focused on collective mapping and cartographic reports, the social environment of the ERC. **Results:** The age group found was between 23 and 69 years old, being the majority young adults with diagnosis of CKD. The participants perceive their environment as risky and there are social and environmental factors detected by the participants that point to social inequalities at the moment of receiving health care.

Palabras clave: Enfermedad Renal Crónica; Investigación-acción participativa; México.

INTRODUCCIÓN

Cerca del 10% de la población mundial es afectada por la Enfermedad Renal Crónica ya que es progresiva y silenciosa, lo que dificulta un diagnóstico precoz que permita en etapas tempranas abordarla, sumado a esto, los servicios de salud son deficientes y los especialistas no están disponibles por la gran cantidad de demanda en la atención (OPS/OMS, 2015).

En México el problema es cada vez mayor, según la carga de la enfermedad entre los años 1990-2010, la Enfermedad Renal Crónica junto con la diabetes mellitus son causas de discapacidad, muerte prematura y una de las principales causas de muerte en el país. Cifras revelan que la Enfermedad Renal Crónica aumento cerca de un 400% entre los años 1990-2010, por lo que se considera una emergencia de salud en el país con mayor carga, afectando en edades muy tempranas (Lozano, et al., 2013).

Según datos de INEGI, se registraron en 215 defunciones en el estado de San Luis Potosí por insuficiencia renal ocupando el lugar número 11 en mortalidad a nivel estatal, afectando a casi a todos los grupos de edad siendo el menor de 5-14 años. (INEGI, 2015). Existe evidencia en el estado que niños de Villa de Reyes tienen probabilidad de lesión renal aumentando potencialmente su susceptibilidad a enfermedades renales, debido a la presencia arsénico y cromo presentes en el agua del municipio, por lo que es un sitio interesante para estudiar, debido a la creciente incidencia de casos de Enfermedad Renal Crónica. (Cárdenas-González, y otros, 2016).

Teniendo en cuenta la constante creciente de la carga de la Enfermedad Renal Crónica a nivel nacional, así como los problemas que aquejan a niños, jóvenes y adultos afectados (Mercado-Martínez & Hernández-Ibarra, 2016), es importante realizar investigaciones que denoten el problema para poder profundizar desde una mirada vivencial de los quienes la padecen al igual que de las personas que los rodean, para que de esta manera definir y caracterizar los impactos del el problema en Villa de Reyes y consecutivamente identificar oportunidades, debilidades y fortalezas que permitan el mejoramiento de su entorno. Con ayuda de la investigación-acción participativa y un mapeo colectivo como herramienta de representación del entorno espacial, facilita al participante identificar su entorno así como describir sus características, que gracias a estos recursos ayuda a visualizar las problemáticas y otros objetivos con el fin de colaborar en la construcción del entorno y reflexión del mismo.

METODOLOGÍA

En este estudio se realizó una investigación-acción participativa que consiste en una serie de narrativas por parte de los habitantes de la comunidad de Villa de Reyes, las cuales permiten la comprensión y elaboración de un mapa colectivo que registra sus conocimientos y experiencias cotidianas para visibilizar las problemá-

ticas en el municipio y de esta forma ayude a impulsar y facilite el abordaje de esos problemas que pueden ser determinantes en la Enfermedad Renal Crónica. El elemento principal de participación es el individuo de la comunidad, en él se sientan las bases de la investigación y por medio de sus conocimientos se construye el escenario donde se desenvuelven las personas con enfermedad renal crónica.

Durante el Verano de la Ciencia, se colaboró en la realización del Mapeo Colectivo en el municipio de Villa de Reyes en el estado de San Luis Potosí, que consta de representaciones gráficas y visuales del territorio producto de diversas opiniones y conocimientos compartidos, en este caso, en base a la Enfermedad Renal Crónica. Se seleccionaron los individuos por conveniencia, se les explicó el objetivo del estudio y se acordó hora y lugar para llevar a cabo la entrevista, un cuestionario y la realización del Mapa colectivo de forma individual. Para incitar la participación, se realizaron unas series de preguntas como: “¿Considera que hay zonas de riesgo para su salud en su comunidad?”, “¿Considera que hay lugares contaminados en su comunidad?”, “¿De dónde obtiene el agua que usa para beber y para uso doméstico?” y posteriormente los participantes comentaban al respecto; todo esto fue capturado en notas de campo y grabadoras para evitar la pérdida de información. Nos apegamos a las normas para la realización de investigación en seres humanos, se respetó siempre la confidencialidad, anonimato y autodeterminación de los participantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

El grupo de edad de los encuestados, se encontró entre los 23 a 69 años, en su mayoría de sexo masculino. El tipo de Seguridad Social a la cual estaban afiliados fue al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Su diagnóstico fue realizado entre 18 y 3 años atrás, y dos personas entrevistadas fueron diagnosticadas con cáncer. De los enfermos renales crónicos, todos llevaban algún tipo de tratamiento de remplazo renal como Diálisis, únicamente dos personas fueron trasplantadas, sin embargo seguían bajo medicación.

Diferentes aspectos fueron resaltados por los sujetos que participaron en el estudio. Posibles causas como la contaminación por la actividad industrial y agropecuaria de la zona, así como el consumo de aguas termales con altos índices de minerales. Todo ello desde la percepción de quienes radican en dicho municipio. El costo del tiempo y dinero invertidos para poder recibir atención en salud es uno de los factores que orilla a las personas a utilizar formas de intercambio y reciprocidad subalternos o informales. Existen factores sociales y ambientales detectados y consensados por los participantes que apuntan a desigualdades sociales al momento de recibir atención sanitaria con equidad. De las personas entrevistadas, reportan sitios industriales como la Central Termoeléctrica Villa de Reyes y Productora Nacional de Papel Destintado, S.A. de C.V. (PRONAPADE), ahora llamada Productora Nacional de Papel, S.A. de C.V. (PRONAL) como zonas de riesgo para su Salud, debido a las diferentes emisiones por parte de Termoeléctrica y malos olores por parte de PRONAL.

Existe poca evidencia en México de investigación-acción participativa también conocida como investigación-acción basado en la comunidad, únicamente (Ríos-Cortázar V. , Gasca-García, R Ordóñez, Eugenia Vera, Franco-Martínez, & Tolentino-Mayo, 2013), reportan esta metodología, por lo que es importante ampliar el campo en esta área con enfoque cualitativo. Sin embargo, la investigación acción participativa realizada en Enfermedades Crónicas en otras partes del mundo, resultó que las estrategias usadas no terminan por ser consistentes y los resultados carecen de sentido al no entablar comunicación entre los participantes y el investigador (van Staa, Jedeloo, Latour, & Trappenburg, 2009;) direccionan los objetivo en términos cuantitativos sin profundizar verdaderamente en las experiencias y conocimientos de sus entrevistados, por lo que es importante afinar el método donde la comunidad relacionada debe ser parte para poder comprender en primera persona lo que estamos buscando. Es necesario realizar más estudios de corte cualitativo y participativo para conocer lo que viven, hacen y les interesa a las personas afectadas por una enfermedad que es considerada hoy en día una emergencia social. Sólo con la inclusión de los principales actores se podrán proponer alternativas realistas y coherentes con las necesidades de esta población.

Una parte muy importante es que los entrevistados perciben su ambiente como riesgoso, ya que sitios industriales como PRONAPADE y PRONAL, en la mayoría de las entrevistas fueron mencionados como amenazas. El factor ambiental juega un papel importante en la Salud, ya que cerca del 24% de la carga mundial de morbilidad y un 23% de mortalidad se atribuyen a factores ambientales, como también podrían serlo el agua y productos químicos que puedan estar presentes y en contacto con los individuos. (OMS, 2017)

De acuerdo a los resultados encontrados en otros artículos se ha reportado que se han generado o mejorado estrategias que surgen por parte de los participantes para la resolución del problema estudiado, (Koch, Jenkin, & Jenkin, 2004; Pazoki, Nabipour, Seyednezami, & Imami, 2007), por lo que es importante el seguimiento de la Comunidad para incitar a los participantes, a partir de la caracterización de su entorno, el mejoramiento de esté.

CONCLUSIONES

La situación de Enfermedad Renal Crónica en el municipio de Villa de Reyes, es un hecho alarmante, por lo encontrado hasta el momento, cada vez son más jóvenes quienes son diagnosticados con esta enfermedad, con miras al futuro es una enfermedad no costeable que devasta no solo al enfermo renal crónico si no a su familia y entorno. El municipio estudiado es un sitio potencial para poder abrir la investigación ya que son muchos los casos que nos encontramos con Enfermedad Renal Crónica y lamentablemente muchos de ellos han ter-

minado en la muerte. Considerando lo encontrado en tan poco tiempo, sería de gran ayuda dirigir esfuerzos para ayudar a encontrar causas o factores que puedan estar afectando la salud de la población, donde las aportaciones benefician no solo a nivel municipal ni estatal si no internacional ya que es un problema global, que requiere atención y recursos para su investigación sin descuidar que tanto el ambiente como la forma de interactuar con este por parte de los individuos es esencial para comprender el problema.

REFERENCIAS

- Borges Dias, R. (1998). "Eu? Eu estou aí, comendo o mundo." Uma experiência de controle de endemia, pesquisa e participação popular vivida em Cansanção, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 14(2), 9.
- Cárdenas-González, M., Osorio-Yáñez, C., Gaspar-Ramírez, O., Pavkovic, M., Ochoa-Martínez, A., López-Ventura, D., y otros. (2016). Environmental exposure to arsenic and chromium in children is associated with kidney injury molecule-1. Elsevier Inc, 11.
- INEGI. (2015). www.inegi.org.mx. Recuperado el 8 de Julio de 2017, de <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
- Jenkins, C., Pope, C., Magwood, G., Vandemark, L., Thomas, V., Linnen, F., y otros. (2010). Expanding the Chronic Care Framework to Improve Diabetes Management: The reach case study. The Johns Hopkins University Press, 16.
- Koch, T., Jenkin, P., & Jenkin, D. (2004). Chronic illness self-management: locating the 'self'. *Journal of Advanced Nursing*, 48(5), 9.
- Koch, T., Kralik, D., & Taylor, J. (2000). Men living with diabetes: minimizing the intrusiveness. *Journal of Clinical Nursing*, 8.
- Lozano Ascencio, R., Lozano Ascencio, H., Pelcastre Villafuerte, B. E., Ruelas González, M. G., César Montañez, J., César Campuzano, J., y otros. (2013). Carga de la Enfermedad en México 1990-2010: Nuevos resultados y desafíos. México, D.F.: CNEGSR.
- Lozano, R., Gómez-Dantés, H., Garrido-Latorre, F., Jiménez-Corona, A., Campuzano-Rincón, J. C., Franco-Marina, F., y otros. (2013). La carga de enfermedad, lesiones, factores de riesgo y desafíos para el sistema de salud en México. *Salud Pública de México*, 55(6), 15.
- MacCluer, J. W., Scavini, M., Shah, V. O., Cole, S. A., Laston, S., Voruganti, S., y otros. (s.f.). Heritability of Measures of Kidney Disease Among Zuni Indians: The Zuni Kidney Project.
- Mercado-Martínez, F., & Hernández-Ibarra, E. (2016). Crónica de la enfermedad renal Voces que viven y escuchan el padecimiento. Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Minore, B., Boone, M., Katt, M., Kinch, P., & Birch, S. (2004). Addressing the realities of health care in northern aboriginal communities through participatory action research. *Journal of Interprofessional Care*, 18(4), 9.
- OMS. (2017). Departamento de Salud Pública, Medio Ambiente y Determinantes Sociales de la Salud. Obtenido de http://www.who.int/phe/about_us/es/
- OPS/OMS. (10 de Marzo de 2015). La OPS/OMS y la Sociedad Latinoamericana de Nefrología llaman a prevenir la enfermedad renal y a mejorar el acceso al tratamiento. Recuperado el 18 de Junio de 2017, de www.paho.org: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10542%3A2015-opsoms-sociedad-latinoamericana-nefrologia-enfermedad-renal-mejorar-tratamiento&Itemid=1926&lang=es
- Pazoki, R., Nabipour, I., Seyednezami, N., & Imami, S. (2007). Effects of a community-based healthy heart program on increasing healthy women's physical activity: a randomized controlled trial guided by Community-based Participatory Research (CBPR). *BMC Public Health*, 8.
- Ríos-Cortázar, V., Gasca-García, A., Franco-Martínez, M., & Tolentino-Mayo, L. (2014). Narrativa infantil en entornos escolares. Una estrategia de promoción de la salud. *Salud Pública de México*, 56(2), 9.
- Ríos-Cortázar, V., Gasca-García, A., R. Ordóñez, A., Eugenia Vera, M., Franco-Martínez, M., & Tolentino-Mayo, L. (2013). Reducción de la obesidad infantil a través del componente de nutrición de una iniciativa de Escuela Promotora de Salud. *Salud Pública de México*, 55(3), 3.
- Van Staa, A., Jedeloo, S., Latour, J. M., & Trappenburg, M. J. (2009). Exciting but exhausting: experiences with participatory research with chronically ill adolescents. *Health Expectations*, 13, 13.

HONGOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS ¿CÓMO IDENTIFICARLOS RÁPIDAMENTE EN INFECCIONES HOSPITALARIAS?

Luna Mena, M , Hernández Carreón, J.O.A y Castaño Navarro, I.B. 2

RESUMEN

Los métodos fenotípicos para identificar diferentes especies de *Candida* pueden requerir hasta 72 horas, lo cual retrasa la administración oportuna de un tratamiento efectivo. En este trabajo validamos la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el uso de los oligonucleótidos especie-específicos Ca2, Ct3, Cp1, Cg1 como método rápido y certero en la identificación de las cuatro especies más prevalentes. Para ello amplificamos DNA extraído de 62 aislados clínicos y encontramos que pudimos identificar correctamente todos los aislados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* con los primers Ca2, Ct3, Cg1. Con Cp1 no pudimos amplificar el fragmento de un aislado y es necesario secuenciar su rDNA ya que posiblemente se trate de *Candida orthopsilosis* o *Candida metapsilosis*.

Palabras clave: *Candida*, identificación, PCR.

ABSTRACT

Morphological tests to identify different *Candida* species take up to 72 hrs, which delays the timely administration of an effective treatment. In this work, we validated the Polymerase Chain Reaction (PCR) method using a set of species-specific oligonucleotides Ca2, Ct3, Cp1, and Cg1 to amplify species-specific DNA fragments to accurately and rapidly identify the four most common species. We amplified DNA extracts from 62 clinical isolates and found that we could correctly identify all the *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* isolates with Ca2, Ct3 and Cg1. With Cp1 we could not amplify the specific fragment from one isolate. We will sequence the rDNA from this isolate since it is possible that it is *Candida orthopsilosis* or *Candida metapsilosis*.

Key words: *Candida*, identification, PCR.

INTRODUCCIÓN

El actual ascenso en el número de personas inmunocomprometidas, ha traído consigo un aumento sustancial en el número de personas que contraen infecciones por hongos que generalmente no son patógenos, como es el caso de varias especies del género *Candida* (Yapar, N, 2014), un microorganismo que forma parte de la flora habitual (Sardi, et al, 2013).

La micosis causada por este patógeno, denominada *Candidiasis*, es caracterizada por presentar un amplio espectro de variedades clínicas, como lo son la mucocutánea, cutánea, sistémica y alérgica (Bonifaz, 2015); es decir, es capaz de ser causante desde una infección superficial hasta una diseminada, y puede llegar a afectar cualquier sitio anatómico. Sin embargo, las *candidiasis* sistémicas, entre ellas la *Candidemia* resultan ser muy graves, puesto esta se ha asociado a un alto índice de mortalidad, que va desde el 30 hasta el 80% (Chang et al, 2008). Ante ello la rápida instauración del tratamiento se vuelve crucial en la vida del paciente.

Actualmente *C. albicans*, se ha reportado como la especie más prevalente en los casos de *Candidemia* al tener una incidencia del 46%, sin embargo, las especies no *albicans* están aumentando considerablemente. Por ejemplo en México se ha reportado en segundo lugar a *C. tropicalis* con un 26%, seguida por *C. glabrata* 13.5%, *C. parapsilosis* 5% y *C. krusei* 5% (Corzo-León et al, 2014).

No obstante, el tratamiento a emplear con el fin de erradicar las infecciones causadas por estas especies debe ser diferente, puesto ya es conocido la existencia de diferentes perfiles de susceptibilidad ante los antifúngicos. Como es el caso de la resistencia intrínseca que presenta *C. glabrata* y *C. krusei* al fluconazol, *C. parapsilosis* a las equinocandinas y la resistencia secundaria a la anfotericina B en *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (Alastruey et al, 2014).

Por lo que, para lograr un tratamiento efectivo se requiere la identificación de la especie. Desafortunadamente, los métodos que son generalmente empleados en los laboratorios con este propósito se basan en el crecimiento de estas en medios diferenciales, auxonogramas comerciales y equipo automatizado como el Vitek 2 que pueden requerir desde 18.5 horas para este último o hasta 72 horas para los primeros (Bonifaz, 2015), lo que conlleva un retraso en la instauración de un tratamiento efectivo en tiempo oportuno. Además, estos métodos no son 100% precisos en la identificación de cada especie. Sin embargo, existen también métodos moleculares que son más rápidos y precisos que se describen a continuación

Las secuencias altamente conservadas de genes ribosomales (rDNA), que contienen genes de rRNA 5,8S, 18S y 28S, así como las regiones ITS 1, ITS 2 (internal transcribed spacer), ya han sido documentados para la amplificación y la secuenciación, que permiten discriminar sin ambigüedad entre las levaduras médicamente importantes (Chen et al, 2000). Por lo que a partir de estos hechos se han desarrollado oligonucleótidos como

los ITS1 e ITS4, entre otras técnicas moleculares. Así mismo, en el Laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT se encontraron secuencias específicas (únicas) de cada una de las cuatro especies más comunes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) y se desarrollaron oligonucleótidos especie-específicos a los cuales designó como Ca2, Ct3, Cp1, Cg1 que identifican a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* respectivamente.

Este trabajo tuvo como objetivo realizar la validación de la PCR con el uso de los primers Ca2, Ct3, Cp1, Cg1, como método de identificación certero y rápido de las cuatro especies más prevalentes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, a partir de aislados clínicos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Aislados clínicos.

Se analizaron un total de 62 aislados clínicos, previamente identificados con Vitek 2 por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INMNSZ). Se purificaron mediante estriado en cajas Petri con medio YPD sólido a 30°C durante 24 horas, posteriormente se tomó una colonia y se resembró uniformemente sobre toda la superficie de YPD durante 24 h a 30°, los inóculos obtenidos fueron almacenados a -80°C con 10% glicerol para la posterior extracción de ADN.

Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN, las muestras almacenadas se inocularon en medio YPD líquido con agitación continua a 30°C por aproximadamente 12 hrs, posteriormente se colocó 1 mL de cultivo y se centrifugó en microtubos eppendorf, para proseguir con la extracción según el protocolo descrito por Frederick M Ausubel et al 2001 modificado.

PCR

De cada extracción de DNA genómico obtenido se realizó PCR con los primers identificados por el laboratorio como Ca2, Ct1, Cp1, Cg2 en un volumen final de 30 µL utilizando 0.5 µL de DNA. Las condiciones utilizadas fueron 30 ciclos con temperaturas y tiempo específicas para cada primer (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en cada etapa.

| | Ca2 | Ct3 | Cp1 | Cg1 |
|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Ciclo inicial | 94° C x 1 min. | 94° C x 1 min. | 94° C x 1 min. | 94° C x 1 min. |
| Desnaturalización | 94° C x 15 seg. | 94° C x 15 seg. | 94° C x 15 seg. | 94° C x 15 seg. |
| Alineamiento | 67.6°C x 20 seg. | 60.1°C x 20 seg. | 62°C x 20 seg. | 59°C x 20 seg. |
| Extensión | 72°C x 15 seg. | 72°C x 15 seg. | 72°C x 20 seg. | 72°C x 10 seg. |

Electroforesis en gel de agarosa

Cada producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, con una corrida de 50 min a 100 volts. Utilizamos 10 de µL de la reacción y posteriormente teñimos el gel con bromuro de etidio (0,5 µg/ mL) y visualizamos las bandas bajo luz UV en un fotodocumentador. Como controles positivos utilizamos cepas ATCC, para *Candida albicans* ATCC MYA2876, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida tropicalis* ATCC 750.

RESULTADOS.

Logramos identificar mediante el método molecular un total de 49 aislados de las 62 muestras, con los siguientes resultados: *Candida albicans* (45.16%, n= 28) Figura 1, *Candida glabrata* (17.74%, n=11), *Candida parapsilosis* (4.83%, n= 3), *Candida tropicalis* (11.29%, n= 7), las cuales concordaron con el diagnóstico proporcionado por el hospital utilizando el equipo Vitek. Sin embargo, una muestra no logramos identificarla con los 4 juegos de primers, pero si por el equipo Vitek 2 como *Candida parapsilosis*. Los otros aislados no detectadas molecularmente correspondieron a especies para las cuales no se tienen primers especie-específicos: *Candida guilliermondii* (1.61%, n=1), *Candida intermedia* (1.61%, n=1), *Candida kefyr* (8.06%, n=5), *Candida krusei* (8.06%, n=5). Figura 2.



Figura 1. Identificación molecular de *C. albicans* mediante los oligonucleótidos Ca2.

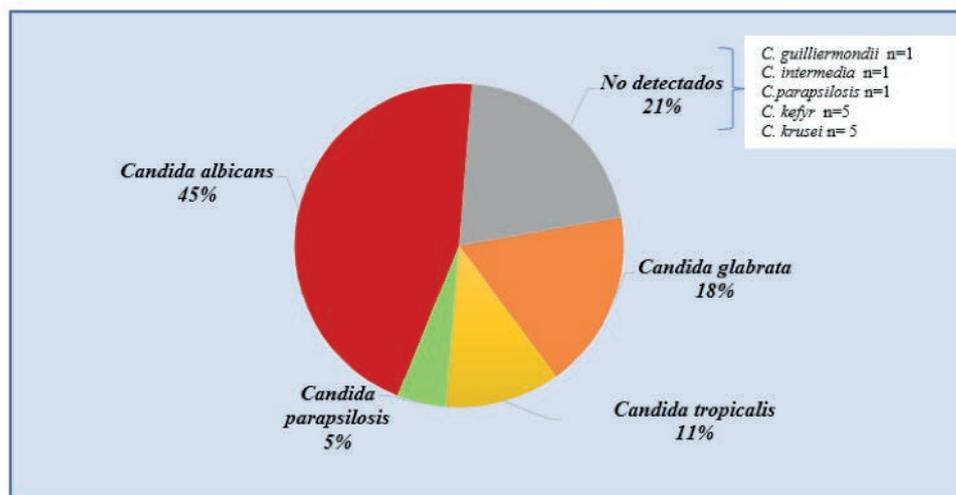


Figura 1. Resultados obtenidos de la PCR como método de identificación de las especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

La identificación de las especies se obtuvo en un tiempo aproximado de 2 horas 30 min a partir de los aislados clínicos, por lo que es un método de diagnóstico rápido a diferencia del método API-ID32C, el cual es generalmente utilizado en los laboratorios de microbiología para la identificación de las especies del género *Candida*, este método puede requerir de 48 a 72 horas a partir de la inoculación de cepas aisladas ya que se basa en pruebas de asimilación de diferentes carbohidratos.

Al obtener una detección certera con la utilización de los primers Ca2, Ct1 y Cg1, se debe considerar la realización de su uso futuro directamente de hemocultivos. Actualmente se utiliza el sistema Vitek 2 en muestras de hemocultivos para la identificación. El sistema de identificación Vitek2 consiste en 47 pruebas bioquímicas fluorescentes en las tarjetas YST, pero el tiempo promedio de identificación es de 18.25 h (Ochiuzzi et al, 2014).

Aunado a esto, es importante señalar, que el equipo Vitek 2 no es capaz de diferenciar entre las especies *C. parapsilosis* sensu stricto: *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*. Antiguamente se consideraban a estas tres especies como parte del complejo *Candida parapsilosis*, sin embargo, en el 2005 Tavanti y colaboradores tras comparar la secuencia del ITS1 encontraron que la distancia filogenética que separaba a *Candida dubliniensis* de *Candida albicans* es la misma que separaba las tres especies de *C. parapsilosis*. Es así que, existe una alta posibilidad de la muestra no detectada con los primers Cp1, corresponda a *Candida orthopsilosis* o a *Candida metapsilosis*, por ello se propone secuenciar la región ITS de esta muestra.

Finalmente, la obtención de los productos de la PCR con los primers Ca2, Ct1, Cp1, Cg1 se observan como bandas bien definidas de pesos moleculares diferente para cada especie, lo que supone ser una ventaja a diferencia de los cebadores ITS3 e ITS4, ya que la utilización de estos solo permite identificar las levaduras a nivel de género debido a que los fragmentos obtenidos con PCR son similares entre ellos y el rango de variabilidad se cruza entre una lectura y otra. (Ramírez 2008) Por otra parte, Ayatollahi y colaboradores (2007) con el uso de los primers ITS3 e ITS4 y la enzima MspI como enzima de restricción para la digestión de esta región, pudieron identificar las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Sin embargo, la PCR con los primer Ca2, Ct3, Cp1, Cg1 al ser específicos no requiere el uso posterior de enzimas de restricción, lo cual, a su vez permite dar una identificación en un tiempo menor.

Así mismo, las otras técnicas documentadas como lo es Taq Man utiliza cebadores de oligonucleótidos y conjuntos de sondas a partir de la región ITS2, los resultados son favorables al tener una especificidad del 100% (Guive et al, 2001), en esta metodología las especies pueden diferenciarse dentro del multiplex mediante el uso de tres colorantes fluorescentes, lo cual implica un costo mayor que la PCR convencional.

CONCLUSIONES

Los primers del Laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT son altamente específicos en la identificación de las especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Aunque es necesario secuenciar la muestra no detectada por el primer Cp1, con el fin de descartar un posible falso negativo (1 de 62 muestras o 1.6%). Aunado a esto el diagnóstico molecular con estos primers tiene un bajo costo a diferencia de otros métodos moleculares ya descritos. Finalmente, al ser un método más rápido que la identificación fenotípica puede permitir la administración de un tratamiento efectivo en tiempo menor, lo que puede conllevar a una rápida recuperación del paciente y a su vez a un ahorro substancial en gastos médicos.

BIBLIOGRAFIA

- ALASTRUEY-I, A., MELHEM, M. S. C., BONFIETTI, L. X., & RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. (2015). Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(Suppl 19), 57–64. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700011>.
- BONIFAZ, A. (2015). *Micología médica básica*. Mexico: Mc Graw Hill.
- CHANG, A., NEOFYTOS, D., & HORN, D. (2008). Candidemia in the 21st century. *Future Microbiology*, 4(4), 463
- CHEN, Y. C., EISNER, J. D., KATTAR, M. M., RASSOULIAN-BARRETT, S. L., LAFE, K., YARFITZ, S. L. COOKSON, B. T. (2000). Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2302–2310.
- CORZO-LEON, D. E., ALVARADO-MATUTE, T., COLOMBO, A. L., CORNEJO-JUAREZ, P., CORTES, J., ECHEVARRIA, J. I., SIFUENTES-OSORNIO, J. (2014). Surveillance of *Candida* spp Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. *PLoS ONE*, 9(5), e97325. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097325>
- GUIVER, M., LEVI, K., & OPPENHEIM, B. (2001). Rapid identification of candida species by TaqMan PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 362–366. <http://doi.org/10.1136/jcp.54.5.362>
- FOTHERGILL, A. W., SUTTON, D. A., MCCARTHY, D. I., & WIEDERHOLD, N. P. (2014). Impact of New Antifungal Breakpoints on Antifungal Resistance in *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 994–997. <http://doi.org/10.1128/JCM.03044-13>
- RAMIREZ J. & DE LA TORRE A. (2008). Evaluation of ITS3 and ITS4 primers for detection of *Candida* spp. *Candida* spp. infections from vaginal samples and aqueous humor. *Infectio*, (2), 103.
- OCHIUZZI, M. E., CATALDI, S., GUELFAND, L., MALDONADO, I., & ARECHAVALA, A. (2014). Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina De Microbiología*, 46107-110. doi:10.1016/S0325-7541(14)70057-4
- SARDI, J., SCORZONI, L., BERNARDI, T., FUSCO-ALMEIDA, A., & GIANNINI, M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 6210-24.

DETERMINACIÓN DE MARCADORES CONDUCTUALES Y PROTÉICOS EN UN MODELO TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Sánchez Romero, María Luisa.1; Niño Esquivel, Sandra A.2; Zarazúa Guzmán Sergio2; Salgado, Roberto3

1Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, mariby_rp@hotmail.com ; 2Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, sergio.zarazua@uaslp.mx, saen08@gmail.com. 3Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, roberto.salgado@uaslp.mx

RESUMEN

Se tiene conocimiento desde hace décadas del impacto negativo que la exposición al arsénico ejerce sobre la salud. El descubrimiento de alteraciones en algunas funciones superiores del sistema nervioso central que presentaban habitantes de zonas contaminadas por arsénico, abrió un debate sobre los posibles mecanismos del daño secundario a dicho elemento, siendo el aumento del estrés oxidativo una de las vías propuestas. En este trabajo, se evaluó la conducta de memoria a corto (condicionamiento al miedo) y largo plazo (laberinto de Morris), cambios genéticos como Nrf2 y OH1 utilizando la técnica de PCR por retrotranscripción e inmunohistoquímica para la identificación y conteo de la proteína c-Fos. Todo esto usando el modelo murino transgénico para la Enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

The negative impact of exposure to arsenic on health has been known for decades. The discovery of alterations in some higher functions of the central nervous system presented by habitants of areas with unusually high arsenic contamination, opened a debate about the possible mechanisms of secondary damage to this element, with increased oxidative stress being one of the proposed routes. In this paper, we analyzed short (fear conditioning) and long term (Morris maze) memory behavior, genetic changes like Nrf2 and OH1 were evaluated using the retrotranscription PCR technique and immunohistochemistry for the identification and counting of the c-Fos protein. All this using the murine model transgenic for Alzheimer's Disease.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, arsénico, modelo transgénico.

INTRODUCCIÓN

La demencia senil es un problema de salud, social y económico que afecta a millones de personas en el mundo debido al efecto “envejecimiento global”. En México la prevalencia general de deterioro cognoscitivo es una condición importante en la población mayor de 65 años, se encuentra alrededor del 8% (ENASEM 2007). La demencia senil se clasifica en: demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, siendo la Enfermedad de Alzheimer (EA) más frecuente. La mayoría de los casos de EA se desarrollan a partir de los 65 años con una incidencia que se duplica cada década sucesiva de la vida. La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno clínico neurodegenerativo de evolución crónica, caracterizado por el deterioro de las funciones cognitivas. El diagnóstico es confirmado post mortem mediante un examen microscópico en cortes de cerebro del paciente, donde se delatan dos características morfológicas principales: los ovillos neurofibrilares (hiperfosforilación de tau) y las placas amiloides (β -amiloide) localizadas predominantemente en corteza, lóbulo temporal, lóbulo frontal e hipocampo (Zhang et al., 2011). En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la meta principal es crear líneas murinas transgénicas que desarrollen características fenotípicas semejantes a las lesiones que caracterizan la enfermedad para realizar caracterizaciones más completas sobre nuevos tratamientos, biomarcadores biológicos e incluso postular hipótesis que no serían posibles siguiendo otros modelos (Oddo et al., 2003). Así, los modelos animales desarrollados para la EA, se centran en procesos como: muerte celular, neuroinflamación, estrés oxidativo y disfunción sináptica en las regiones de hipocampo y corteza frontal principalmente, para contribuir en las hipótesis descritas hasta el momento (Schaeffer et al., 2011). Sin embargo, es importante ampliar la investigación sobre la identificación de los factores de riesgo ambientales que predisponen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, ya que probablemente, la exposición al arsénico se produce años o décadas antes del desarrollo de la enfermedad y que a largo plazo pueden acelerar el proceso natural de envejecimiento celular o también llamado senescencia celular. La senescencia celular surge de la teoría del estrés oxidativo que intenta explicar los cambios degenerativos y la pérdida neuronal que ocurren durante el envejecimiento. Esta hipótesis considera que el envejecimiento y el desarrollo no son fases distintas de la vida sino más bien que el envejecimiento es la etapa final del desarrollo y que aun cuando no es un fenómeno genéticamente programado ocurre por la influencia del estrés oxidativo (EOx) en el programa genético. Por lo tanto, se necesitan modelos animales que simulen rasgos específicos de EA tales como las relacionadas a β A para elucidar la fisiopatogenia de la enfermedad por causas de exposición ambiental. En este trabajo emplearemos el modelo de ratón transgénico (3xTg-AD) porque se considera el modelo ideal para simular adecuadamente la enfermedad y que permita ver exacerbados los cambios bioquímicos, conductuales y patológicos ocasionados por la exposición crónica a arsénico, por medio del consumo de agua, y así, obtener conclusiones acerca del origen de la enfermedad. Finalmente, como

objetivo general, será evaluar el modelo transgénico para la enfermedad de Alzheimer, así como la expresión de marcadores de extras oxidation y el déficit en el aprendizaje.

METODOLOGÍA

1. Identificación genética del modelo 3xTg-AD

Genotipificación de APP

1.1 Extracción DNA

Se colocó en un tubo eppenforff la cola del ratón y se agregó NaOH 0.05M como buffer, durante 15 min en thermoblock a 95°C, ocasionando lisis celular y liberando el DNA. Se añadió la solución stop (EDTA 10mM y Tris 1M).

1.2 PCR Punto Final

Primero se realizó el stock para 6 muestras, en donde se agregó a los tubos eppendorff los oligos (APP, casset THY, tau), dNTP's, MgCl, buffer 10X PCR y agua. Seguido, se agrega a cada tubo el DNA de cada cola de ratón así como la Taq Polimerasa. La programación del Termociclador fue la siguiente: el primer ciclo se realizó a una temperatura 95°C durante 2:30min, 35 ciclos, la alineación se realizó a 94°C (40''), 62°C (40'') y 72°C (1'), seguido por un ciclo más de 72°C durante 2'' y finalmente a 4° C hasta su almacenamiento.

1.3 Cuantificación de Resultados

Se corrieron los productos de PCR en gel de agarosa al 1% y Bromuro de Etidio (BrEt), colocando el marcador de peso molecular y las muestras dentro del gel. Posteriormente, se analizaron las densidades ópticas emitidos por luz UV.

2. Caracterización conductual del modelo 3xTg-AD en relación a memoria de corto y largo plazo

2.1 Memoria a corto plazo : Condicionamiento al miedo

Se realizó la evaluación conductual durante 1h-6h-24 h-48 h y 72 h, los animales se colocan dentro de una caja, después del periodo de adaptación (1h), los animales reciben un estímulo sonoro (5 s) y al mismo tiempo un estímulo doloroso (1 s) que es un choque eléctrico de 0.8 A (periodo de adquisición de la información). En los tiempos establecidos de análisis se repitió el estímulo sonoro pero no el estímulo doloroso, la conducta a evaluar es el tiempo de freezing o inmovilización durante un tiempo total de 5 minutos.

2.2 Memoria a largo plazo: Laberinto de Morris

En esta prueba conductual, se realizó en una alberca llena de agua, la cual se le tiñó con leche en polvo esconder la plataforma. Se elaboran y se colocan señales (triángulo, círculo, rectángulo), la prueba duró una semana, en donde el primer día se les dejó nadar para familiarizarse por 1 minuto. A partir del segundo día hasta el sexto día, se colocaron a los ratones en el agua para nadar y que, con ayuda de las señales, llegasen a la plataforma para medir la memoria espacial, en donde los ratones debían nadar hasta llegar a la plataforma. Se les dejó nadar por 3 minutos, en donde se registraron resultados al primer minuto, segundo y tercer minuto.

3. Conteo Celular de C-FOS en hipocampo (CA1) por técnica de Inmunohistoquímica

Se utiliza la inmunohistoquímica para la detección de la proteína c-Fos, el cual, actúa como marcador de la activación neuronal.

3.1 Corte de Encéfalo en Criotomo

El criotomo debe estar a una temperatura inicial de 18°C para comenzar con el corte del encéfalo. Mientras se establece la temperatura, se inicia con el corte de cerebelo y tallo cerebral, con el tejido fresco, con un bisturí. Seguido, se realiza el montaje de lo restante del encéfalo en una base metálica especial para el criotomo junto con adhesivo tissue tek. Se realizan los cortes a 30 micrómetros y se colocan las rebanadas en sacarosa en pocillos.

3.2 Inmunohistoquímica

Se realizan lavados en orbital shaker (OS) con PBS 1x y se coloca el anticuerpo primario c-Fos 1/250 microlitros de supermix. Se deja una hora en OS y se refrigera a 4°C por un día. Después de dos días, hacer lavados en OS con PBS 1x y se coloca el anticuerpo secundario AntiRabbit 1/200 microlitros de supermix. Se deja incubar por dos horas. Después, la preparación del complejo A-B 1/500 microlitros de súpermix cada uno se coloca y deja incubar por dos horas. Finalmente, para la solución de revelado se utiliza TBS 1x, DAB (Diaminobencidina), NiNH₄SO₄ al 10% (Sulfato de níquel) y H₂O₂ al 30% (Peróxido de hidrógeno). Se coloca la solución en los pocillos y se observa al microscopio a los 2 min. Se montan las laminillas y se dejan secar por dos o tres días. Por último, se colocan las laminillas en tren de alcoholes: agua destilada, alcohol 70°, 96° y absoluto y xilol, 3 min en cada uno de los mencionados, cubriéndolos con entellán y cubreobjetos. Para la toma de resultados se utiliza un programa especial llamado ZEN. Se toman las fotografías con un aumento de lente de 5x, 20x y 40x en el área CA1 del hipocampo.

3.3 Conteo celular

El conteo celular, se realiza con el programa Image J. Dentro de la aplicación, el uso de treshold es esencial, ya que nos da la marca del tamaño celular en color rojo, al hacer el ajuste de medida en pixeles de 200 a 1,200. Otras consideraciones de ajustes como el color de la imagen (blanco y negro) y la exposición de la luz (50 a 200) se tomaron en cuenta.

4. Análisis de la expresión génica de Nrf2 y HO1

4.1 Homogenizado y Extracción de RNA

El primer paso es la extracción de RNA (técnica con Trizol) a partir de 50 mg de corteza cerebral. Se coloca

500 uL Trizol en un tubo eppendorff y se disgrega el tejido. Se centrifuga a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y se agrega cloroformo por 3min a temperatura ambiente. Se centrifuga nuevamente a 12,000 g por 15 min a 4°C para separar el RNA. El RNA para precipitarlo añadimos isopropanol, se incuba por 10 min a temperatura ambiente. Después, se centrifuga 10 min a 12,000 g a 4°C para decantar y obtener el RNA puro. Finalmente, se deja secar el RNA para guardarse a -20°C y realizar PCR.

4.2 Espectroscopía

Una vez que se obtuvo el RNA total, se mide la absorbancia para determinar la calidad y cantidad de la muestra, cuantificando por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 y 260 nm y realizar la electroforesis en condiciones desnaturalizantes con bromuro de etidio y así corroborar que las bandas se habían mantenido íntegras.

4.3 PCR por retrotranscripción (RT)

Con 5ug de RNA se realizó la RT (retrotranscripción) para generar cadenas de DNA complementario (cDNA). Se usó el Kit SuperScript® II Reverse Transcriptase de Invitrogen™. El mRNA tienen un extremo cuyas bases son en su totalidad adeninas (cola poli-A), ésta característica no la comparte con los otros tipos de RNA, por lo que al usar un cebador con una secuencia exclusivamente de timinas (Oligo dT) aseguramos que únicamente estamos generando cDNA a partir de mRNA. Por último las cadenas de cDNA generadas fueron cuantificadas por espectroscopía.

4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Con éste método se busca amplificar únicamente las cadenas de cDNA que contienen a las secuencias de NRF2 y HO-1, esto se logra al usar cebadores específicos para dichas secuencias a una temperatura ideal para la unión del cebador, en éste caso era de 62 °C. De rutina también se amplifica actina como control positivo y para normalizar los resultados. La PCR fue sometida a 35 ciclos con una denaturalización de 95 °C 5 min inicial y 1 min en cada ciclo, alineamiento por 30s y según la Tm de los cebadores y una Elongación a 72°C 1 min en cada ciclo y 7 min final. Se usó el kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase de Promega.

4.5 Electroforesis

Se corrieron los productos de PCR en gel de agarosa al 1% y Bromuro de Etidio (BrEt) y se realizó el análisis densitométrico de las bandas con ImageJ, el análisis estadístico realizado en el programa GraphPad Prism.

5. Estrés Oxidativo

Medición de la fluorescencia, DCF diclorofluoreína y diacetato de DCF se ingresa al interior de las células y las esterasas bloquea el diacetato y queda un producto que reacciona con las especies reactivas del oxígeno, como peróxido de hidrogeno y radicales libres, oxidan a la especie y forman la DCF que es el compuesto fluorescente. Proporcional la fluorescencia con el no de especies reactivas que se tienen y se compara con la curva del compuesto fluorescente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación genética del modelo 3xTg-AD

Se obtuvo la presencia del gen APP en el modelo 3xTg-AD. Confirmando la presencia de esta proteína, se asegura que se trabaja con animales murinos modificados genéticamente.

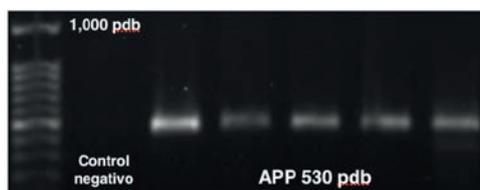


Figura 1. PCR GEN APP

2. Caracterización conductual del modelo 3xTg-AD en relación a memoria de corto y largo plazo

Se presentan una serie de gráficas, las cuales, muestran los resultados de las pruebas conductuales.

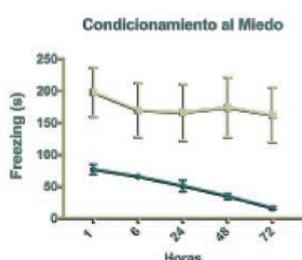


Fig. 2 Gráfica del tiempo de freezing

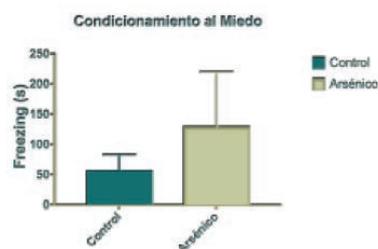


Fig. 2.1 Gráfica del Promedio de Freezing (72 h)

Como se puede ver en los resultados de memoria de corto plazo (fig. 2 y 2,1), el grupo arsénico después de 72 horas y en general, comparado con el grupo control, se mantuvo un tiempo de freezing constante al inicio y al final de la misma; esto sucede, debido a que existe una pérdida de memoria de corto plazo más avanzada, producto de la exposición al arsénico. A continuación, se muestran las gráficas para los resultados de memoria de largo plazo:



Fig. 2.2 Gráfica del tiempo de latencia

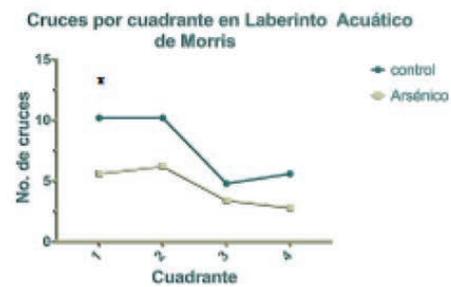


Fig. 2.3 Gráfica de cruces por cuadrante

Los resultados de la latencia del recorrido a la llegada de la plataforma (fig. 2.2), se mantuvo constante para el grupo expuesto al arsénico, comenzando con una latencia de 60 segundos y progresivamente, se mantiene en un rango de 50 a 55 segundos durante los siguientes días. El grupo control, muestra un decremento en la latencia, resultando en el día 7 a sólo 34 segundos a su llegada a la plataforma, es decir, tuvo mejor respuesta a la memoria espacial recordando llegar a la plataforma. Sin embargo, el no. de cruces (fig. 2.3) en el cuadrante 1 y 2, indica una mayor actividad de memoria espacial, ya que estos cuadrantes se encuentran cerca de la plataforma.

3. Conteo Celular para C-FOS en hipocampo (CA1) por técnica de inmunohistoquímica

A continuación, se muestra la toma de imágenes en diferentes lentes ópticos y sus resultados en el conteo del mismo.



Fig. 3 Ampliación 4x

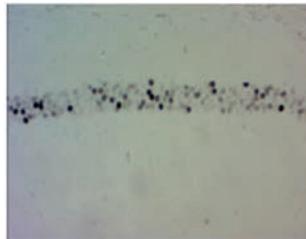


Fig. 3.1 Ampliación 20x



Fig. 3.2 Ampliación 40x

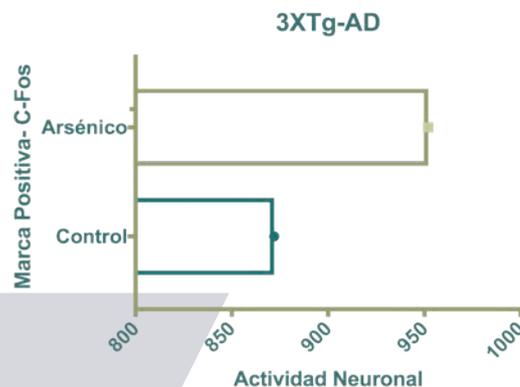


Fig. 3.3 Gráfica conteo C-Fos

Al observar los resultados del conteo celular (fig 3.3), existe un incremento en la proteína c-Fos, del grupo expuesto a arsénico. Es de esperar estos resultados, porque existe mayor actividad neuronal porque las células neuronales trabajan más para tratar de recompensar los procesos fisiológicos que están dañados.

4. Análisis de la expresión de Nrf2 y HO1

Se obtuvieron bandar para la expresión de Nrf2 (fig. 4) y HO1 (fig. 4.1)

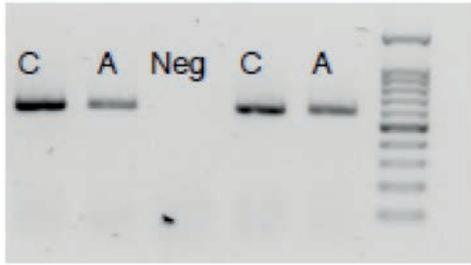


Fig. 4 PCR para Nrf2

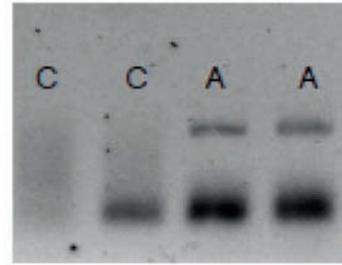
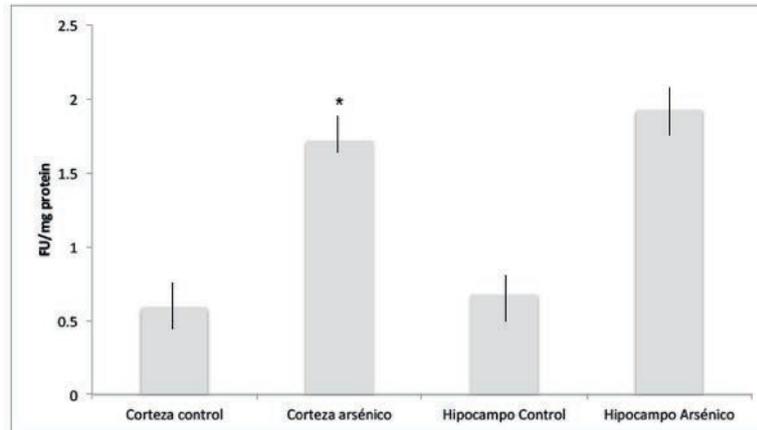


Fig. 4.1 PCR para OH1

6. Estrés Oxidativo



CONCLUSIÓN

Se lograron los objetivos realizados en este trabajo, que fueron: el análisis genético en donde se encontró el gen APP, un mayor grado de déficit de aprendizaje de corto y largo plazo en el grupo expuesto a arsénico, incremento en la actividad neuronal de la proteína c-Fos en el hipocampo, específicamente en el CA1, para el grupo expuesto a arsénico, análisis de la expresión de Nrf2 y OH1 como antioxidantes en el murino y finalmente, el estrés oxidativo, éstos resultados son preliminares para la hipótesis de senescencia celular por exposición a arsénico en el modelo 3xTg-AD.

BIBLIOGRAFÍA

- Marcus, D. L., Strataci, J. A., Miller, D. C., & Masia, S. (1998, July 1). Quantitative Neuronal c-Fos and c-Jun Expression in Alzheimer's Disease. Elsevier, 19(5), 393-400. July 4, 2017, [http://dx.doi.org/sci-hub.cc/10.1016/S0197-4580\(98\)00077-3](http://dx.doi.org/sci-hub.cc/10.1016/S0197-4580(98)00077-3)
- Zarazúa S. (2011) Arsenic affects expression and processing of amyloid precursor protein (APP) in primary neuronal cells overexpressing the Swedish mutation of human APP. International Journal of Developmental Neuroscience.
- World Health Organization (2010) ACTION IS NEEDED ON CHEMICALS OF MAJOR PUBLIC HEALTH CONCERN http://www.who.int/ipcs/features/10chemicals_en.pdf?ua=1 (Consulta 27 de junio de 2017)
- Blennow, K., J de Leon, M., & Zetterberg, H. (2006, July 29). Alzheimer's disease. Lancet, 368, 387-403. <http://www.alzgene.org>
- Tyler. C. R., & Allan, A. M. (2014, march21). The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. Curr Envir Health Rpt. doi: 10.1007/s40572-014-0012-1

USO DE ROSUVASTATINA EN PACIENTES CON QUEMADURAS EN LA DISMINUCIÓN DE INTERLEUCINAS INFLAMATORIAS

Montes Rodríguez María Fernanda¹ y Sánchez Aguilar Jesús Martín².

RESUMEN

Objetivo: evaluar el uso de rosuvastatina en pacientes quemados y los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α durante dos semanas.

Métodos: se reclutaron aquellos pacientes que cumplieran los criterios de inclusión, posteriormente se llevó a cabo la aleatorización y de acuerdo a ésta, se administró de forma cegada 20 mg de rosuvastatina o placebo diariamente durante 15 días.

Resultados: En total, doce pacientes fueron incluidos en el protocolo; cinco pacientes recibieron rosuvastatina y siete recibieron placebo. Al término del estudio, se observa una disminución del perfil de citocinas inflamatorias en ambos grupos, sin embargo es considerablemente mayor en el grupo que recibió rosuvastatina. No se presentaron efectos adversos derivados de la administración de rosuvastatina.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the use of rosuvastatin in burned patients and the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α for two weeks.

Methods: patients who fulfilled the inclusion criteria were recruited and subsequently randomization was carried out, according to this, it was given way blinded 20 mg of rosuvastatin or placebo daily for 15 days.

Results: In total, twelve patients were included in the protocol; five patients received rosuvastatin and the other seven received placebo. At the end of the study, we observed a decrease of the profile of inflammatory cytokines in both groups, however it was considerably higher in the group that received rosuvastatin. Adverse effects were not presented.

Palabras clave: rosuvastatina, quemaduras, citocinas, inflamación.

INTRODUCCIÓN

El daño secundario por una quemadura produce una serie de respuestas inflamatorias, modificaciones en los niveles de citocinas y alteraciones metabólicas.¹ La quemadura induce en el sistema inmunológico cambios que resultan en la supresión de la función inmunitaria e incremento de la susceptibilidad a infecciones. El complejo proteico lipídico (LPC) es liberado de la piel dañada, el cual es responsable de la supresión inmune, hay un incremento de mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, entre otras.^{1,2}

Nijsten et al, respecto a los niveles séricos de mediadores inflamatorios, en un estudio inmediato realizado un día posterior a la quemadura encontraron una elevación pronunciada de IL-6. Gou et al, reportó que la concentración máxima de IL-6 acontece durante la primera semana después de la quemadura y Marano et al, informó que en pacientes sépticos con quemaduras es más frecuente el incremento de TNF- α .³ Gauglitz et al, demostraron la asociación entre expresión de diferentes citocinas y la morbilidad y mortalidad de pacientes quemados. Las IL-6, e IL-10 tienen un valor predictivo negativo, lo que incrementa el riesgo de muerte. La IL-7 posee un valor predictivo positivo, por lo que el riesgo de mortalidad aumenta cuando los niveles de esta interleucina disminuyen.⁴

En un ECCA realizado por nosotros en pacientes con trauma craneoencefálico, investigamos los efectos de rosuvastatina sobre diversas citocinas inflamatorias, en donde encontramos una reducción significativa de los niveles de TNF- α , a una dosis de 20 mg diarios durante 10 días, no se observaron falla hepática, lesión renal aguda, ni rhabdomiolisis, ni otro efecto adverso,⁵

Nuestro objetivo en el presente estudio fue realizar una prueba piloto de ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego para valorar la asociación entre la administración de rosuvastatina en pacientes quemados en más del 20% del área corporal total y los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α durante dos semanas.

MARCO TEÓRICO

Las estatinas son inhibidores reversibles de la enzima microsomal HMG-CoA reductasa, que convierte HMG-CoA a mevolonato, la etapa limitante de la síntesis de colesterol, disminuyendo así la síntesis hepática de colesterol. Además favorece la expresión del receptor de LDL en la superficie de los hepatocitos, lo que aumenta la extracción de LDL-C, reduce su concentración sanguínea, aumenta el colesterol HDL y también disminuye triglicéridos.⁶

En un modelo de aterosclerosis en conejos, se demostró que la atorvastatina disminuye la expresión de moléculas quimioatrayentes MCP-1 e IL-8 por la reducción de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B),⁷ los factores que modifican la aterogénesis incluyen, mejor función endotelial debido a la conservación de

la producción de la óxido nítrico endotelial, inhibición de la proliferación de músculo liso vascular, donde se ven implicadas varias vías de señalización: la activación de PPAR α por la OxLDL u otros ligandos, aumenta la expresión del transportador ABC-A1 implicado en el transporte reverso de colesterol en las células periféricas y disminuye mediadores pro-inflamatorios TNF- α , IL-1 β , IL-6, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y gelatinasa B. 8

METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Quemados del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 18 años de edad, dentro de las primeras 48 horas posteriores a la lesión, con quemaduras mayores al 20 % del área corporal total de cualquier profundidad y mecanismo de lesión, con autorización por parte del paciente y/o familiar de acuerdo al consentimiento informado e ingreso hospitalario. Se excluyeron a aquellos pacientes con antecedentes de enfermedades inmunosupresoras, comorbilidades crónicas degenerativas (diabetes, hipertensión arterial, cardiopatías, enfermedad renal crónica e insuficiencia hepática), embarazadas o en lactancia, administración previa de estatinas, fibratos, ciclosporina, antifúngicos, azoles, macrolidos, inhibidores de proteasas, nafazadona, verapamilo, diltiazem y amiodarona

Se utilizó una tabla de aleatorización en bloques, se administraron por vía oral 20 mg de Rosuvastatina o Placebo cada 24hrs durante 14 días, se recolectó 4 ml de sangre periférica en tubos con EDTA en el día 0 (ingreso del paciente al hospital) y el día 14, después la muestra se centrifugó a 1200 g por 10 minutos a 4°C, luego se extrajo el plasma y se guardó a -80°C hasta su análisis. Al finalizar el reclutamiento las muestras fueron descongeladas y analizadas mediante el método de “Cytometric Bead Array” CBA, con el kit “BD CBA Human Inflammatory Cytokines”, se utilizó el citómetro de flujo “BD Accuri Flow Cytometer C6”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa JMP 8(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), Rstudio v0.99.902(Rstudio Team. Boston, MA 2016) y Rv3.3.0 (R core team. Vienna, Austria.2016).

Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión de todas las variables. Se calculó normalidad a través de qqPlot de residuales de Fox. El análisis descriptivo se llevó a cabo a la naturaleza de las variables estudiadas; las variables categóricas se describieron con frecuencias y porcentajes, mientras que las numéricas con distribución normal se expresaron en promedio y desviación estándar.

El análisis bivariado de variables numéricas se realizó con t de Student (distribución normal), suma de rangos de Wilcoxon (distribución no Normal) y el de las variables categóricas se efectuó con Prueba exacta de Fisher, para el análisis de muestras dependientes se realizó t de Student pareada, los valores de p menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

A continuación se muestran cuatro tablas en donde se presentan los resultados, en la tabla 1 se enuncian las características generales de la población, en la tabla 2 los niveles de interleucinas al inicio y final del estudio, en la tabla 3 las características de la población por grupos y en la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos por grupos de tratamiento.

Tabla 1. Características generales de la población

| Variable | Valor |
|--------------|---------------------------|
| Edad | 42.4±10.6 |
| Sexo | M:83.3%(10) F:16.7%(2) |
| ASCT quemada | 23.9±11.05 |

Tabla 2. Niveles de interleucinas al inicio y final del estudio

| Variable | Día 0 pg/ml | Día 14 pg/ml |
|---------------|-------------|--------------|
| IL-1 | 1.18±7.78 | 0.35±6.14 |
| IL-6 | 95.3±454.87 | 7±213.9 |
| IL-8 | 26.6±50.32 | 5.19±42.46 |
| IL-10 | 1.76±11.73 | 0.77±2.21 |
| IL-12 | 0.88±0.52 | 0.75±0.63 |
| TNF- α | 0±0.61 | 0.625±4.23 |

Tabla 3. Características de la población por grupos

| Variable | Placebo (n=7) Estatinas (n=5) | Valor de P |
|---------------------------------|----------------------------------|------------|
| Días de estancia hospitalaria | 15.28±8.97 18.4±13.53 | 0.66 |
| Edad | 36.14±14.19 51.2±19.03 | 0.17 |
| Sexo | H: 100 % H:60.0% M:40% | 0.15 |
| ASCT quemada | 21.4±2.4 27.4±17.35 | 0.48 |
| Quemadura 1er grado | 100% 100% | 1 |
| Quemadura 2do grado superficial | 100% 100% | 0.52 |
| Quemadura 2do grado profunda | 85% 60% | 1 |
| Quemadura 3er grado | 14% 0% | 1 |
| Quemadura por fuego directo | 42.8% 100% | 0.11 |
| Quemadura eléctrica | 42.85% 0% | 0.11 |
| Quemadura por inmersión | 14.28% 0% | 0.11 |

Tabla 4. Niveles de interleucinas al inicio y final del estudio por grupos

| Variable | Día 0 (pg/ml) | | Día 14 (pg/ml) | |
|---------------|------------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| | Placebo | Estatinas | Placebo | Estatinas |
| IL-1 | 0.37±2.28 1.93±4.22 | | 0.13±0.38 1.14±4.31 | |
| IL-6 | 49.01±96.74 141.76±280.43 | | 7±18.49 5.52±118.04 | |
| IL-8 | 20.16±19.55 36.86±33.56 | | 5.49±5.2 4.9±23.48 | |
| IL-10 | 1.92±3.55 36.86±33.56 | | 0.77±0.64 0.77±0.89 | |
| IL-12 | 0.92±0.65 0.81±0.31 | | 0.92±0.66 0.52±0.65 | |
| TNF- α | 0±0.58 0±1.3 | | 0±0.68 0±2.93 | |

Se observa que en ambos grupos se presenta un perfil elevado de citocinas proinflamatorias semejante posterior a la lesión. Al final del estudio hay una disminución de citocinas en ambos grupos respecto a la medición inicial, sin embargo en aquellos que recibieron rosuvastatina, la reducción es mayor aunque no es estadísticamente significativa. Se comprobó que la administración de rosuvastatina es segura debido a que no se presentaron reacciones adversas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Farina, J. A., Rosique, M. J., & Rosique, R. G. (2013). Curbing Inflammation in Burn Patients. *International Journal of Inflammation*, 2013, 1-9. doi:10.1155/2013/715645
- 2) Hur, J., Yang, H. T., Chun, W., Kim, J., Shin, S., Kang, H. J., & Kim, H. S. (2015). Inflammatory Cytokines and Their Prognostic Ability in Cases of Major Burn Injury. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(1), 105. doi:10.3343/alm.2015.35.1.105
- 3) Bandt, J. P., Chollet-Martin, S., Hervann, A., Lioret, N., Roure, L. D., Lim, S., Cynober, L. (1994). Cytokine Response To Burn Injury. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 36(5), 624-628. doi:10.1097/00005373-199405000-00004
- 4) Gauglitz, G. G., Finnerty, C. C., Herndon, D. N., Mlcak, R. P., & Jeschke, M. G. (2008). Are serum cytokines early predictors for the outcome of burn patients with inhalation injuries who do not survive? *Critical Care*, 12(3). doi:10.1186/cc6932
- 5) Sánchez-Aguilar, M., Tapia-Pérez, J. H., Sánchez-Rodríguez, J. J., Viñas-Ríos, J. M., Martínez-Pérez, P., Cruz-Mendoza, E. D., Gordillo-Moscoso, A. (2013). Effect of rosuvastatin on cytokines after traumatic head injury. *Journal of Neurosurgery*, 118(3), 669-675. doi:10.3171/2012.12.jns121084
- 6) Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 19(1), 117-125. doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x
- 7) Palinski, W. (2002). Immunomodulatory Effects of Statins: Mechanisms and Potential Impact on Arteriosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(6), 1673-1681. doi:10.1097/01.asn.0000018400.39687.8c
- 8) Blanco-Colio, L.M., Tuñón, J., Martín-Ventura, J.L., Egido, J. (2003). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney International*, 63(1), 12-23. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00744.x

COMPARACIÓN ENTRE PCR EN TIEMPO REAL Y PCR DIGITAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN PACIENTES EMBARAZADAS, CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Hernández García Katia Ximena¹, Martínez Martínez Rita Elizabeth²

RESUMEN

El embarazo es un estado fisiológico en el que se presentan cambios locales y generales temporales en diferentes estructuras de la mujer, como resultado del incremento en la producción de algunas hormonas. El nacimiento prematuro y el bajo peso al nacer representan importantes problemas de salud pública en los países desarrollados y subdesarrollados, son los principales factores determinantes de la morbilidad y mortalidad perinatal, y su etiología es multifactorial. Uno de los factores más importantes son los antecedentes de los procesos infecciosos durante el embarazo, incluyendo infecciones genitourinarias y periodontitis.

En la presente investigación, se lleva a cabo una comparación entre 3 métodos de cuantificación bacteriana, el PCR punto final, PCR tiempo real y PCR digital, este último siendo de los métodos más actuales y precisos.

ABSTRACT

Pregnancy is a physiological state in which regional and temporal changes are present in different structures of the woman, as a result of the increase in the production of some hormones. Preterm birth and low birth weight represent important public health problems in developed and underdeveloped countries, are the main determinants of perinatal morbidity and mortality, and its etiology is multifactorial. One of the most important factors is the history of infectious processes during pregnancy, including genitourinary infections and periodontitis.

In the present investigation, a comparison between 3 bacterial quantification methods, the PCR endpoint, real-time PCR and digital PCR, the latter of the most current and accurate methods, is carried out.

Palabras clave: Periodontitis, Embarazo, PCR, P gingivalis

INTRODUCCIÓN

El embarazo es un estado fisiológico en el que se presentan cambios locales y generales temporales en diferentes estructuras de la mujer, como resultado del incremento en la producción de algunas hormonas, entre las que se encuentran: estrógenos, progesterona, gonadotropinas, y algunas otras. Estos cambios pueden presentarse en cavidad oral, de distintas formas como, la periodontitis, que es una enfermedad crónica inflamatoria, multifactorial y polimicrobiana compleja que ocasiona la destrucción de los tejidos de soporte del diente.

Existen diferentes técnicas para la cuantificación de bacterias, como la PCR digital que es un nuevo enfoque para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos ya que ofrece un método alternativo a la PCR cuantitativa en tiempo real convencional para la cuantificación absoluta y la detección de alelos raros que tiene algunas limitaciones, como la necesidad de una curva estándar de referencia, sobre la base de diluciones.

La PCR digital funciona mediante la partición de una muestra de ADN o ADNc en muchas reacciones de PCR individuales en paralelo; algunas de estas reacciones contienen la molécula objetivo (positivo), mientras que otras no (negativo).

Una sola molécula se puede amplificar un millón de veces o más. Durante la amplificación, se utiliza la química TaqMan con sondas etiquetadas con tintes para detectar objetivos específicos de secuencia. Cuando no hay ninguna secuencia de destino presente, no se acumula ninguna señal. Tras el análisis de PCR, la fracción de reacciones negativas se usa para generar un recuento absoluto del número de moléculas de la muestra, sin necesidad de estándares ni controles endógenos.

En este trabajo se compararán ambos métodos de cuantificación de bacterias y se comprobarán sus características.

METODOLOGIA

El tipo de estudio es transversal y analítico.

El muestreo se realizó consecutivo no probabilístico, desde noviembre de 2013 hasta Noviembre de 2014.

Para el presente estudio, se analizaron alrededor de 400 pacientes. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: pacientes puerperales sanos de 20 a 35 años de edad; Todas las mujeres estaban bajo control prenatal, con una sola gestación sin alteraciones. Los criterios de exclusión fueron: Fecundación in vitro, cesárea programada, cuello uterino corto, fumadores y alcohólicos, tratamiento periodontal previo, ingesta de antibióticos en los últimos 3 meses y pacientes a quienes era imposible obtener muestras.

Por lo tanto, 20 mujeres puerperales fueron incluidas en el presente estudio, y se dividieron en dos grupos con base en semanas de embarazo hasta la fecha de Menstruación y ultrasonografía. Un período de 37 semanas fueron consideradas prematuros. 10 mujeres fueron incluidas en el término grupo de nacimiento y 10 en el grupo de parto prematuro. Todas las pacientes vivían en San Luis Potosí, México. El reclutamiento se llevó a cabo en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central "Ignacio Morones Prieto", y las muestras fueron procesadas en la Maestría en Ciencias Odontológicas en la Universidad de San Luis Potosí.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrado en el estudio. Un cuestionario completo de salud que incluyó Información sobre la salud sistémica, ginecológica y Antecedentes obstétricos y un examen clínico oral de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki (Versión 2008). El Comité Ético del Hospital Central " Ignacio Morones Prieto " y el comité de la maestría en Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí aprobó el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen algunos estudios que afirman y otros que niegan la asociación entre la presencia de enfermedad periodontal y el desarrollo del parto prematuro. Estas variaciones pueden deberse a las diferentes condiciones de cada una de las pacientes, que pueden interferir en el tiempo de gestacional. En el presente estudio pretendemos controlar las principales variables confundidoras relacionadas con la etiología del parto prematuro, especialmente las infecciones maternas que son uno de los factores más importantes para el parto prematuro.

En la tabla 1 se describe la información general acerca de los neonatos y de sus madres, se puede concluir que el promedio de edad de los partos en termino normal fue ligeramente menor a la del parto pretermino, mientras que el promedio del tiempo de gestación fue ligeramente mayor en las pacientes que cumplieron un embarazo en tiempo normal. Referente al peso del neonato se puede observar que los nacidos en parto pretermino presentaron un peso ligeramente menor.

TABLA 1. Información general acerca de los neonatos y madres

| | Término (n=9) | Pretermino (n=9) | P |
|---|--|--|--------|
| Edad (U de Mann Whitney) | 23.88 { $\bar{x} \pm 2.84$ (20-29)} | 24.11 { $\bar{x} \pm 2.1$ (25-28)} | 0.9789 |
| Tiempo de gestación (U de Mann Whitney) | 39.36 { $\bar{x} \pm 1.6$ (34-41)} | 38.06 { $\bar{x} \pm 0.9$ (36.6-41)} | 0.0703 |
| Peso del Neonato (U de Mann Whitney) | 3221.11 { $\bar{x} \pm 479.2$ (2750-3610)} | 2890.55 { $\bar{x} \pm 428.2$ (1880-3450)} | 0.1086 |

En la tabla 2, se muestra a información periodontal de las madres estudiadas, en donde podemos observar que la presencia de periodontitis fue ligeramete mayor en las pacientes con parto en termino normal, sin embargo los promedios que se presentaron en la profundidad de bolsa, perdida de inserción y frecuencia de cepillado, fueron similares en ambos grupos de estudio.

TABLA 2. Información Periodontal

| | Término(n=9) | Pretermino(n=9) | P |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--------|
| Presencia de Periodontitis (Chi ²) | 8.8% | 6.6% | 0.8908 |
| Profundidad de bolsa (U de Mann Whitney) | 2.44 { $\bar{x} \pm 0.34$ (2.3-2.8)} | 2.30 { $\bar{x} \pm 0.21$ (2.5-2.6)} | 0.2909 |
| Perdida de inserción (U de Mann Whitney) | 2.77 { $\bar{x} \pm 0.44$ (1.84-3.5)} | 2.30 { $\bar{x} \pm 0.53$ (2.5-2.6)} | 0.0699 |
| Frecuencia de cepillado (U de Mann Whitney) | 2.22 { $\bar{x} \pm 0.8$ (1-3)} | 2.11 { $\bar{x} \pm 0.5$ (1-3)} | 0.7432 |

En la tabla 3, podemos observar la comparación del numero de copias por mg de placa de cada una de las muestras obtenidas, en los diferentes métodos de cuantficacion bacteriana, incluyendo PCR punto final, PCR tiempo real y PCR digital.

TABLA 3.

| No. De copias mg placa | Término X \pm DE (RANGO) | Pretermino |
|------------------------|---|--|
| PCR TIEMPO REAL | 4.9 x 10 ⁴ ± 1.45 x 10 ³ (1820-7.46 x 10 ⁴) | 6.5 x 10 ⁴ ± 1.42 x 10 ³ (3.9 X 10 ³ -4.4 X10 ⁵) |
| PCR DIGITAL | 3.5 x 10 ⁴ ± 2.2 x 10 ³ (0.152-4.5 x 10 ⁴) | 2.21 x 10 ⁴ ± 3.8 x 10 ³ (8.1 x 10 ³ -6.6 x 10 ⁴) |
| PCR PUNTO FINAL | 3 NEGATIVOS 7 POSITIVOS | 6 POSITIVOS 3 NEGATIVOS |

P<0.0133 U MANN-WHITNEY

Tabla 3: comparación en tres diferentes pcr

CONCLUSIONES

En los resultados arrojados en el estudio podemos sugerir que el parto prematuro es una condición multifactorial, y el papel de la periodontitis y de los periodontopatógenos en sí no es suficiente para desencadenar el parto prematuro. Los criterios diagnósticos y los datos obtenidos apoyan esta investigación. Sin embargo, a pesar del estado similar de gingivitis, la profundidad de la sonda fue mayor en sujetos de parto prematuro, tal vez sean mujeres jóvenes y este hallazgo podría ser un signo temprano de periodontitis. De manera similar, las principales especies bacterianas periodontales no están asociadas con el parto prematuro, incluso algunas especies son más frecuentes en mujeres nacidas a término. Los hábitos generales de higiene y cuidado son más pobres que los sujetos de nacimiento a término, ya que presentan un mayor nivel de placa dental, menor frecuencia de cepillado de dientes, menor consulta prenatal, mayores niveles de caries dental activa, más necesidades dentales de tratamiento y estas situaciones

Aunado a esto se puede observar la necesidad de establecer mejores programas preventivos de salud bucal para las mujeres embarazadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Kayar NA, Alptekin NO, Haliloglu S (2015) Interleukin-1 receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid and serum in nonsmoking women with preterm low birth weight and intrauterine growth retardation. *Eur J Dent* 9:109–116
2. Howson C, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE (2013) The Born Too Soon Preterm Birth Action Group. *Reprod Health* 10(Suppl 1):S1
3. Johnson TJ, Patel AL, Jegier BJ, Engstrom JL, Mejer PP (2013) Cost of morbidities in very low birth weight infants. *J Pediatr* 162(2):243–249
4. World Health Organization (2005) World Health Statistics
5. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371:75–84

Micronúcleos como biomarcador en pacientes femeninos con factores de riesgo para adquirir el virus del papiloma humano (VPH)

Karla Alhelí Prezas Pichardo¹ y Luz Eugenia Alcántara Quintana²; Facultad de Medicina¹; Facultad de Enfermería y Nutrición², Universidad Autónoma de San Luis Potosí, karla.prezas.pichardo@gmail.com¹; luzalcantara@gmail.com²

RESUMEN

Se realizó un protocolo de investigación en 10 pacientes del Hospital del Niño y la Mujer que se encontraban en estadio NIC I (neoplasia cervical intraepitelial tipo I) y que reunían criterios de inclusión para el estudio. Se tomaron muestras sanguíneas y de raspado cervical para su posterior procesamiento. Se trabajó con ficoll para crear un gradiente para después centrifugar y tener los componentes sanguíneos separados, obteniendo células de la capa de linfocitos. Tanto a las muestras epiteliales como de linfocitos se les agregó medio de cultivo (DMEM-F) para después incubar, estimular (concaivalina A) y parar crecimiento con (citocalasina B). Se llevaron a cabo conteos celulares en ese transcurso. Finalmente se procesaron las muestras para determinación y conteo de micronúcleos.

ABSTRACT

A research protocol was carried out in 10 patients of the Hospital del Niño y la Mujer, who were in stage NIC I and met inclusion criteria for the study. Blood samples and cervical scraping were taken for further processing. We worked with ficoll to create a gradient to then centrifuge and have separated blood components. Both the epithelial and lymphocyte samples were added culture medium (DMEM-F) to then incubate, stimulate (concaivalin A) and stop growth with (cytochalasin B). Cell counts were carried out during that time. Finally the samples were processed for micronucleus determination and then counting.

Palabras clave: cultivo celular, concaivalina A, citocalasina B

INTRODUCCIÓN

El virus de papiloma humano es un virus de DNA bicatenario, perteneciente a la familia de los Papillomaviridae, no posee envoltura, y tiene un diámetro aproximado de 52-55nm, representado una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes. Este agente es el causante del cáncer cervicouterino en la mujer, que en México es la segunda causa de muerte, seguido del cáncer de mama, teniendo una amplia prevalencia en estados de escasos recursos en donde no se tiene acceso a los servicios de salud.

Se conocen más de 100 tipos virales que en relación a su patogenicidad oncológica, se clasifican en tipos de alto y de bajo riesgo oncológico. Entre los de bajo riesgo oncológico se encuentran el VPH 6 y el VPH 11 que producen verrugas o condilomas, se consideran de alto riesgo el VPH 16, 18,31,33, 35,39,45,51,52,56,58,59 y 66 que generan infecciones subclínicas que si no se detectan oportunamente ocasionan cáncer cervical, de vulva, vagina y ano en mujeres, o cáncer del ano y pene en hombres.

La neoplasia intraepitelial cervical (CIN, del inglés cervical intraepitelial neoplasia), es una lesión precursora a partir de la cual se desarrolla la mayoría de los carcinomas de cuello infiltrantes. Su clasificación en 3 estadios ayuda a prevenir y a diagnosticar tempranamente el cáncer cervicouterino. NIC1; es el tipo de menor riesgo, representa una displasia leve o crecimiento celular anormal, confinado al 1/3 distal, NIC2; lesión escamosa intraepitelial de alto grado y representa una displasia moderada, confinada a los 2/3 del epitelio cervical, NIC3; es una lesión de alto grado, la displasia es severa y cubre más de 2/3 de todo el epitelio cervical. Esta lesión es considerada como un carcinoma in situ.

En nuestro estudio acudimos al Hospital del niño y la mujer con la finalidad de encontrar pacientes que tuvieran factores de riesgo para desarrollar la enfermedad y tomamos muestras sanguíneas y de raspado cervical para después procesarlas y encontrar micronúcleos para después cuantificarlos y llevar a cabo un análisis. Los micronúcleos son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas y son producidos por radiación, sustancias genotóxicas y en nuestro caso por virus. En nuestro trabajo tenemos la finalidad correlacionar la cantidad de micronúcleos y la presencia de la enfermedad.

METODOLOGIA

Determinación de micronúcleos en muestras sanguíneas y de raspado cervical.

Se tomaron en cuenta criterios de inclusión y exclusión para la selección de pacientes como, inicio de vida sexual, número de parejas sexuales como inclusivas; y fumar como exclusiva entre otras variantes. Se tomaron las muestras sanguíneas y de raspado cervical mediante un consentimiento informado y autorizado por el paciente, para después continuar con su procesamiento y análisis.

Se colocaron 3ml de sangre y de NaCl para cada muestra en tubos falcón de 15 ml, para después crear un gradiente con ficoll (3ml) agregado previamente en otros tubos falcón de 15 ml. Se tomaron 3 ml del preparado previo de sangre y NaCl y se le agregó a los preparados de ficoll. Se procedió a centrifugar las muestras

durante media hora a una temperatura de 21 °C a 2500 gs.

Ya separados los componentes sanguíneos, se tomaron las células de la capa de linfocitos de las muestras obtenidas para su posterior cultivo celular en cajas, agregando 1 ml de medio (DMEM-F) en cada una, para posteriormente incubarlo.

A las muestras cervicales se les agregó 1 ml de medio de cultivo (DMEM-F) para después homogenizarlas con la finalidad de no perder células. Posteriormente se llevó a cabo su cultivo celular en cajas, para incubarlo finalmente.

Al cultivo celular se le dio un seguimiento durante 96 horas. A las 0 horas se hizo un conteo celular mediante cámara de Neubauer y se recabaron los datos del número celular tanto de células epiteliales como de linfocitos. Posteriormente se estimuló a las células a las 24 horas con concavalina A (3 microlitros), para después llevar a cabo un conteo celular con muestras alícuotas obtenidas previamente. A las 48 horas únicamente se llevó a cabo el conteo celular. Durante las 72 horas se le dio freno al crecimiento celular mediante citocalasina B (1.8 microlitros). Finalmente se procedió a cosechar las células de las dos estirpes.

Cosechadas las células se procedió a fijarlas. Se tomó todo el líquido en tubos eppendorf que se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó 1 ml de PBS para volver a centrifugar a las mismas condiciones. Como paso último se agregó metanol: ácido acético en relación 1:1. Para finalizar se tiñen las células para poder observar los micronúcleos. Se toma 1 ml de la muestra y se colocan sobre portaobjetos y se deja secar durante 1 día, posteriormente se le agrega 1 ml de ácido peryódico y se deja reposar durante 5 minutos, para después lavarse con agua destilada. Se le agrega 1 ml de reactivo de Schiff y se deja sobre la muestra durante 30 minutos para después llevar a cabo un lavado con agua destilada. Se le agrega 1 ml de hematoxilina de Harris y se deja sobre la muestra durante 10 minutos, después se lava. Para finalizar la tinción se agrega verde brillante al 1% y se deja sobre la muestra durante 30 segundos, para lavar bajo las mismas condiciones.

Para poder visualizar los micronúcleos se necesita montar las respectivas muestras con resina xilol, se deja que la muestra esté seca durante 1 día para finalmente observar los micronúcleos mediante un microscopio de luz polarizada. Se lleva a cabo el conteo de micronúcleos por cada 200 células.

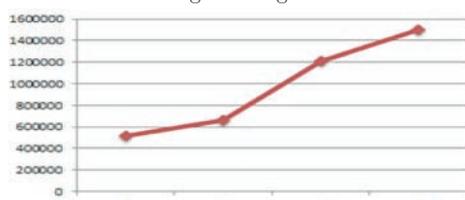
RESULTADOS

Según los cuestionarios realizados se encontró que la edad en donde había más presencia de la enfermedad era entre los 41-50^a en un 40%, la mayor parte de las pacientes estaban casadas en el 80%, en cuanto a la escolaridad se encontró que la mayoría (80%) sólo contaban con primaria y secundaria en tanto que el 20% restante tenía el nivel medio superior y superior. En cuanto al inicio de la vida sexual se observó que el 80% estaban en el rango de edad entre los 15-19^a mientras que el 20% se encontraba en el rango de los 20-25^a. En cuanto al número de embarazos se encontró que el 60% tenían entre 1-4 y el 40% restante más de 4. El número de partos de entre 1 a 4 fue de un 80% mientras que el 20% restante lo fue de más de 4. En cuanto al número de familiares afectados se mostró que en el 80% no estaban afectados mientras que en el 20% si lo estaban.

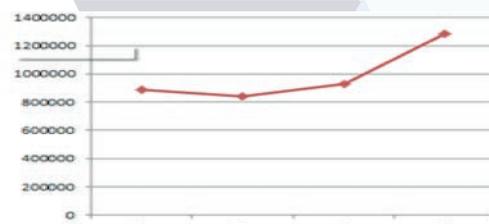
Según el crecimiento celular se obtuvieron las siguientes gráficas que muestran un crecimiento celular en ambas estirpes (linfocitos y epiteliales), teniendo más variaciones en cuanto las gráficas que se obtuvieron de las células epiteliales pues siguieron un crecimiento variado ya que influyeron diferentes factores como la toma de muestra que realizaban las propias pacientes y el ciclo menstrual en el cual se encontraban. No obstante todas las células en promedio mostraron un crecimiento celular en donde resalta una fase lag, exponencial y estacionaria.

En cuanto a los micronúcleos pudimos observar que se pudieron encontrar más en linfocitos que en las epiteliales, pues se encontró un 47.8% de micronúcleos en linfocitos en comparación con un 41.025% que fue encontrado en células epiteliales, en un campo de 200 células.

A continuación las siguientes gráficas mostrando los resultados obtenidos:

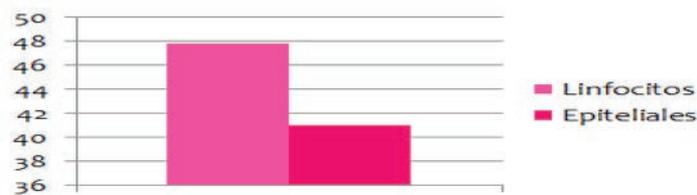


X: Días
Y: Número de Células
Crecimiento celular de Linfocitos



X: Días
Y: Número de células
Crecimiento celular epitelial

a) Gráfica de los promedios de el crecimiento de linfocitos y epiteliales.



b) Gráfico de conteo de micronúcleos expresado en porcentaje.

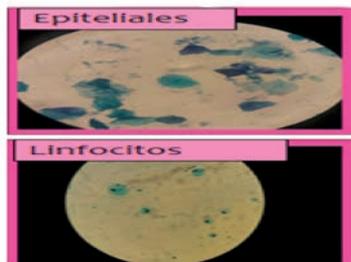


Figura c). Se observan los micronúcleos en linfocitos y en células epiteliales de la misma paciente.

CONCLUSIONES

La adquisición del virus del papiloma humano es frecuente en la sociedad y es un determinante para el desarrollo de cáncer cervicouterino. La búsqueda de métodos de diagnóstico oportunos es un importante avance en la medicina de prevención ya que disminuye los costos de enfermedad en Salud Pública. La utilización de micronúcleos como biomarcador a fin de dar un escrutinio temprano a la enfermedad es un avance importante para reducir la incidencia del cáncer cervicouterino que cada año ocurre en 23.3 casos por cada 100000 mujeres en México. Finalmente se concluye que los factores del entorno pueden ser modificados a fin de disminuir la incidencia de la enfermedad, como lo son la edad de inicio de vida sexual, el número de parejas sexuales y el nivel de escolaridad, pues si se instruye y se educa a la población en cuanto a esta enfermedad, modo de contagio, maneras de prevención y métodos de escrutinio, las mujeres estarán más informadas y tendrán más armas para llevar a cabo una medicina preventiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD (2009). «Cérvix: premalignant and malignant neoplasias». En Saunders (Elsevier). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (8th edición).
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM (1999). «Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide». J. Pathol. 189 (1): 12-19.
3. Schiffman M, Castle PE (August de 2003). «Human papillomavirus: epidemiology and public health». Archives of Pathology & Laboratory Medicine 127 (8): 930-934.
4. Zalacain, M; Sierrasesúmaga, L; Patiño, A (2005). «El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos». Anales del Sist San de Navarra 28 (2).
5. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougin C, Prétet J (2006). «Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions». J Clin Virol 35 (3): 270-7.
6. Park J, Sun D, Genest D, Trivijitsilp P, Suh I, Crum C (1998). «Coexistence of low and high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix: morphologic progression or multiple papillomaviruses?». Gynecol Oncol 70 (3): 386-91.
7. Secretaría de Salud (2015). Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cervicouterino. Diario Oficial de la Federación última actualización 21 de junio del 2017.

EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE LA DENTINA DESPUÉS DEL USO DE ÁCIDO ETILENDIAMINO TETRAACÉTICO (EDTA) AL 10% Y 17% COMO AGENTE DE IRRIGACIÓN EN LA TERAPIA ENDODÓNTICA, POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y ESPECTROSCOPIA RAMAN.

Sánchez Medina Juan Gerardo 1 y Méndez Gonzales María Verónica 2

RESUMEN

El tratamiento de conductos dependen del desbridamiento mecánico del sistema de conducto radicular, pero la instrumentación puede mejorar su resultado si se utilizan ciertas sustancias químicas, los irrigantes. El EDTA es uno de estas sustancias, pero este tiene una propiedad quelante la cual puede modificar la composición química y microestructura de la dentina. Se decidió evaluar por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia Raman dichas modificaciones en dientes instrumentados usando como agente de irrigación al EDTA al 10% y 17%, se establecieron dos grupos cada uno de diez dientes anteriores. De cada grupo se seleccionaron tres muestras al azar y fueron las que se sometieron a las lecturas al MEB Y Raman. En los resultados se aprecian cambios en la microestructura mientras que la composición química se aprecia sin cambios.

ABSTRACT

Treatment of ducts depends on the mechanical debridement of the root canal system, but instrumentation can improve its outcome if certain chemicals, the irrigators, are used. EDTA is one of these substances, but it has a chelating property which can modify the chemical composition and microstructure of the dentin. It was decided to evaluate, by means of Scanning Electron Microscopy (SEM) and Raman Spectroscopy, these modifications in instrumented teeth using 10% and 17% EDTA as the irrigating agent, two groups each of ten anterior teeth were established. From each group, three random samples were selected and were subjected to the MEB and Raman readings. The results show changes in the microstructure while the chemical composition is observed unchanged.

Palabras Clave: Irrigantes, EDTA, dentina, Espectroscopia Raman, MEB.

INTRODUCCIÓN

Una enfermedad pulpar, que tenga las características que no puede sanar por sí sola, requiere de manos expertas para realizar el tratamiento de endodoncia. Debemos tener en cuenta que nos enfrentamos a un sistema de conductos, y que en la preparación biomecánica solo podremos acceder “mecánicamente” al conducto principal, por lo tanto, requerimos de un elemento que vaya a penetrar al resto del sistema de conductos para mejorar la situación.

La instrumentación de los conductos radiculares mediante técnicas manuales o mecanizadas son incapaces de conseguir una completa eliminación de las bacterias de su interior. Se precisa la irrigación con soluciones capaces de mejorar la limpieza de las paredes del conducto y de destruir las bacterias presentes en ellos. En la actualidad existe en el mercado una amplia gama de irrigantes para uso endodóntico, siendo algunos de los más utilizadas aquellos que contiene EDTA y NaClO. Su uso es necesario por todas las características que nos aportan durante nuestro tratamiento, partiendo de lo más básico que sería el arrastre mecánico del detritus como la desinfección del sistema de conductos.

La concentración, la temperatura, la frecuencia de aplicación y los métodos de suministro de los irrigantes, junto con el tiempo son objetivo de la investigación continua, ya que estas sustancias no solo atraen beneficios sino que también pueden modificar la estructura de los tejidos del órgano dentario lo cuál, podría traer consigo futuras complicaciones.

Es por esto que se plantea el uso de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) como agente de irrigación en la terapia endodóntica al 10% y 17% para demostrar cómo es que esto influye en la modificación de la superficie dentinaria, y con esto el clínico pueda establecer un criterio sobre cual concentración es la más adecuada al igual que se asegure un éxito en el tratamiento.

MARCO TEORICO

Las terapias actuales en el tratamiento de conductos dependen del desbridamiento mecánico del sistema de conducto radicular, pero la instrumentación mecánica por sí sola no puede remover todos los microorganismos de este sistema ni todos los remanentes del tejido orgánico de las paredes del conducto radicular, así que para completar la instrumentación y mejorar su resultado se utilizan ciertas sustancias químicas, los irrigan-

tes. El papel del irrigante es importante, ya que desempeña un rol protagónico en la preparación ideal de la superficie de la dentina. 1

Idealmente, los irrigantes químicos deben tener efecto antibacteriano, lubricante, no tóxico, producir una mínima destrucción a la estructura dental, proporcionar la disolución de materiales orgánicos e inorgánicos, y ser relativamente conveniente y fácil de usar. [1, 2, 3]

Se han propuesto varios protocolos de irrigación al intentar lograr el desbridamiento eficaz de las paredes del conducto radicular, varios de ellos modifican factores que pueden influir en su eficacia, tales como la distancia entre la punta de la aguja y el tope apical, el tiempo dedicado al riego y la cantidad y calidad del irrigante. Incluso hay protocolos en los que se usan más de una sustancia irritante. [4]

Sin embargo, actualmente no existe una única solución de irrigación que cumpla con todos los requisitos para una solución de irrigación óptima. Usando una combinación de productos en la secuencia correcta y la técnica de riego contribuye a un resultado de tratamiento exitoso. [5]

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es actualmente el irrigante endodóntico más utilizado, debido a sus propiedades antibacterianas y su capacidad de disolver los tejidos orgánicos. 1,5 La principal desventaja de NaOCl es su incapacidad para eliminar la porción inorgánica de barrillo dentinario. Por esta razón, se recomienda la combinación de NaOCl con EDTA. [1]

El EDTA se sugiere a menudo como una solución de irrigación, ya que puede quelar y eliminar el componente inorgánico de escombros de intracanal y se utiliza generalmente a una concentración de 17%. EDTA es un acrónimo utilizado para el ácido etilendiaminotetraacético, compuesto químico. Es un ácido carboxílico poliamino con la fórmula $[\text{CH}_2 \text{N} (\text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{H})_2]_2$. EDTA parece reducir la actividad antibacteriana y disolvente de hipoclorito, por lo que estos dos líquidos no deben estar en el canal al mismo tiempo. Por ello, durante la preparación mecánica se utiliza un lavado abundante y frecuente con hipoclorito de sodio, mientras que el EDTA se utiliza al final de la fase de preparación para eliminar completamente los restos inorgánico y barrillo dentinario de las paredes del canal. [1,3]

Su prominencia como un agente quelante surge de su capacidad de “secuestrar” iones metálicos di- y tri-catiónicos tales como Ca^{2+} y Fe^{3+} . Después de ser obligados por EDTA, los iones metálicos permanecen en solución pero exhiben reactividad disminuida. [3] En la dentina radicular, el EDTA reacciona con los iones de calcio de los cristales de hidroxiapatita y forma quelatos de calcio solubles. Este proceso puede causar cambios en la microestructura de la dentina y los cambios en la relación de calcio - fósforo. Se ha informado de que el EDTA descalcifica la dentina a una profundidad de 20-30 micras en 5 min. El proceso de descalcificación es auto-limitante, porque el quelante se agota. [5, 6]

La dentina es el tejido conectivo mineralizado que ocupa la mayor parte del diente, está cubierta por el esmalte en la porción de corona y el cemento en la parte de la raíz. Químicamente está conformada por 50% de su volumen de material mineral; cristales de hidroxiapatita, y pequeñas cantidades de fosfatos, carbonatos, sulfatos, y elementos tales como flúor, cobre, zinc y hierro, 35-30% de material orgánico; Colágeno tipo I dispuestos en pequeños paquetes, que a su vez están unidas por sustancias amorfas de naturaleza glicoproteína, tales como lípidos, glucosaminoglicanos y compuestos de proteínas no identificadas y 20-15% es fluido; similar al plasma sanguíneo, pero peor definido. [7, 8, 9, 10]

La microestructura de la dentina está conformada en su mayoría por túbulos dentinarios, los cuales son los encargados de alojar los procesos odontoblásticos y de recorrer la dentina desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria (DEJ). La dentina que recubre estos túbulos es llamada dentina peritubular la cual está hipermineralizada, en tanto que aquella entre los túbulos es llamada dentina intertubular formada principalmente por colágeno tipo I que engloba cristales de hidroxiapatita y fluido dentinario. Los túbulos varían en número y pueden representar desde el 1% (0.8 mm de diámetro) del área total de la superficie de la dentina junto a la DEJ y aumentar en dirección a la pulpa hasta el 22% (2.5 mm de diámetro) del área total de superficie de la dentina (Pashley et al., 1989). Esta organización determina un comportamiento anisotrópico de la dentina, es decir, las propiedades del sustrato difieren según la dirección considerada. [9, 10]

Durante un tratamiento endodóntico la dentina intraconducto es la que se ve afectada tanto por la instrumentación mecánica como por la interacción con el irrigante, teniendo en cuenta que una de las características del irrigante ideal es producir una mínima destrucción a la estructura dental, así como las propiedades del EDTA, se decidió realizar este estudio para conocer que tanto se ve afectada la composición química y la microestructura de la dentina, todo esto evaluándose mediante el MEB y espectroscopia Raman.

La Espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis está relacionado con vibraciones de enlaces moleculares, básicamente la luz dispersa por un material al incidir sobre él, un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. En el caso de la dentina la radiación de fluorescencia espectroscopia es alta, relacionado con la vibración de los componentes orgánicos. Gracias a la composición química de la dentina se hace posible establecer un valor estándar de ésta, bajo la Espectroscopia Raman 961cm^{-1} de desplazamiento para hidroxiapatita, los fosfatos 1071cm^{-1} y el colágeno en $1260, 1453$ y 1667cm^{-1} [8]

MÉTODOS Y MATERIALES

Este estudio fue realizado en Laboratorio de Microbiología de la Maestría de Endodoncia de la UASLP y en el Laboratorio de la Preclínica de la Maestría de Endodoncia de la UASLP, se inició con la recolección de muestras, 23 dientes anteriores los cuales debían ser unirradiculares, libres de caries, con raíces rectas y sin variantes anatómicas, se excluyeron aquellos con dos o más conductos, raíces con presencia de fisuras y dientes con raíces menores a 13mm. Una vez obtenidas el total de las muestras se mantuvieron bajo humedad absoluta. Posteriormente se limpiaron con ayuda de un bisturí para la eliminación de los restos de tejidos blandos y sarro. Fueron descoronados con un disco de diamanté para obtener una raíz mayor a los 13 mm. de longitud. Se almacenaron bajo humedad absoluta. Para las pruebas de irrigación con EDTA se establecieron dos grupos: GRUPO I: 10 dientes / EDTA 10% y GRUPO II: 10 dientes / EDTA 17%. GRUPO CONTROL: 3 dientes / solución salina.

Instrumentación: A todas las piezas dentales se les toma una radiografía periapical para verificar la presencia de un solo conducto, los dientes seleccionados fueron aleatorizados por medio de una aleatorización simple, 10 dientes para cada grupo de estudio. Con una Lima tipo K#15 (Desnply® Maillefer) se verificó que conducto tuviera patencia, la longitud se tomó restando un milímetro de la salida de la lima por el foramen apical dicha lima se tomó como Odontometría, se instrumentó siguiendo la técnica lateral modificada llegando hasta la lima tipo K#30 (lima maestra) para después realizar el retroceso y terminar con la lima K#50, por último se aliso con la lima Hedstroem (Desnply®Maillefer), la inmediata menor a la lima maestra. Entre cada instrumento se fueron irrigando 2 mL de la solución problema con una jeringa de 5mL y aguja Endoeze (Ultradent®) realizando movimientos corono-apical a 1 mm de la longitud de trabajo. Continuando con el protocolo de irrigación, al final cada muestra fue irrigada con 5 mL de solución salina para eliminar el exceso de solución de estudio y posteriormente el conducto se secó con puntas de papel. La muestra se mantuvo bajo humedad relativa, está se envolvía con un algodón humedecido. Lo anterior se realizó en cada uno de los grupos.

Preparación de las Muestras para lectura al MEB y RAMAN: Una vez obtenidas las diez muestras de cada grupo (GRUPO I / EDTA 10% y GRUPO II / EDTA 17%), se seleccionaron al azar 3 muestras de cada grupo para ser preparadas para lectura al MEB Y RAMAN. La preparación de dichas muestras requirió de la división en dos mitades a lo largo del eje corono apical, se llevó a cabo con la ayuda de pieza de baja velocidad, disco de diamante cuatro luces, un cincel y martillo. Obtenidas las mitades de las piezas trabajadas se colocaron en un Desecador, el cual contenía en la parte inferior del de sílice, para que las muestras perdieran la mayor humedad posible, estas se mantuvieron ahí por dos días. Las muestras obtenidas se codificaron según la Tabla 1.

Tabla. 1. Cada No. de muestra representa una pieza trabajada, A y B son cada una de las mitades obtenidas después del corte. La selección de muestras en cada grupo fue al azar.

| GRUPO I / EDTA 10% | | | GRUPO II / EDTA 17 % | | |
|--------------------|-----|-------|----------------------|-----|-------|
| No. de Muestra | MEB | RAMAN | No. de Muestra | MEB | RAMAN |
| 2 | 2A | 2B | 2 | 2A | 2B |
| 3 | 3A | 3B | 5 | 5A | 5B |
| 10 | 10A | 10B | 7 | 7A | 7A |

En cuanto al grupo control, cada una de las 3 piezas fue sometida al proceso anterior.

Posterior a los dos días en el desecador las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf para su traslado. En el caso de las muestras que serían leídas con el MEB fueron sometidas a un baño de oro.

Espectroscopia Vibracional Raman y MEB: Esta Fase fue elaborada en el centro de investigación de Óptica A.C (Unidad de Aguascalientes), en donde se realizaron las lecturas en las muestra por Espectroscopia Vibracional Raman. Se llevaron a analizar un total de 6 muestras las cuales fueron observadas mediante un microscopio óptico (LEICA DMLM) que se encuentra integrado en el sistema Micro-Raman Renishaw modelo 1000B. Además de las muestras también se obtuvo el espectro de la dentina de 3 muestras control. Antes de la lectura de los espectros de la muestra se realiza la calibración del sistema Micro-Raman Renishaw usando como referencia una oblea de silicio cristalino a 520cm⁻¹. El sistema presenta un láser diodo de 830 nm el cual es dirigido a la muestra previo enfoque con el objetivo 50x del microscopio incorporado al Sistema Raman. La potencia del láser sobre la muestra fue de 12.5 mW con un tiempo de exposición de 30 segundos sobre la dentina intraconducto. El análisis se realiza en un Rango espectral de 100 a 2000 cm⁻¹. Cada una de las muestras fue leída a los 3 mm y 6 mm de CDC. Las lecturas al Microscopio electrónico de barrido (MEB) fueron realizadas en las instalaciones del Instituto de Metalurgia de la UASLP con el equipo Philips FEI modelo XL-30-PW6630/01. Se obtuvieron vistas a 300x, 1000x y 2000x, siendo está última en donde se aprecian mayores cambios. Cada una de las muestras fue leída a los 3 mm y 6 mm de CDC. Todas las lecturas fueron almacenadas en un CD para su posterior uso.

RESULTADOS

Como se presenta en la Figura. 1 ,correspondiente a las lecturas al MEB la microestructura de la dentina después del uso de EDTA en las diferentes concentraciones se ve alterada en comparación al grupo control, quedando los tubulillos más permeables, esto podría atribuírsele a la propiedad quelante del EDTA, gracias a la cual se elimina el lodillo dentinario. En cuanto a las lecturas al Raman (Figura. 2) no se observaron diferencias ya que el pico de interés (961 cm^{-1}) [8] aparece similar tanto en el control como en el resto de las muestras problema, por lo que la composición química no se ve alterada después del uso del irrigante. Las lecturas obtenidas apoyarían que el EDTA se utilice al final en un protocolo de irrigación tanto al 10% como al 17% [1,3], ya que no se apreciaron muchas diferencias en los grupos, y en un tiempo reducido ya que altera la microestructura de la dentina.

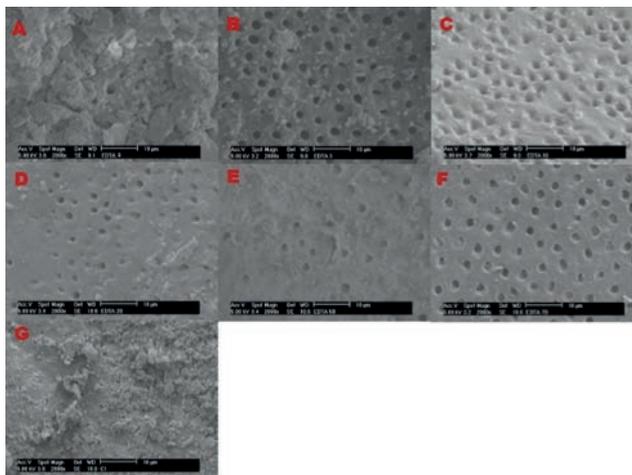


Figura 1. Vista de las lecturas al MEB a 2000x, se tomaron a 6mm de CDC. A) Muestra 2A EDTA 10%, B) Muestra 3ª EDTA 10%, C) Muestra 10A EDTA 10%, D) Muestra 2A EDTA 17%, E) Muestra 5A EDTA 17% F) Muestra 7ª EDTA 17%, G) Muestra Control solución salina. En comparación con el control G, se observa en todas las muestras como los tubulillos están más permeables después de la irrigación con EDTA, esto independiente a la concentración.

CONCLUSIONES

La microestructura de la dentina y su composición química se puede ver alterada después del uso de agentes de irrigación en la terapia endodontica. El EDTA que es uno de estos agentes y como se observa en los resultados de este estudio la modificación en la microestructura de la dentina es considerable, mientras que la química no presenta cambios, esto a concentraciones de 10% y 17%. Lo anterior podría apoyar el uso clínico de ambas concentraciones, ya que tienen el mismo efecto en la remoción del lodillo dentinario, aunque también podría apoyar el uso de la combinación de NaOCl con EDTA, esto para que el EDTA se utilice solamente al final del protocolo y la microestructura no se vea afectada en gran medida.

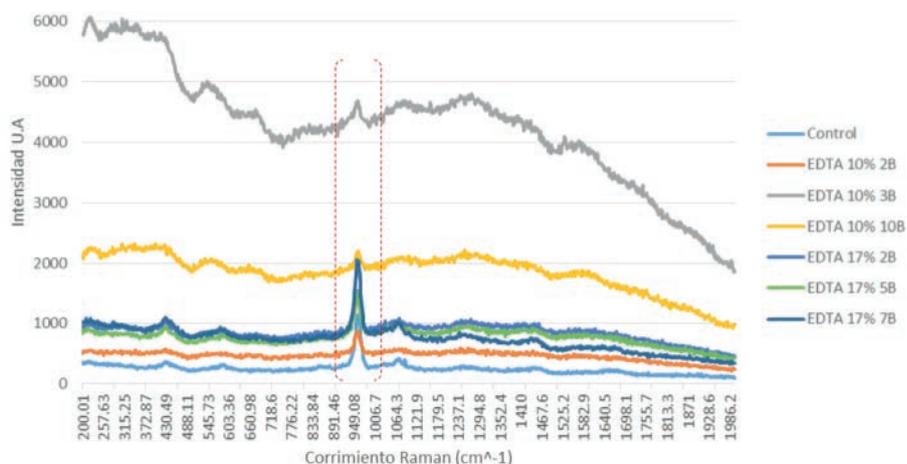


Figura 2. Se presentan los espectros Raman obtenidos de cada una de las muestras a los 6 mm de CDC. Dentro de los corchetes punteados se observa el pico de interés.

BIBLIOGRAFIA

1.-Plotino, Gianluca, Cortese, Teresa, Grande, Nicola M., Leonardi, Denise P., Di Giorgio, Gianni, Testarelli, Luca, & Gambarini, Gianluca. (2016). New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. Brazilian Dental Journal, 27(1), 3-8. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201600726>

- 2.- CASTAGNA, FABRICIA. ; RIZZON, PATRICIA. ; ABREU DA ROSA, RICARDO. et al. Effect of Passive Ultrasonic Instrumentation as a Final Irrigation Protocol on Debris and Smear Layer Removal—A SEM Analysis. En: *Microscopy research and technique* Vol.76:496–502. 2013.
- 3.- Basrani, B. and Haapasalo, M. (2012), Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Topics*, 27: 74–102. doi:10.1111/etp.12031
- 4.- YEUNG, WILLIAM. ; PONTES, RALDI, DENISE. ; SANCHES, CUNHA, RODRIGO. ; MELLO, ISABEL. Assessment of smear layer removal protocols in curved root canals. En: *Aust Endod J*; Vol. 40: 66–71. 2014
- 5.- Agrawal Vineet S, Rajesh M, Sonali K and Mukesh P. A Contemporary Overview of Endodontic Irrigants – A Review. *J Dent App*. 2014;1(6): 105-115. ISSN:2381-9049
- 6.- Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic Acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. *J Endod*. 2010;36:1385–8.
- 7.- Marshall Jr GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997;25:441–58.
- 8.- De Oliveira, A., S. da S. C., T., de Carvalho, R., Silva, L., Corat, E. and Abrahão, A. (2017). Estudo dos Componentes da dentina humana por diferentes sistemas de espectroscopia raman. [ebook] Urbanova, São José dos Campos, SP, Brasil, pp.1-2. Available at: http://www.researchgate.net/publication/264877095_ESTUDO_DOS_COMPONENTES_DA_DENTINA_HUMANA_POR_DIFERENTES_SISTEMAS_DE_ESPECTROSCOPIA_RAMAN&usq=AFQjCNGS7Xc7mPJPj71NuQNTa_EjqGO4g [Accessed 15 Jun. 2017].
- 9.- Fuentes Fuentes, M^a V.. (2004). Propiedades mecánicas de la dentina humana. *Avances en Odontostomatología*, 20(2), 79-83. Recuperado en 14 de julio de 2017, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852004000200003&lng=es&tlng=es.
- 10.- Montoya Mesa, C. and Ossa Henao, E. (2014). Composición química y microestructura de la dentina de pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Materiales*, [online] 5, pp.73-78. Available at: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/materiales/issue/view/1749/showToc> [Accessed 13 Jun. 2017].

ANÁLISIS DE MORTALIDAD ASOCIADA A VIRUS DE INFLUENZA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA POR REGIONES DE LA REPÚBLICA MEXICANA

Gerardo Rivera Alfaro¹ y Daniel Ernesto Noyola Cherpitel²

RESUMEN

A pesar de las medidas que se han tomado para reducir la morbilidad y mortalidad por influenza, la enfermedad continúa siendo un problema de salud pública. Esto se observa principalmente en países en vías de desarrollo y en ciertos grupos de riesgo, entre los que se incluye la población menor de 5 años. El comportamiento epidemiológico del virus presenta variaciones determinadas por factores geográficos, climáticos, entre otros. Tomando en cuenta la diversidad de condiciones geográficas en México, no es adecuado asumir que la enfermedad es homogénea en todo el país. El objetivo de este trabajo fue estimar la mortalidad atribuible a influenza en menores de 5 años de edad durante los años 1998-2015 en distintas regiones de la República Mexicana.

ABSTRACT

Despite the measures that have been implemented to reduce morbidity and mortality associated to influenza virus, the disease continues to be a public health problem. This is more evident in low-income countries and in some age groups, such as children younger than 5 years old. The viral epidemiologic behavior shows variations determined by geographical and climatic conditions, among other factors. Taking into account the diverse geographical conditions in Mexico, it is inappropriate to assume that the disease is uniform across the country. The objective of this study was to estimate influenza-attributed mortality in children younger than 5 years of age throughout the years 1998-2015 in different regions in Mexico.

Palabras Clave: Influenza, México, mortalidad, niño.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAS) se definen como afecciones al sistema respiratorio en las cuales está involucrado algún microorganismo patógeno. Estas infecciones se clasifican en las que afectan al sistema respiratorio superior (nariz, laringe y senos paranasales) y las que afectan al sistema respiratorio inferior (tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos). Las IRAS son la afección infecciosa más común en menores de 5 años en todo el mundo. Aunque en la mayoría de las ocasiones estas infecciones no conllevan a consecuencias graves, hay casos que pueden complicarse con neumonía y bronquiolitis.

La etiología de las IRAS depende en gran medida del sitio de localización de la infección (vía aérea superior o inferior) ya que cada patógeno requiere condiciones diferentes para sobrevivir. Debido a las características que posee el sistema respiratorio, se estima que hasta el 80% de las IRAS son causadas por agentes virales. Algunos ejemplos de ellos son: el virus sincicial respiratorio, rinovirus, parainfluenza, influenza, metapneumovirus humano, adenovirus, coronavirus y bocavirus. Sin embargo, en gran parte de los casos la identificación del agente específico no se realiza de forma sistemática, dado que la detección de virus no está disponible en gran parte de los centros hospitalarios. Las herramientas de diagnóstico virológico están confinadas a los centros más especializados de nuestro país.

Los virus de la influenza de significancia epidemiológica se clasifican en A o B. Los del tipo A siguen una nomenclatura dependiendo de los antígenos de superficie que presente el patógeno (hemaglutinina y neuraminidasa). Los virus de influenza siguen un comportamiento estacional que generalmente predomina en las temporadas invernales. Esto conlleva al incremento en el número de consultas médicas, hospitalizaciones, uso de antibióticos y ausentismo escolar en niños, así como laboral en los adultos. En un estudio donde se identificó el agente causal de la enfermedad, se detectó que el virus de influenza B fue el que más se relacionó a ausentismo escolar. Sin embargo, en general el virus de influenza A se asocia a epidemias de mayor impacto en la salud de la población.

Existen diversos factores de riesgo que impactan en la mortalidad asociada a influenza. La presencia de enfermedades previas a la infección, población menor de 5 años (en particular menores de 6 meses), coinfección bacteriana y circulación activa de cepas del virus del subtipo H3N2, son algunos que se han reportado en diversos estudios. También de importancia y ya frecuentemente reportado en la literatura es el nivel socioeconómico de las comunidades.

La vacunación en la población mexicana juega un papel crucial en el comportamiento del virus de influenza. Es importante analizar la conducta regional del virus y, con base en ello, tomar medidas necesarias para poder así disminuir la transmisión y como última meta las consecuencias que conlleva la infección.

MÉTODOS Y MATERIALES

La información obtenida para el estudio se encuentra disponible y con acceso libre en las páginas web de la Secretaría de Salud y de otras instituciones (CONEVAL, CONAPO e INEGI). A partir de estas fuentes se extrajo información para generar bases de datos de trabajo con las cuales se realizó el análisis.

La mortalidad general por año en niños menores de 5 años fue obtenida de la página web de la Dirección

General en Información en Salud, perteneciente a la Secretaría de Salud. Se obtuvieron 18 bases de datos correspondientes a cada uno de los años comprendidos entre 1998 y 2015. Posteriormente, se hizo una depuración de cada archivo Microsoft Excel con el fin de eliminar indicadores que no fuesen necesarios para realizar el análisis. Los indicadores considerados como necesarios y que se mantuvieron en las bases de datos fueron:

- 1.- Año, mes y día de nacimiento.
- 2.- Sexo y edad al día de la defunción.
- 3.- Entidad, municipio, localidad y tamaño de la localidad de residencia habitual.
- 4.- Año, mes y día de defunción.
- 5.- Causa de defunción.
- 6.- Semana epidemiológica en la que ocurrió la defunción.

Subsecuentemente, se unificaron todas las bases de datos en un solo archivo para generar series de tiempo de mortalidad por enfermedades respiratorias y sobre mortalidad por neumonía e influenza (códigos J00-J99 y J09-J18 de la "International Classification of Diseases 10th revision" ICD-10, respectivamente).

Para realizar el cálculo de las tasas de mortalidad, se obtuvieron los datos de proyecciones poblacionales en menores de 5 años (hombres, mujeres y total) por estado a principio y a mitad de año elaborados por el Consejo Nacional de Población (CONAPO). A partir de las proyecciones a principio de cada año, se realizaron los cálculos correspondientes para estimar el incremento poblacional por semana epidemiológica. Esto con el fin de determinar la tasa de defunciones (con datos del Sistema Nacional de Información en Salud, SINAIS) ajustados a la tasa poblacional por cada 100,000 habitantes.

Las regiones utilizadas en el estudio se generaron mediante el análisis de los patrones de mortalidad observados en los diferentes estados utilizando el software de análisis estadístico EPIPOI. Para ello, se generó a partir de los datos reportados por el INEGI una base de datos con las coordenadas de cada entidad federativa y se introdujo al programa. Posteriormente, tomando como criterios los picos primarios de mortalidad a través de los años y la localización geográfica de cada estado, se agruparon las entidades con características similares y se generaron las siguientes siete regiones:

- 1.- Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán.
- 2.- Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Nayarit, Sinaloa y Sonora.
- 3.- Aguascalientes, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Zacatecas.
- 4.- Colima, Jalisco y Michoacán.
- 5.- Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí.
- 6.- Distrito Federal, México, Morelos, Puebla y Tlaxcala.
- 7.- Guerrero, Oaxaca y Veracruz.

Para el cálculo del exceso de mortalidad atribuible a la enfermedad nos basamos en las sugerencias establecidas por la Organización Mundial de la Salud. Tomando esto en consideración, aplicamos la misma metodología que en el estudio de Sánchez-Ramos y colaboradores utilizando el método de Serfling y se calculó el exceso de mortalidad por causas respiratorias atribuible a influenza. Además, se analizaron dos periodos de tiempo: el periodo previo a la inclusión de la vacuna contra influenza en el Programa Nacional de Vacunación en población pediátrica (1998-2004) y el periodo a partir de la inclusión de la vacuna de influenza en dicho programa (2004-2015).

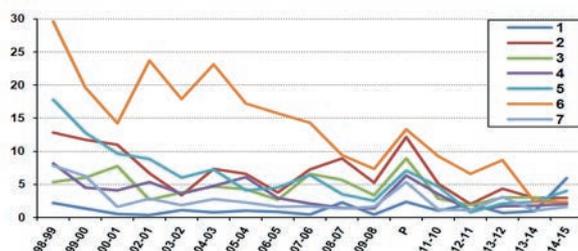
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis se incluyeron 89,610 defunciones registradas entre julio de 1998 y junio de 2015 en niños menores de 5 años. En la tabla 1 se muestra para cada región el número total de defunciones atribuibles a influenza y los promedios expresados en tasas por cada 100,000 habitantes. Para analizar el impacto del Programa Nacional de Vacunación, se separan los años en periodos previo y posterior a la inclusión de la vacuna en niños menores de 5 años. La mortalidad en todas las regiones, exceptuando la número uno, disminuyó sustancialmente cuando se compararon dichos periodos de tiempo. Además, representado en la figura 1 y excluyendo la pandemia ocurrida en 2009, se observa una marcada reducción en la mortalidad atribuida a neumonía-influenza. Es notable que mientras que mostraron gran variabilidad durante los primeros años del estudio, las cifras en todas las regiones son muy similares en el año 2015.

Tabla 1. Mortalidad atribuible a influenza.
Tasas por cada 100,000 habitantes y número total de defunciones.

| REGIÓN | Años 98-15 | Años 98-04 | Años 04-15 | Total |
|--------|------------|------------|------------|--------|
| 1 | 1.43 | 1.06 | 1.56 | 6,936 |
| 2 | 6.72 | 8.82 | 4.92 | 6,267 |
| 3 | 4.39 | 5.05 | 3.55 | 3,360 |
| 4 | 3.58 | 5.09 | 2.41 | 4,484 |
| 5 | 6.15 | 10.41 | 3.5 | 6,133 |
| 6 | 13.82 | 21.38 | 9.33 | 31,301 |
| 7 | 2.64 | 3.87 | 1.64 | 7,544 |

Figura 1. Mortalidad atribuible a influenza de 1998-2015 en cada región. Tasas por cada 100,000 habitantes.



En las figuras 2 a 4 se exponen los periodos de circulación del virus de influenza y el número de defunciones por cada 100,000 habitantes a lo largo de los años de estudio a nivel nacional y en dos de las regiones de estudio (región 1 y región 5). En estos gráficos pueden compararse las variaciones en la mortalidad con los periodos epidémicos del virus. En la región número 1, conformada por entidades con climas cálidos ubicadas en la región sur del país y la península de Yucatán, los picos en la mortalidad son poco evidentes. El patrón en dicha región resulta difícil de predecir por las pocas y no muy marcadas fluctuaciones que presenta la estacionalidad en mortalidad por causas respiratorias. En contraste, en la región 5 existe un aumento de mortalidad que empata al periodo de circulación viral. Este comportamiento ocurre de forma similar en el resto de las regiones para las que no se muestran los datos, así como en el total de los datos.

El comportamiento en la mortalidad está influenciado por un gran número de factores y a pesar de haber diversos estudios en el área, es muy complicado afirmar cuánto influye cada uno de estos. Los resultados obtenidos muestran que es evidente que los patrones en la mortalidad atribuida a neumonía-influenza difieren en distintas regiones del país. Por lo tanto, es conveniente analizar los datos de forma regional. Aunque en el promedio de todas las áreas se denota un patrón que empata a la circulación del virus a nivel nacional, el análisis global enmascara comportamientos heterogéneos que ocurren en zonas específicas. Dicho sesgo se puede eliminar si se analizan los datos de manera más individualizada.

La densidad de población a través de las regiones no es la misma. Por lo tanto, en trabajos relacionados a epidemiología, es inexacto comparar una región con otra considerando únicamente el número de casos. Como se ha especificado en otros estudios y para resolver esta problemática, justificamos realizar el análisis por tasas.

Existen múltiples teorías que intentan explicar el comportamiento variado de los datos en las regiones. Se ha establecido que en los climas cálidos, la temporalidad del virus se ve afectada por la temperatura y la dosis promedio de radiación solar en dichas áreas.

El índice socioeconómico familiar también juega un papel importante en la mortalidad. Se ha demostrado que un menor acceso a la salud contribuye a la vulnerabilidad en la población. Para un mejor entendimiento de la epidemiología de las infecciones causadas por virus de influenza sería interesante complementar el análisis regional incluyendo indicadores socio-económicos para cada región.

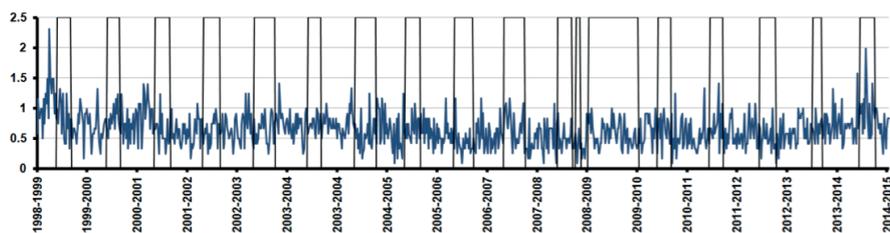


Figura 2. Mortalidad por causas respiratorias y periodos epidémicos de influenza en la Región 1.

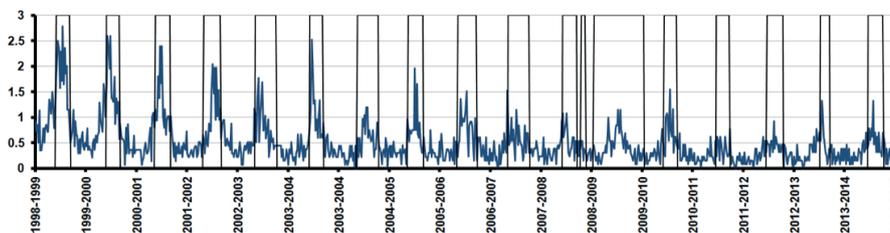


Figura 3. Mortalidad por causas respiratorias y periodos epidémicos de influenza en la Región 5.

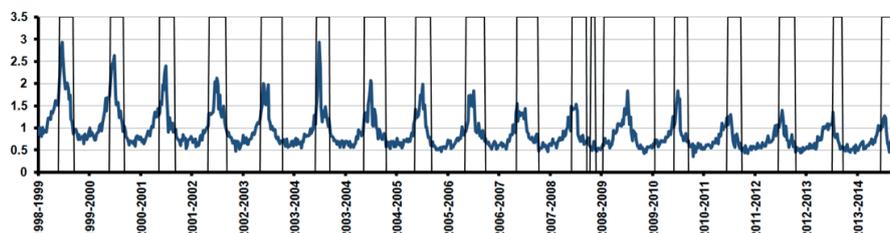


Figura 4. Mortalidad por causas respiratorias y periodos epidémicos de influenza a nivel nacional.

CONCLUSIONES

En conclusión, la mortalidad atribuida a influenza en menores de 5 años de edad presenta un comportamiento heterogéneo en México. Es necesario tomar medidas de salud pública regionalizadas con el fin de disminuir la mortalidad infantil, ya que los determinantes en cada entidad federativa pueden variar y, por lo tanto, los recursos requeridos y las medidas apropiadas son diferentes. Como acción ejemplar, la vacunación ha reducido en gran medida el impacto del virus en la población. Nuestros resultados muestran cómo la reducción en la mortalidad ha sido más marcada en ciertas regiones del país. Es necesario realizar estudios subsecuentes para identificar las condicionantes regionales de mortalidad para establecer medidas específicas que contribuyan a reducir la mortalidad infantil en el país.

BIBLIOGRAFÍA

CENAPRECE.SALUD.GOB.MX. “Plan nacional para la preparación y respuesta ante la intensificación de la influenza estacional o ante una pandemia de influenza”. Consultado en http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/emergencias/descargas/pdf/Plan_Nacional_Influenza.pdf (fecha de consulta 21-07-2017).

COMAS-GARCIA, A., GARCIA-SEPULVEDA, C. A., MENDEZ-DE LIRA, J. J., ARANDA-ROMO, S., HERNANDEZ-SALINAS, A. E., & NOYOLA, D. E. (2011). “Mortality attributable to pandemic influenza A (H1N1) 2009 in San Luis Potosi, Mexico” en *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 5, Núm. 2, [pp. 76-82]. doi:10.1111/j.1750-2659.2010.00187.x

CONAPO.GOB.MX. (2015). “Estimaciones y Proyecciones de la Población Por Entidad Federativa”. Consultado en http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones_Datos (fecha de consulta 21-07-2017).

CONEVAL.ORG.MX. “La cohesión social”. Consultado en http://www.coneval.org.mx/Medicion/Paginas/Cohesion_Social.aspx (fecha de consulta 21-07-2017).

CONSEJO NACIONAL DE EVALUACIÓN DE LA POLÍTICA DE DESARROLLO SOCIAL. (2014). *Metodología para la medición multidimensional de la pobreza en México* (segunda edición). México, DF: CONEVAL.

COUNIHAN, M. E., SHAY, D. K., HOLMAN, R. C., LOWTHER, S. A., & ANDERSON, L. J. (2001). “Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States” en *The Pediatric Infectious Disease Journal*, Vol. 20, Núm. 7, [pp. 646-653].

DIRECCIÓN GENERAL DE INFORMACIÓN EN SALUD. Bases de datos sobre defunciones. Secretaría de Salud. México. Consultado en http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/std_defunciones.html (fecha de consulta 21-07-2017).

FINELLI, L., FIORE, A., DHARA, R., BRAMMER, L., SHAY, D. K., KAMIMOTO, L., . . . UYEKI, T. (2008). “Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of *Staphylococcus aureus* coinfection” en *Pediatrics*, Vol. 122, Núm. 4, [pp. 805-811]. doi:10.1542/peds.2008-1336

JEFFERSON, T., RIVETTI, A., DI PIETRANTONJ, C., DEMICHELI, V., & FERRONI, E. (2012). “Vaccines for preventing influenza in healthy children” en *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Núm. 8, [CD004879]. doi:10.1002/14651858.CD004879.pub4

LAXMINARAYAN, R., MILLS, A. J., BREMAN, J. G., MEASHAM, A. R., ALLEYNE, G., CLAESON, M., . . . JAMISON, D. T. (2006). “Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project” en *The Lancet*, Vol. 367, Núm. 9517, [pp. 1193-1208]. doi:10.1016/S0140-6736(06)68440-7

MCLEAN, H. Q., PETERSON, S. H., KING, J. P., MEECE, J. K., & BELONGIA, E. A. (2017). “School absenteeism among school-aged children with medically attended acute viral respiratory illness during three influenza seasons, 2012-2013 through 2014-2015” en *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 11, Núm. 3, [pp. 220-229]. doi:10.1111/irv.12440

PIOTROWSKA, Z., VAZQUEZ, M., SHAPIRO, E. D., WEIBEL, C., FERGUSON, D., LANDRY, M. L., & KAHN, J. S. (2009). “Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age” en *The Pediatric Infectious Disease Journal*, Vol. 28, Núm. 1, [pp. 25-29]. doi:10.1097/INF.0b013e3181861da0

ROSSITER, A., O'MORAIN, N. R., VARGHESE, C., & LANE, S. (2017). “Seasonal influenza vaccine uptake in a respiratory outpatients clinic” en *Irish Medical Journal*, Vol. 110, Núm. 2, [pp. 517].

SANCHEZ-RAMOS, E. L., MONARREZ-ESPINO, J., & NOYOLA, D. E. (2017). “Impact of vaccination on influenza mortality in children <5 years old in Mexico” en *Vaccine*, Vol. 35, Núm. 9, [pp. 1287-1292]. doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.038

SERFLING, R. E. (1963). “Methods for current statistical analysis of excess pneumonia-influenza deaths” en *Public Health Reports*, Vol. 78, Núm. 6, [pp. 494-506].

TRICCO, A. C., LILLIE, E., SOOBIAH, C., PERRIER, L., & STRAUS, S. E. (2013). “Impact of H1N1



on socially disadvantaged populations: summary of a systematic review” en *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 7, Núm Suppl 2, [pp. 54-58]. doi:10.1111/irv.12082

WANG, H., LIDDELL, C. A., COATES, M. M., MOONEY, M. D., LEVITZ, C. E., SCHUMACHER, A. E., . . . MURRAY, C. J. L. (2014). “Global, regional, and national levels of neonatal, infant, and under-5 mortality during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013” en *The Lancet*, Vol. 384, Núm. 9947, [pp. 957-979]. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60497-9

EPIDEMIOLOGÍA DE SALMONELLA SPP Y BRUCELLA SPP EN POBLACIÓN INFANTIL DE UNA REGIÓN NORTE CENTRO DE MÉXICO

Barajas Morales Gabriela Abigail y Silva Cazares Macrina Beatriz

RESUMEN

En el trabajo siguiente se ha tomado como caso de estudio la epidemiología de Salmonella spp y Brucella spp en la población infantil en la Escuela Primaria "6 de Enero del 1915" en la comunidad de San José de las Trojes, Matehuala, S.L.P., tomando una muestra por conveniencia de 19 voluntarios. Se tomaron muestras sanguíneas y éstas se analizaron con químicos de la marca BD Bioxon para reacciones febriles teniendo como resultado que el principal antígeno encontrado fue el Paratífico "B" con un 31% y el de menor porcentaje fue Brucella abortus con un 10.52%, estos resultados concuerdan con la estadística internacional, nacional y estatal, ya que se encuentra con mayor frecuencia Salmonella spp que Brucella spp en población infantil. Palabras clave; Epidemiología_infantil, Salmonella spp, Brucella spp, reacciones_febriles.

ABSTRACT

In the following work the epidemiology of Salmonella spp and Brucella spp in the children population in the "6 de Enero de 1915" Primary School in the community of San José de las Trojes belonging to the municipality of Matehuala, SLP, Taking a convenience sample of 19 volunteers (8 men and 11 women) representing 48.71% of the population of that school. Blood samples were taken from the sample of the population and analyzed with BD Bioxon brand chemicals for febrile reactions, with the result that the main antigen found was the "B" Particle with 31% and the lowest percentage was Brucella abortus with 10.52% of the total population sample, these results are consistent with international, national and state statistics, since Salmonella spp is more frequently found than Brucella spp in the child population.

Keywords; Childhood_Epidemiology, Salmonella spp, Brucella spp, febrile_reactions.

INTRODUCCIÓN

La fiebre se define como una temperatura rectal por arriba de 38°C, temperatura axilar por arriba de 37.5°C o temperatura timpánica por arriba de 38.2°C. Se considera fiebre a la elevación de la temperatura por arriba de la variación diaria normal la cual se modifica de acuerdo a la edad. (CENETEC, 2013)

La infección causada por microorganismos de diversas especies produce entre otros síntomas una marcada elevación de la temperatura, tal es el caso de la fiebre tifoidea. (Hernández, 2014) La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda de origen entérico producida por la Salmonella typhi, en raras ocasiones Salmonella paratyphi A, paratyphi B (Salmonella schottmuelleri) y Salmonella paratyphica C (Salmonella hirschfeldii) pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Estas salmonellas sólo afectan al ser humano. (Jurado et al, 2010)

El género Salmonella pertenece a la familia enterobacteriaceae, son bacilos gramnegativos, no encapsulados, flagelados, con fimbrias y pilis, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos que fermentan glucosa, maltosa y manitol (Figura 1). El periodo de incubación es generalmente de diez a catorce días, durante la primera semana de la enfermedad se presenta fiebre (40°C-40.5°C), malestar general, mialgias, cefalea, anorexia, dolor a la palpación abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, bradicardia a pesar de la fiebre, inyección conjuntival, piel deshidratada y letargia. En la segunda semana puede haber constipación o diarrea, roséola tifoídica (lesiones cutáneas discretas, pápulo, eritematosas, de 2 a 4 mm, inicialmente blancas posteriormente rosas y después de días desaparecen sin dejar cicatriz), y los síntomas respiratorios pueden progresar. Las complicaciones más comunes son hemorragia o perforación intestinal, colecistitis, hepatitis, delirio, confusión, coma y choque. El diagnóstico se realiza por hemocultivo, hemaglutinación pasiva, ELISA, entre otras. (Romero, 2007) Las reacciones febriles son un conjunto de pruebas que sirven como su nombre lo indica para diagnosticar enfermedades que cursan con fiebre, como Fiebre tifoidea (Salmonella), Brucelosis (fiebre ondulante, fiebre de Malta), la prueba de aglutinación de Widal es muy segura; es una aglutinación en tubo y los resultados se obtienen así: tífico H y paratífico A y B en 2 horas, tífico O en 24 horas y brucella abortus en 48 horas, se realiza a partir de la segunda semana de evolución de la enfermedad. (Poujol, 1996) El tratamiento de Salmonella typhi es el cloranfenicol, ampicilina y furazolidona. Actualmente se recomiendan cefalosporinas de tercera generación y quinolonas como ciprofloxacina y ofloxacina. (Romero, 2007)



Figura 1. Salmonella spp (CID, 2012)



Figura 2. Brucella spp (CID, 2012)

La brucelosis, conocida también como fiebre de Malta, fiebre ondulante, enfermedad de Bang o fiebre del Mediterráneo, es una zoonosis ocasionada por bacterias del género *Brucella*, cuyas especies patógenas para los animales son *B. Melitensis*, *B. Abortus*, *B. Suis*, *B. Canis* y *B. Ovis* que afectan preferentemente a cabras, vacas, cerdos, perros y ovinos; la *B. Melitensis* es la más común en el humano, siendo poco frecuente la *B. Canis*. (NOM 022, 1994) Las bacterias del género *Brucella*, de la familia brucellaceae, son cocobacilos gramnegativos de 0.5 a 0.7 µm. de diámetro y 0.6 a 1.5 µm. de longitud; aerobios, inmóviles, no esporulados, no encapsulados, oxidasa y catalasa positivos, y productores de ureasa y ácido sulfhídrico. (Romero, 2007) (Figura 2)

La brucelosis en el hombre se transmite por la ingesta de leche, sus productos y derivados contaminados, no pasteurizados, por contacto con productos, subproductos y desechos como tejidos o excreciones de animales enfermos, y por inoculación de brucelas o inhalación del polvo de corrales o mataderos, donde éstas se encuentran, y por transfusiones sanguíneas. (NOM 022, 1994) El tiempo de incubación es de una a tres semanas, produce cansancio muscular generalizado, escalofríos, sudoración vespertina, anorexia, mialgias, artralgias y el bazo se ve crecido. La fiebre se va elevando día a día hasta alcanzar 40°C o más, a las dos o tres semanas de evolución natural, la fiebre remite, y el paciente evoluciona asintóticamente por varios días, para después reaparecer la fiebre. El diagnóstico de brucelosis se realiza por medio de rosa de Bengala, aglutinación estándar, la aglutinación en la prueba con antígeno Rosa de Bengala, que demuestre anticuerpos específicos en el suero del paciente y nunca realizar el estudio en el plasma. Los medicamentos a utilizar en el tratamiento de la brucelosis, serán conforme al esquema que se seleccione, por ejemplo: rifampicina y trimetoprim con sulfametoxazol indicado en niños, mujeres embarazadas, después del primer trimestre, y ancianos. (Romero 2007)

Epidemiología de *Salmonella* spp

A nivel internacional, de acuerdo con el Boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se observa un incremento de 21.6 millones a 26.9 millones de casos de fiebre tifoidea, con más de 200 mil muertes por año. (Crump, J., Luby, S., & Mintz, E., 2004) La región de Latinoamérica tiene una incidencia media de fiebre tifoidea de 10 a 120 casos por cada 100 habitantes por año. (Buckle, G., Fischer, C., & Black, R, 2012)

La siguiente tabla representa las tasas de incidencia de la fiebre tifoidea por súper regiones en el año 2012. (Tabla 1)

Tabla 1. Incidencia de Fiebre Tifoidea por súper regiones. (Buckle et al, 2010).

| Súper región | Casos de Tifoidea | Persona-años (p-años) | Incidencia (episodios / 100 000 p-años) |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|---|
| Australia/Nueva Zelanda | 695.0 | 17 753 491.0 | 3.9 |
| América Latina, Sur | 68.0 | 65 718.0 | 103.5 |
| América del Norte | 7503.0 | 5 250 827 005.0 | 0.1 |
| Asia Pacífico | 388.0 | 1 021 033 000.0 | 0.0 |



Figura 3. Tifoidea, Distribución por entidades en México en 2007. Rangos: negro: > 20.0 x 100 000 hab.; gris: de 10.0 a < 20.0; blanco: < 10.0 (López, 2010)

Tabla 2. Distribución de casos nuevos de Fiebre Tifoidea y Paratifoidea por grupos de edad en México en 2016. (SSA, 2016)

| Edad | Fiebre Tifoidea | Fiebre Paratifoidea A |
|-------------|-----------------|-----------------------|
| < 1 año | 4 | 7 |
| 1 a 4 años | 39 | 23 |
| 5 a 14 años | 115 | 43 |

Tabla 3. Casos de fiebre tifoidea en San Luis Potosí, México. (DGE, 2017)

| Fiebre Tifoidea | | Fiebre Paratifoidea | |
|-----------------|-----|---------------------|----|
| 2016 | 390 | 2016 | 78 |
| 11° Semana 2017 | 180 | 11° Semana 2017 | 29 |

A nivel nacional se puede observar en la Figura 3 la distribución de tifoidea en las entidades en México, además en la tabla 2 se puede identificar la mortalidad por grupos de edad a causa de dicha enfermedad en el país en 2007. En el estado de San Luis Potosí se ha luchado para disminuir la mortalidad y los casos de fiebre tifoidea obteniendo buenos resultados (Tabla 3).

Epidemiología de *Brucella* spp

Si bien la prevalencia global de la brucelosis en el ser humano es desconocida, debido fundamentalmente al subdiagnóstico y a la subnotificación, se estima que a nivel mundial afecta a 500.000 personas al año, especialmente en países del área mediterránea, Arabia, India, México, América Central y Sudamérica. En América Latina, Argentina, Perú y México son los países con prevalencia más elevada. (DGE, 2013) A nivel nacional en la Figura 4, se puede observar la distribución de brucelosis en 2004, donde solo un estado es libre de esta enfermedad y en dos más, se encuentra erradicada. En la tabla 4, se puede identificar el número de casos nuevos de brucelosis infantil en México en 2016, tomando en cuenta que el total fue de 164 se puede decir que el porcentaje de brucelosis infantil es bajo. En el estado de San Luis Potosí hasta la tercer semana del 2017 se confirmaron 24 casos de brucelosis (Tabla 5)



Figura 4. Brucelosis. Distribución en México en 2004 (López, 2010)

Tabla 4. Distribución de casos nuevos de Brucelosis por grupos de edad en México en 2016. (SSA, 2016)

| Edad | Número de casos nuevos |
|-------------|------------------------|
| < 1 año | 1 |
| 1 a 4 años | 2 |
| 5 a 14 años | 7 |

Tabla 5. Casos de Brucelosis en San Luis Potosí, México. (DGE, 2017)

| | |
|----------------|----|
| 2016 | 73 |
| 3° Semana 2017 | 24 |

MARCO TEÓRICO

En el año 2006, Mussaret B et al en el artículo “Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular” publicado por la Revista Latinoamericana de Microbiología menciona; Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea.(Calva, 2006). En 2010, Jurado et al, en el artículo “Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas” publicado por la Revista Medicine por la UNAM, refieren la situación epidemiológica de Europa en respecto a los pocos casos existentes de fiebre tifoidea, pues afirman que los casos que se ven corresponden a personas que han viajado a zonas endémicas (África, Sudeste Asiático, América Latina) o que proceden de ellas.(Jurado et al,2010) Buckle et al, en el artículo “Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010” publicado en 2012 por J Glob Health, describen que El número total estimado de episodios de fiebre tifoidea en 2010 fue de 13,5 millones (rango intercuartil de 9,1-17,8 millones), estos resultados son comparables con el análisis más reciente de la morbilidad global de la fiebre tifoidea, que informó estimaciones brutas y ajustadas de 10,8 millones y 21,7 millones de episodios de fiebre tifoidea a nivel mundial en 2000.(Buckle et al,2012)

Vega et al, en el artículo “Brucelosis. Una infección vigente” publicado por Acta Médica Grupo Ángeles en 2008, refiere que; En nuestro país en el año de 2007 se registró un total de 2,057 casos de brucelosis (757 casos en hombres y 1,297 casos en mujeres) de los cuales el mayor número se encontró en Nuevo León, Jalisco y Guanajuato, el 90% de los casos fue producido por *B. melitensis*. (Vega, 2008) Cabrera et al, en su artículo “Vigilancia epidemiológica de la brucelosis humana en la Jurisdicción Sanitaria de Ecatepec” publicado en abril del 2014 por Investigación Materno Infantil, describe que; La brucelosis constituye una de las zoonosis más importantes en México; está distribuida en todas las entidades federativas, con un reporte promedio anual de tres mil casos. La última información disponible data del 2011, con 3 436 casos notificados, lo que representó una tasa de incidencia de 3.67 casos por 100,000 habitantes; ello refleja un incremento con respecto al 2010, ya que se presentaron 2.52 casos por 100,000 habitantes. (Cabrera, 2014) En la revista Salud Publica de México, versión publicada en agosto de 2014, García et al en su artículo “Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala”, menciona; En México, las estadísticas del año 2011 reportaron para el estado de Tlaxcala una tasa de incidencia de brucelosis humana de 14.3/100,000 habitantes, se considera que el número de registros de casos e infecciones asintomáticas puede ser mayor por diagnósticos imprecisos y subnotificación. (García, 2014)

METODOLOGÍA

La comunidad de San José de las Trojes se encuentra situada en el municipio de Matehuala, S.L.P. a 1630 metros de altitud, donde habitan 379 personas de las cuales 188 son hombres y 191 mujeres. El ratio de fecundidad de la población femenina es de 4.04 hijos por mujer. El reclutamiento de los niños para el estudio se realizó en la Escuela Primaria “6 de Enero del 1915” de dicha comunidad, se solicitó permiso a la directora del plantel y se obtuvo una respuesta positiva para iniciar el estudio. Se citó a los padres, madres y/o tutores que quisieran que sus hijos participaran voluntariamente, al ser una población pequeña se tomó una muestra por conveniencia con la cual se realizó un censo donde se incluye la totalidad de la población, la cual consistió en 19 voluntarios (8 hombres y 11 mujeres) representando el 48.71% de la población de la Escuela Primaria en el mes de octubre del año 2016. Los padres de familia firmaron un consentimiento informado otorgando la autorización para que sus hijos participaran en el estudio según lo indica la NOM 004. Se tomaron muestras sanguíneas por vía intravenosa a los niños manejando la NOM 003, éstas se analizaron con químicos de la marca BD Bioxon para reacciones febriles. Se generó una base de datos de acuerdo a los resultados de las muestras sanguíneas en el programa Microsoft Excel 2013 y mediante el programa IBM SPSS Statistics Versión 22 se realizó el análisis de datos y generación de gráficos.

RESULTADOS

Los resultados se clasificaron a base del porcentaje de antígenos presentes en las muestras por sexo. (Figura 5 y 6) Además, se generó una gráfica general donde se agrupan los resultados de ambos sexos para un mejor análisis. (Figura 7)

EXPERIENCIAS EN LA RESTRICCIÓN DE LÍQUIDOS DE PERSONAS EN HEMODIÁLISIS. UN ESTUDIO CUALITATIVO EN SAN LUIS POTOSÍ.

Andrea Cristina Montejano Alvaradol y Luis Eduardo Hernández Ibarra: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Enfermería y Nutrición, Av. Niño Artillero #130, Zona Universitaria. CP 78240, San Luis Potosí., S.L.P, México, correo: Andrea_montejano@hotmail.com, Eduardo_Ibarra@hotmail.com

RESUMEN

La hemodiálisis es el tratamiento más restrictivo en cuanto a la ingesta de líquidos y aumenta la dificultad de seguirla correctamente, por ello el objetivo del estudio fue conocer las experiencias que tienen las personas que asisten a hemodiálisis en San Luis Potosí en torno a la restricción de líquidos. Es un estudio cualitativo con diseño fenomenológico, se realizaron 18 entrevistas semiestructuradas y notas de campo como técnicas de recolección de la información, y análisis de contenido convencional para análisis de la información. Por ello al comprender las experiencias de las personas se podrá brindar un mejor manejo al tratamiento, el cual será reflejado con una ganancia de peso adecuada, disminución de las complicaciones y mejorar su calidad de vida.

ABSTRACT

Hemodialysis is the most restrictive treatment in terms of fluid intake and increases the difficulty of following it correctly. Therefore, the objective of the study was to know the experiences of people attending hemodialysis in San Luis Potosí around the restriction of Liquids. It is a qualitative study with phenomenological design, 18 semi-structured interviews and field notes were used as data collection techniques, and conventional content analysis for information analysis. Therefore understanding the experiences of people can provide better management of the treatment, which will be reflected with an adequate weight gain, decrease in complications and improve their quality of life.

Palabras clave: Restricción de líquidos; Enfermedad Renal Crónica; Hemodiálisis; Investigación cualitativa.

INTRODUCCIÓN

En el año 2015 se informó que aproximadamente el 10% de la población mundial padece enfermedad renal crónica (ERC) (OPS/OMS, 2015), es por ello que es considerado un problema en Salud Pública a nivel mundial y que ha incrementado tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

En México existen entre 8 y 9 millones de personas con ERC, de las cuales se calcula que aproximadamente de 100 a 130 mil requieren de un tratamiento sustitutivo, además es la tercer causa de muerte hospitalaria en el país en lo que va del 2016, donde las tasas de mortalidad cada vez van en aumento (INEGI, 2016).

En el estado de San Luis Potosí, las muertes por insuficiencia renal ocupan el lugar número 11 según el INEGI, con 220 defunciones al año.

La enfermedad se caracteriza por estadios dependiendo de la disminución de la función renal y es por ello que aumentan las medidas en el tratamiento, como viene siendo el tratamiento sustitutivo, en el cual se encuentra la hemodiálisis y es la terapia que más se aplica en los pacientes de San Luis Potosí. (Durán et al., 2014) Al igual que el tratamiento médico y nutricional, en este último donde se encuentra el tratamiento de la restricción de líquidos.

Evidencia y experiencia científica en otros países del mundo han reportado en estudios sobre la falta de adherencia al tratamiento nutricional como la restricción de líquidos, siendo esta la que más dificultad ocasiona a las personas que la padecen y la que menos se sigue, demostrado por el aumento de comorbilidades como la ganancia alta de peso entre las sesiones de hemodiálisis, aunado a ello aumento de las complicaciones de la enfermedad como insuficiencia cardíaca, edema pulmonar, edema cerebral, entre otros y por ello falla en el éxito del tratamiento, llevando en el mayor de los casos a la muerte. (Fernandes et al., 2015., Tovazzi & Mazzoni, 2012., A. F. Cristóvão, 2013., Malheiro Oliveira P et al., 2012)

Es por ello que se pretende que los resultados de esta investigación proporcionen información relevante que contribuya a mejorar la atención de las personas con enfermedad renal en tratamiento de hemodiálisis en la ciudad de San Luis Potosí, que nos permita conocer también cuáles son las barreras y factores sociodemográficos que dificultan la restricción de los líquidos y si cuentan con estrategias para poder llevarlo a cabo, todo ello desde la experiencia y voz de quienes padecen ERC.

Objetivo general

Obtener los resultados del presente estudio por medio del análisis de la información durante la estadía en el Verano de la Ciencia.

Objetivos específicos

- Realizar transcripciones de las entrevistas obtenidas durante la obtención de la información en formato Word.
- Establecer o identificar los códigos específicos para hallazgo dentro del análisis de las entrevistas de manera manual.
- Establecer o identificar las categorías en las que pertenezcan dichos códigos obtenidos del análisis de la información.

MARCO TEORICO

La restricción de líquidos

El control de la ingesta de líquidos es fundamental para el autocuidado de las personas con enfermedad renal en Hemodiálisis, debido a que la experiencia clínica ha mostrado que es el aspecto del tratamiento en ERC donde se produce mayor grado de incumplimiento. (Iborra Moltó et al., 2012)

Las personas que tienen tratamiento de diálisis tienen que controlar minuciosamente la ingesta de líquidos, especialmente si no orinan (anuria). Por lo general, los pacientes en hemodiálisis tienen un control más estricto que los que reciben diálisis peritoneal. (Massa et al., 2014)

Se establece que para aquellas personas que no orinan la recomendación de líquidos será únicamente de 600-1000ml y para los que están en estadio 5 se les recomienda ingerir la cantidad de diuresis de 24 horas con 500 ml adicionales. (K/DOQI, 2002)

La Ganancia de peso interdiálisis (GID) está directamente relacionada con la ingesta de los líquidos que se tenga, por ello es buen indicador de la adhesión a dicha restricción. Se establece que una ganancia de peso menor al 3% del peso seco existe un riesgo de malnutrición, y cuando es mayor al 5.7% el riesgo de mortalidad aumenta un 35%. (3-3.5kg). Se establece el criterio de adhesión que la GID no sobrepase 2.5 kg. (Iborra Moltó et al., 2012)

Una ingesta excesiva producirá una hipervolemia (aumento del agua corporal), dando como resultado un aumento en la presión arterial, problemas cardíacos y migración de los líquidos a lugares donde no debe estar como los pulmones (edema pulmonar), tejidos periféricos (edema o hinchazón en piernas, brazos, cara, etc.) aumentando así las complicaciones tanto de morbilidad como de mortalidad en el paciente. (K/DOQI, 2002)

MÉTODOS Y MATERIALES

El estudio es de tipo cualitativo con diseño fenomenológico, llevado a cabo en la ciudad de San Luis Potosí, SLP, en dos unidades de hemodiálisis de la capital del estado.

La elección de la muestra de estudio fue mediante un muestreo intencional. Se realizaron 18 entrevistas semiestructuradas durante las sesiones de hemodiálisis, las cuales fueron grabadas por medio de audio y notas de campo. Se les hizo saber los objetivos del estudio y su propósito por medio de un consentimiento informado que al aceptar participar fue firmado.

Durante el Verano de la Ciencia se llevó a cabo la transcripción de algunas de las entrevistas a formato Word al igual que las notas de campo, posteriormente se realizó el análisis de contenido convencional de la información obtenida, la cual se desarrolló de forma manual analizando renglón por renglón la información procedente de las transcripciones, describiendo a un lado del enunciado alguna reacción emocional o escribiendo sobre alguna palabra clave o frase que capturara lo que se dice en el enunciado o en la parte del texto donde se identificó algo importante, posteriormente se establecieron los códigos específicos para cada idea o hallazgo durante el análisis y finalmente se formaron las categorías propias para los resultados.

RESULTADOS

A continuación se presentan algunos de los resultados más importantes en este estudio, con la finalidad entender la influencia que tiene el fenómeno de la restricción de líquidos en el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

Categoría 1) Experiencia con la restricción de los líquidos

Los líquidos es la parte del tratamiento de la enfermedad renal crónica que menos adherencia se tiene por ser restrictiva, provocando dificultad para seguirla correctamente y provocando sentimientos a las personas como si fuera algo muy malo.

“El agua es mi peor enemigo porque si tomo mucha me hincho...” Ent. 6

“Es estarte reteniendo a algo que es muy necesario para vivir, pues la verdad si se te complica...” Ent. 13

Categoría 2) Momentos o situaciones en los que las personas seden a un mayor consumo de líquido

El calor es uno de los principales motivos que ocasionan mayor ingesta de líquido en las personas.

“... cuando hace calor se da bien harta sed, se desespera uno...me dijeron que tengo que venir con menos agua para la próxima sesión, pero ¿y si hace calor?” Ent. 4

Otro de los momentos donde las personas sienten libertad por tomar más agua se debe a la cantidad de líquido extraído durante la sesión de hemodiálisis.

“...cuando me pasa así, que me dejan medio kilo debajo si trato como de “si voy a tomar un poquito más de líquido”...porque sacaron más líquido que no era del necesario....si me doy mi gustito...tengo más libertad para tomarme algo...” Ent. 13

Categoría 3) Estrategias para evitar mayor ingesta de líquido

Se identificaron estrategias que las personas implementan para evitar sobrepasar la cantidad de líquido recomendado y así evitar una mayor ganancia de peso.

“...tomo en un vasito pequeño, así del chiquito y entro a echarme mis traguitos y si tengo mucha sed saco un cubito de hielo y me lo chupo y eso me ayuda un poco con la sed...” Ent. 5

“...las medicinas me las paso con saliva para no quemar el cartucho cuando quieras tomar otra cosa...” Ent. 2

Dichos hallazgos permitieron conocer como ha sido la experiencia de las personas que se encuentran en hemodiálisis con la restricción de los líquidos, en ese sentido coincide con las estrategias y dificultades encontradas por Cristóvão, y al igual que el trabajo de Tovazzi donde la gente experimenta sensaciones de desesperación, ansiedad, y dificultades para adherirse al tratamiento principalmente.

CONCLUSIONES

Es fundamental conocer la experiencia de las personas con enfermedad renal crónica en torno a la restricción de líquidos, este presente estudio ha permitido conocer diferentes formas en que la restricción influye en sus vidas, las acciones que llevan a las personas a tratar de adherirse más, para así evitar posibles complicaciones sobre la enfermedad.

Hay que reforzar y darle seguimiento a los conocimientos que son aportados por el profesional en salud hacia la persona con la enfermedad renal sobre el tratamiento que debe seguir, las estrategias que puede realizar y como llevarlo a cabo, favorecerá a mejorar la atención de estas personas y al cuidado de su salud.

BIBLIOGRAFÍA

Cristóvão, A. F. A. de J. (2013). “Dificultades y estrategias en el manejo del régimen terapéutico en el paciente renal crónico en hemodiálisis”. *Enfermería Nefrológica*, 16(4), 247–255.

Cristóvão, A. F. A. de J. (2015). “Eficácia das restrições hídrica e dietética em pacientes renais crônicos em hemodiálise”. *Rev Bras Enferm*, 68(6), 842–850.

Durán, A. M., Aguilar, G. P., Ayala, F. A., Rosas, R. A. R., Izquierdo, J. de J. G., & Torres, J. D. (2014). “Panorama epidemiológico de la insuficiencia renal crónica en el segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social”. *Diálisis y Trasplante*, 35(4), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.dialis.2014.08.001>

Fernandes, M. I. da C. D., Bispo, M. de M., Leite, É. M. D., Lopes, M. V. de O., Silva, V. M. da, & Lira, A. L. B. de C. (2015). “La exactitud diagnóstica de las características definidoras del diagnóstico volumen de líquidos excesivo de pacientes en hemodiálisis”. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 23(6), 1057-1064.

Hsieh, H.F., Shannon, S. E. (2005) “Three Approaches to Qualitative Content Analysis”. *Qualitative Health Research*, 15(9), 1277-1288. DOI: 10.1177/1049732305276687

Iborra Moltó, C., López-Roig, S., & Pastor Mira, M. de los Á. (2012). “Prevalencia de la adhesión a la restricción de líquidos en pacientes renales en hemodiálisis: indicador objetivo y adhesión percibida”. *Nefrología*, 34(4), 477–485.

INEGI. (2016). “Estadísticas por tema de mortalidad en la República Mexicana”. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemol25&s=est&c=23>

K/DOQI. (2002). “Clinical Practice Guidelines. For chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification”. https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/ckd_evaluation_classification_stratification.pdf

Malheiro Oliveira P., & Arruda Soares, D. (2012). "Percepciones de las personas con insuficiencia renal crónica sobre la calidad de vida". *Enfermería Global*, (28), 257–275.

Massa, E. R., Nisperuza, B. F. M., Estrada, E. M. M., Peláez, A. G., & Acevedo, J. P. (2014). "Afrontamiento y adaptación de pacientes en hemodiálisis y diálisis". Cartagena 2010. *Avances en Enfermería*, 31(1), 32-41.

OPS/OMS. (2015). "La OPS/OMS y la Sociedad Latinoamericana de Nefrología llaman a prevenir la enfermedad renal y a mejorar el acceso al tratamiento". http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10542%3A2015-opsoms-sociedad-latinoamericana-nefrologia-enfermedad-renal-mejorar-tratamiento&Itemid=1926&lang=es

Tovazzi, M. E., & Mazzoni, V. (2012). Personal Paths of Fluid Restriction In Patients on Hemodialysis. *Nephrology Nursing Journal*, 39(3), 207–215.

PURIFICACIÓN DE LA GP70 RECOMBINANTE DE *Sporothrix brasiliensis* EXPRESADA EN EL SISTEMA PROCARIONTE *Escherichia coli*

Gutiérrez Torres, A1.; Mora Montes, H. M2.

RESUMEN

La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en América Latina. Hasta hace poco, esta enfermedad fue atribuida a un único agente etiológico, el hongo *Sporothrix schenckii*, pero un estudio filogenético propuso que *S. schenckii* es en realidad un complejo de especies crípticas de interés clínico, entre las que se incluye *S. brasiliensis*. La principal adhesina descrita en la pared celular de *Sporothrix* es una glicoproteína de 70kDa (Gp70) y se ha demostrado que es altamente inmunogénica. El objetivo de este trabajo fue la purificación de la Gp70 recombinante de *S. brasiliensis* expresada en *Escherichia coli*. Para esto, se realizó la inducción de la proteína recombinante y su purificación, mediante cromatografía de metales inmovilizados y elución de geles de poliacrilamida.

ABSTRACT

Sporotrichosis is the most common subcutaneous mycosis in Latin America. Until recently, this disease was attributed to a single etiological agent, the fungus *Sporothrix schenckii*, but a phylogenetic study proposed that *S. schenckii* is in fact a complex of cryptic species of clinical interest, including *S. brasiliensis*. The major adhesin described on the cell wall of *Sporothrix* is a glycoprotein of 70kDa (Gp70) and has been shown to be highly immunogenic. The objective of this work was the purification of the recombinant Gp70 of *S. brasiliensis* expressed in *Escherichia coli*. For this, induction of the recombinant protein and its purification were performed by immobilized metal chromatography and elution from polyacrylamide gels.

Palabras Clave: *S. brasiliensis*, Gp70, purificación de proteínas.

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en América Latina. Hasta hace poco, esta enfermedad había sido atribuida a un único agente etiológico, el hongo *Sporothrix schenckii*, pero un estudio filogenético reciente propuso que *S. schenckii* es en realidad un complejo de especies crípticas de interés clínico: *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. lurei*, *S. mexicana* y *S. schenckii sensu stricto*. Entre los miembros de este complejo, *S. schenckii sensu stricto* y *S. brasiliensis* son las especies más comunes asociadas a la esporotricosis (Chakrabarti et al., 2015; Mora-Montes et al., 2015). El morfotipo micelial del hongo penetra en el hospedero humano, a través de abrasiones cutáneas producidas por material contaminado, antes de pasar por el cambio morfológico a levadura. Además, la transmisión zoonótica, siendo el gato el principal vector, es de importancia clínica y epidemiológica. Los antígenos de la pared celular y los anticuerpos anti-pared celular pueden ser la base para el desarrollo de pruebas serológicas específicas y sensibles. El desafío principal para desarrollar una prueba diagnóstica adecuada es la obtención de un antígeno específico de especie, esto se convierte en un objetivo aún más complicado debido a la alta reactividad cruzada observada para los glicoconjugados presentes en la pared celular. Poco se sabe sobre los factores de virulencia de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*. En este contexto, la aparición y patogenicidad de *S. brasiliensis* conduce a la necesidad de dilucidar los mecanismos de virulencia de esta nueva especie (Fernandes et al., 2013; Almeida et al., 2012). Algunos factores de virulencia ya conocidos en *S. Schenckii* son enzimas extracelulares (Yoshiike et al., 1993; Ghosh et al., 2002; Da Rosa et al., 2009), adhesinas (Lima et al., 2001; Teixeira et al., 2009) y melanina (Madrid et al., 2009; Teixeira et al., 2010). La principal adhesina descrita en la pared celular de *S. schenckii* es una glicoproteína de 70kDa, denominada Gp70, y media la unión del hongo a fibronectina, laminina y colágeno de la matriz extracelular del hospedero (Teixeira et al., 2009; Ruiz et al., 2008). Gp70 también desempeña un papel fundamental como un antígeno, que puede modular la respuesta inmune del hospedero, ya que es altamente inmunogénica (Nascimento et al., 2008). El objetivo de este trabajo fue la purificación de la Gp70 recombinante de *S. brasiliensis* expresada en *E. coli*, un sistema procarionte incapaz de glicosilar proteínas. Los protocolos para la inducción de la proteína recombinante (Martínez-Alvarez, comunicación personal) y la purificación de la proteína (García-Carnero, 2017) se han establecido previamente en el grupo de trabajo.

MÉTODOS Y MATERIALES

Inducción de la proteína recombinante

De un preinóculo de toda la noche, se tomaron 500 μ L de las células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas con la construcción pCold-Sb, y se incubaron en 150 mL de medio LB a 37 °C y a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4. Inmediatamente después, al cultivo se le adicionó el inductor IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó a 20 °C a 200 rpm durante 20 horas. Después de este tiempo las células se cosecharon por centrifugación a 1,370 x g durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla para su posterior utilización.

Lisis de las células de Escherichia coli

La pastilla celular se resuspendió en la solución amortiguadora de lisis (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, el pH se ajustó a 8.0 con NaOH) (se usaron 5 mL de solución amortiguadora por gramo

de peso seco de pastilla) y se le dieron 10 ciclos de congelamiento-descongelamiento con nitrógeno líquido, dejando descongelar en un baño a 25 °C. El lisado se centrifugó a 9,485 x g durante 10 minutos, descartando la pastilla (células no rotas) y se guardó el sobrenadante.

Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación y el análisis de las proteínas se realizaron mediante el uso de SDS-PAGE al 12 % de 1.5 mm (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad®), según el método descrito por Laemmli (1970). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (sulfato de amonio 10 %, Coomassie G-250 0.1 %, ácido orto-fosfórico 3 % y etanol absoluto 20 %) durante 2 horas y después se destiñeron durante otras dos horas con agua desionizada. Para inspeccionar los geles se usó el analizador ChemiDoc™MP (BioRad®).

Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, bajo condiciones desnaturalizantes

Alícuotas conteniendo 2 mL de resina de Talon Metal Affinity de Ni-NTA (Jena Bioscience), con una capacidad de unión de 5-10 mg/mL, se equilibraron con 5 volúmenes de la matriz con la solución amortiguadora A (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, el pH se ajustó a 8.0 con NaOH), después se colocó el sobrenadante de la lisis celular en la resina y se dejó interaccionando durante 1 hora a temperatura ambiente con ligera agitación, se eluyó y se guardó. El lavado y la elución de la proteína se hicieron con un gradiente de pH (8.0, 7.4, 7.0 y 6.3). Para el lavado se utilizaron 3 volúmenes de la matriz de la solución amortiguadora A y 3 volúmenes de la solución amortiguadora B (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, el pH se ajustó a 7.4 con NaOH). Para la elución de la proteína de interés se utilizaron 5 volúmenes de la solución amortiguadora C (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, el pH se ajustó a 7.0 con NaOH) y 5 volúmenes de la solución amortiguadora D (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM y Urea 8 M, el pH se ajustó a 6.3 con NaOH). Tanto para el lavado como para la elución, se recolectaron fracciones de 2 mL y se guardaron para después analizarlas mediante SDS-PAGE.

Elución de proteínas de geles de poliacrilamida

Después del corrimiento electroforético, el gel se lavó 3 veces (5 min por lavado) con agua desionizada y se tiñó con KCl y DTT. La banda se cortó en pedazos pequeños (1 mm²) y se colocó en un tubo eppendorf con 600 µL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1.76 mM), durante toda la noche en una incubadora a 25 °C con agitación de 100 rpm (para eluir por difusión pasiva).

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se pusieron 400 µL de NaOH 1M con 100 µL de la muestra, se añadieron 500 µL de H₂O destilada, y se dejó incubando durante 10 min. Después, a cada muestra se agregaron 5 mL de una solución de carbonato de sodio al 2% preparada al momento, (por cada 50 mL de la solución de carbonato se añaden 500 µL de sulfato de cobre 1% y 500 µL de tartrato de sodio y potasio al 2%). Se dejó incubar por 10 min y posteriormente se colocaron 500 µL del reactivo de Follin (1:3) a cada muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente durante media hora. La lectura se hizo a 750 nm.

RESULTADOS

Purificación de la proteína recombinante Gp70 de S. Brasiliensis

La purificación de la Gp70 recombinante de *S. brasiliensis* (SbGp70) se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados con una resina níquel. En las Figuras 1 y 2 se presentan los geles con la purificación bajo condiciones desnaturalizantes, utilizando un gradiente de pH para lavar y eluir la proteína. Como se observa en la Figura 1, el lavado con pH 8.0 y 7.4 (carriles 3-6) eluye una gran cantidad de proteínas contaminantes, aunque también se eluye un poco de la proteína de interés. Con pH 7.0 se pueden observar fracciones con mayor concentración de la proteína de interés (carriles 7-10). El rendimiento de la purificación obtenido fue de 0.8562 mg/ml.

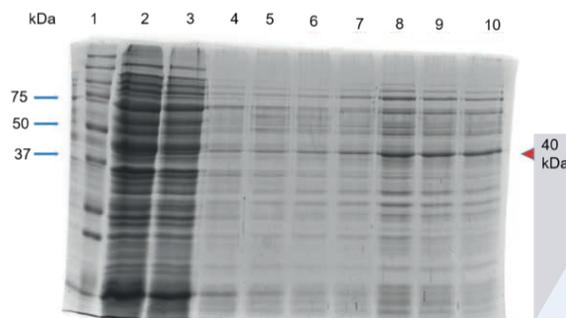


Figura 1. Purificación de la SbGp70 bajo condiciones desnaturalizantes. La proteína de alrededor de 40 kDa se eluyó con un gradiente de pH. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Eluido de las proteínas solubles de *E. coli*. Carriles 3-4: Lavado con pH 8.0. 5-6: Lavado con pH 7.4. Carriles 7-10: Elución de la proteína con pH 7.0. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y se tiñó con azul de Coomassie coloidal.

En la Figura 2 se puede ver que en la elución con pH 6.3 (carriles 3-7) las fracciones son más puras y hay más concentración de la proteína recombinante.

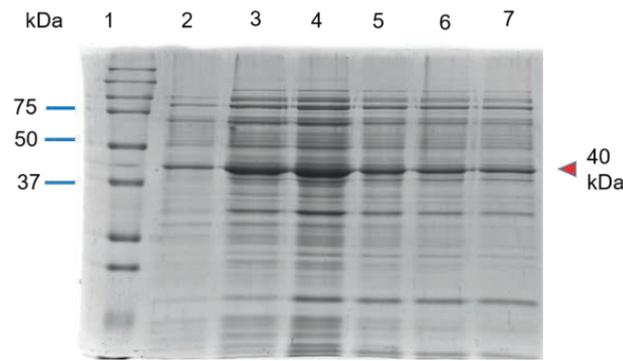


Figura 2. Purificación de la SbGp70 bajo condiciones desnaturalizantes. La proteína de alrededor de 40 kDa se eluyó con un gradiente de pH. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Lavado con pH 7.0 Carriles 3-7: Lavado con pH 6.3. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y se tiñó con azul de Coomassie coloidal.

Como se puede ver en las figuras anteriores, la proteína recombinante no pesa 70 kDa, esto debido a la incapacidad de *E. coli* de glicosilar proteínas, en su lugar pesa 40 kDa, que es el peso esperado del péptido sin la glicosilación. Al concentrar las fracciones de la purificación, se observó la presencia de algunas proteínas contaminantes que no se pudieron eliminar. Para purificar totalmente la proteína de interés, se decidió llevar a cabo su elución directa de geles desnaturalizantes de poliacrilamida a partir de las fracciones de la purificación, lo que nos dio una proteína totalmente pura (Figura 3).

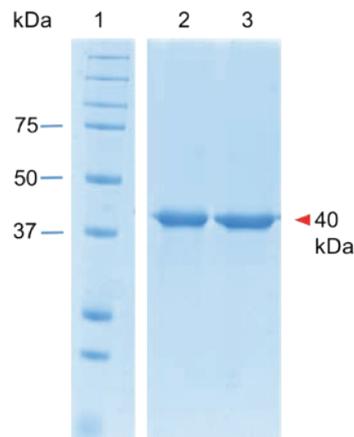


Figura 3. Gp70 recuperada de geles de poliacrilamida. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-3: Fracciones de la SbGp70 purificada con la resina de níquel, después de purificarse por elución de gel. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes, y se tiñó con azul de Coomassie coloidal.

Los sistemas de expresión con *E. coli* como hospedero son extensamente utilizados en la producción de proteínas recombinantes, ya que tienen la ventaja de ser de fácil uso y bajo costo. Es por esto que la inducción y expresión de la Gp70 recombinante se llevaron a cabo en este sistema, utilizando el vector pCold I. Cuando la temperatura de un cultivo de *E. coli* disminuye lo suficiente, el crecimiento se ve interrumpido y la expresión de casi todas las proteínas disminuye, mientras que la expresión de un grupo de proteínas de choque térmico es específicamente inducido. Este vector está diseñado para realizar una expresión eficiente utilizando un promotor derivado del gen *cspA*, aparte de que también posee en su extremo 5' una secuencia His-tag, que permitió la purificación por afinidad de la proteína. La proteína recombinante obtenida con este sistema tiene un peso molecular de 40 kDa (Martínez-Álvarez, comunicación personal), que difiere al de la proteína nativa, de 70 kDa, debido a la falta de glicosilación. Esta disminución del peso nos indica que la proteína tiene un alto grado de glicosilación, que representa hasta un 43 % del peso total de la Gp70 (García-Carnero, 2017).

CONCLUSIONES

Actualmente existen una gran variedad en sistemas de expresión y organismos hospederos para la producción de proteínas recombinantes. Los avances tecnológicos y científicos han hecho posible que la síntesis de estas proteínas sea una herramienta disponible para diversas necesidades. Cada vez son más las aplicaciones en las que las proteínas recombinantes han sido utilizadas, siendo la industria farmacéutica y la alimentaria las más beneficiadas. Además, en el ámbito científico su utilización ha permitido entender y aclarar rutas metabólicas y mecanismos celulares que son importantes para el desarrollo de la vida. Diversas áreas del conocimiento científico hacen uso constante de la tecnología del ADN recombinante, ya que permite obtener una proteína de interés de manera rápida y abundante. Dentro de las aplicaciones más novedosas existe la utilización de la SbGp70 para diseñar un sistema de diagnóstico para la esporotricosis, y las perspectivas actuales en este grupo de trabajo es crear una vacuna para prevenir dicha enfermedad. Por lo tanto la realización de la puri-

ficación de SbGp70 es indispensable para concretar estos objetivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida-Paes R, Frases S, Araújo G de S, de Oliveira MM, Gerfen GJ et al. (2012) Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of Ltyrosine. *Appl Environ Microbiol* 78: 8623-8630. doi:10.1128/AEM. 02414-12. PubMed: 23042177.
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C., Mochizuki, T., and Li, S. (2015). Global epidemiology of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 53, 3–14. doi: 10.1093/mmy/myu062.
- Da Rosa D, Gezuele E, Calegari L, Goñi F (2009) Excretion-secretion products and proteases from live *Sporothrix schenckii* yeast phase: immunological detection and cleavage of human IgG. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 1-7. doi:10.1590/S0036-46652009000100001. PubMed: 19229383.
- Fernandes GF, Dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E et al. (2013) Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu strictu isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence* 4: 1-9.
- García Carnero L C (2017). Generación de anticuerpos en contra de la proteína recombinante Gp70 de *Sporothrix schenckii* sensu stricto y *Sporothrix brasiliensis*. Universidad de Guanajuato Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas Departamento de Biología.
- Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A (2002) Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45: 449-454. doi:10.1046/j.1439-0507.2002.d01-121.x. PubMed: 12472719.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.
- Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonça-Previato L, Morandi V et al. (2001) Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* 69: 6874-6880. doi:10.1128/IAI.69.11.6874-6880.2001. PubMed: 11598061.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Fernandes CG, Guim TN et al. (2009) Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect* 12: 162-165. PubMed: 19883789.
- Mora-Montes, H. M., Dantas Ada, S., Trujillo-Esquivel, E., de Souza Baptista, A. R., and Lopes-Bezerra, L. M. (2015). Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast Res.* 15:fov065. doi: 10.1093/femsyr/fov065.
- Nascimento RC, Espíndola NM, Castro RA, Teixeira PAC, Loureiro Y, Penha CV et al. (2008) Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *Eur J Immunol* 8: 3080-3089. PubMed: 18991286.
- Ruiz-Baca E, Toriello C, Pérez-Torres A, Sabanero-López M, Villagómez-Castro JC et al. (2008) Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med Mycol* 46: 1-1310.1080/ 13693780802165789 . PubMed: 18608892.
- Teixeira PA, de Castro RA, Nascimento RC, Tronchin G, Torres AP et al. (2009) Cell surface of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiolog.*
- Teixeira PA, De Castro RA, Ferreira FR, Cunha MM, Torres P et al. (2010) L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol* 48: 687-695. doi:10.3109/13693780903453287. PubMed: 20392149
- Yoshiike T, Lei PC, Komatsuzaki H, Ogawa H (1993) Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. *Mycopathologia* 123: 69-73. doi: 10.1007/BF01365082. PubMed: 8264769.

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA-ESTRUCTURAL DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE TRIACILGLICEROLES EN EL ADIPOCITO

Paloma Ríos Medinal y Samuel Lara González 2

RESUMEN

El almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos cumple con el fin de disponer de energía para casos de demanda, donde los triglicéridos son hidrolizados formándose ácidos grasos y glicerol, a este proceso se le llama lipólisis. G0S2 es una proteína de 103 aminoácidos y se conoce que ésta es capaz de inhibir a la enzima lipolítica ATGL, la cual es una de las enzimas más importantes en la regulación de la lipólisis. Para conocer mejor la función de G0S2 se necesita conocer su estructura, sin embargo, se han realizado ensayos de cristalización sin éxito alguno hasta el momento, por lo que, en este trabajo se purificaron las proteínas G0S2 y Bcl-2 Quimera y se evaluó su interacción por dispersión dinámica de luz (DLS), para realizar ensayos posteriores de co-cristalización.

ABSTRACT

The storage of triglycerides in the adipocytes fulfills in order to have energy for necessary situations, where the triglycerides are hydrolyzed to form fatty acids and glycerol, this process is called lipolysis. G0S2 is a protein of 103 amino acids and it is known that it is able to inhibit the adipose triglyceride lipase (ATGL), which is the rate-limiting enzyme of lipolysis. To understand much better the function of G0S2, it is necessary to crystallize it, however, tests have been carried out for this without any success, so that the G0S2 and Bcl-2 were purified and interacted with each other, obtaining no apparent effect on the Bcl-2 homodimer.

Palabras Clave: lipólisis, G0S2, purificación, interacción, Bcl-2 Quimera.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos almacenan el exceso de energía en forma de triglicéridos (TG) en gotas lipídicas con el objetivo de disponer de energía en situaciones de demanda. Durante dichos periodos, los TG se hidrolizan, proceso llamado lipólisis, liberándose ácidos grasos (FA) y glicerol como sustratos de energía (1). La lipólisis se lleva a cabo como una cascada hidrolítica de reacciones consecutivas catalizadas por diferentes lipasas (1). Se ha encontrado que la triglicérido lipasa de tejido adiposo (ATGL) es una de las lipasas más importantes en la regulación de la lipólisis pues cataliza la hidrólisis de los TG a diacilglicerol (DG) y FA (1). La actividad enzimática de ATGL es co-activada por la proteína CGI-58 (Comparative gene identification-58) e inhibida por la proteína G0S2 (G0/G1 switch gene 2) (2,3).

En humanos y ratones, G0S2 se localiza en el cromosoma 1 del genoma, y codifica una proteína de 103 aminoácidos la cual se expresa durante el reingreso de las células mononucleares de la fase G0 a G1 del ciclo celular (4). Se sabe que G0S2 no comparte similitudes de secuencia con alguna estructura 3D de proteínas conocidas (5); no existe alguna característica en particular presente en la estructura que sugiera una función discernible inmediata.

La función más estudiada de G0S2 es su participación en la lipólisis, sin embargo, también se ve involucrada en el ciclo celular, proliferación celular, inflamación, carcinogénesis y apoptosis, en este último Welch y col. (6) demostraron que G0S2 interactúa con Bcl-2 en la mitocondria, promoviendo la apoptosis mediante la interrupción de la formación del heterodímero Bcl-2/Bax (6).

A pesar de los diversos trabajos de investigación sobre la actividad de G0S2, hasta la fecha no se ha determinado su estructura tridimensional, por ello es necesario realizar ensayos en cristalografía pues ésta proteína participa en numerosos procesos de nuestro organismo. En ensayos anteriores no se ha logrado cristalizar a G0S2 por sí sola, y se sabe que las proteínas pueden estabilizarse cuando forman complejos con un sustrato, ácido nucleico, cofactor o molécula pequeña (7), por lo que es posible que la interacción con Bcl-2 aumente la probabilidad de cristalizar a G0S2. Como existen varias versiones de Bcl-2, cabe mencionar que la estructura 3D que se tiene resuelta de Bcl-2 es una construcción quimérica que corresponde a los residuos 1-34 de Bcl-2, 35-50 de Bcl-xL (proteína homóloga) y 92-207 de Bcl-2 (8), no se sabe con cuál versión G0S2 sea más estable al interactuar con ella.

Dilucidar la estructura de G0S2 permitirá conocer mejor su función y poder ampliar nuestro conocimiento del metabolismo celular en donde está involucrada esta proteína. Por lo cual el propósito de este proyecto fue purificar las proteínas G0S2 y a Bcl-2 Quimera para analizar su interacción y en experimentos posteriores co-cristalizar a G0S2 con Bcl-2 Quimera.

MÉTODOS Y MATERIALES

EXPRESIÓN DE SUMO-G0S2 Y SUMO-BCL-2 QUIMERA

Cada proteína fue expresada en E. coli BL21 (DE3) Star como se describe a continuación. Las células se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. La expresión de las proteínas se indujo con la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se incubó por

18 h a 16 °C. La expresión de las proteínas se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. Las células se recolectaron por centrifugación. Posteriormente se purificó G0S2 por cromatografía de afinidad a níquel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular.

PURIFICACIÓN DE BCL-2 QUIMERA

Las células se resuspendieron en el amortiguador de lisis [50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 300 mM NaCl], se lisaron por sonicación y los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 12000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con amortiguador de lisis. La elución se realizó con un gradiente escalonado de imidazol de 10, 50, 250 y 500 mM preparado en el amortiguador de lisis. Las fracciones eluidas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15%. Para llevar a cabo el corte de la proteína SUMO, a la muestra con proteína se le agregó Prescission protease (PPS) y se incubó 4°C por 16 h. Luego se desaló la muestra con la columna PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) y se hizo una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare Life Sciences) en el equipo FPLC Äkta. Se analizó el cromatograma con el software UNICORN versión 5.31 y las fracciones correspondientes al pico de la proteína eluida se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Se mezclaron las fracciones pertenecientes a Bcl-2 Quimera, se concentró la muestra por microfiltración y se inyectó en una columna de filtración en gel Superdex 75 (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con el amortiguador de almacenamiento (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT). Las fracciones correspondientes a la proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15%. Se mezclaron nuevamente las fracciones pertenecientes a la proteína y se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. Se recolectó el frente y se hizo un lavado con amortiguador de almacenamiento suplementado con 20 mM de imidazol y la elución se realizó con el mismo amortiguador suplementado con 500 mM de imidazol. La proteína se desaló con el amortiguador de almacenamiento y su concentración se determinó por absorbancia a 280 nm [coeficiente de extinción (ϵ) de 37930 M⁻¹ cm⁻¹].

INTERACCIÓN G0S2-BCL-2 QUIMERA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

El análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) se llevó a cabo con el equipo Zetasizer APS (Malvern Instruments) a temperatura ambiente (25 °C). 10 mg/ml de G0S2 (882 uM) y 2 mg/ml de Bcl2 Quimera (50 uM) fueron analizados con el software para cada conjunto de datos de DLS en el amortiguador de almacenamiento. Para analizar el efecto de G0S2 sobre Bcl-2 Quimera, un exceso molar (1:4) de G0S2 (200 uM) se añadió a la solución de proteína Bcl-2 Quimera (50 uM) antes de la medición. Se realizaron 15 mediciones con una duración de 40 segundos cada una, en un intervalo de 10 minutos, con tres repeticiones por medición.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE BCL-2 QUIMERA

Se inició el proceso de purificación de la proteína SUMO-Bcl-2 Quimera por medio de una cromatografía de afinidad a níquel, la cual consiste en la unión reversible y específica entre Ni⁺² (ligando), que a su vez está asociado al ácido nitrotriácético, Ni-TA, (agente quelante), y la molécula de interés (afinante) a través de los residuos de histidina. La proteína de fusión SUMO-Bcl-2 Quimera tiene una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de SUMO por lo que se puede fácilmente unir al níquel y posteriormente eluir mediante un gradiente creciente de imidazol (Figura 1A), el cual compite por los electrones del ion níquel. Se encontró que la proteína de interés eluyó a una concentración entre 250 y 500 mM de imidazol (Figura 1A). Luego, se juntaron las fracciones donde eluyó la proteína y se añadió PPS para separar a Bcl-2 quimera de SUMO. Se prosiguió con la desalación de la muestra, a fin de obtener a la proteína en un buffer sin sal, y se le aplicó una cromatografía de intercambio iónico, la cual comprende la separación de proteínas mediante la diferencia de sus cargas y luego la elución de proteínas con carga negativa mediante un gradiente de sal; se observa que las proteínas eluyeron en el 40% de concentración de sal, esto debido a que el punto isoeléctrico de ambas proteínas es casi idéntico (Figura 1B). Las fracciones 23 a 31

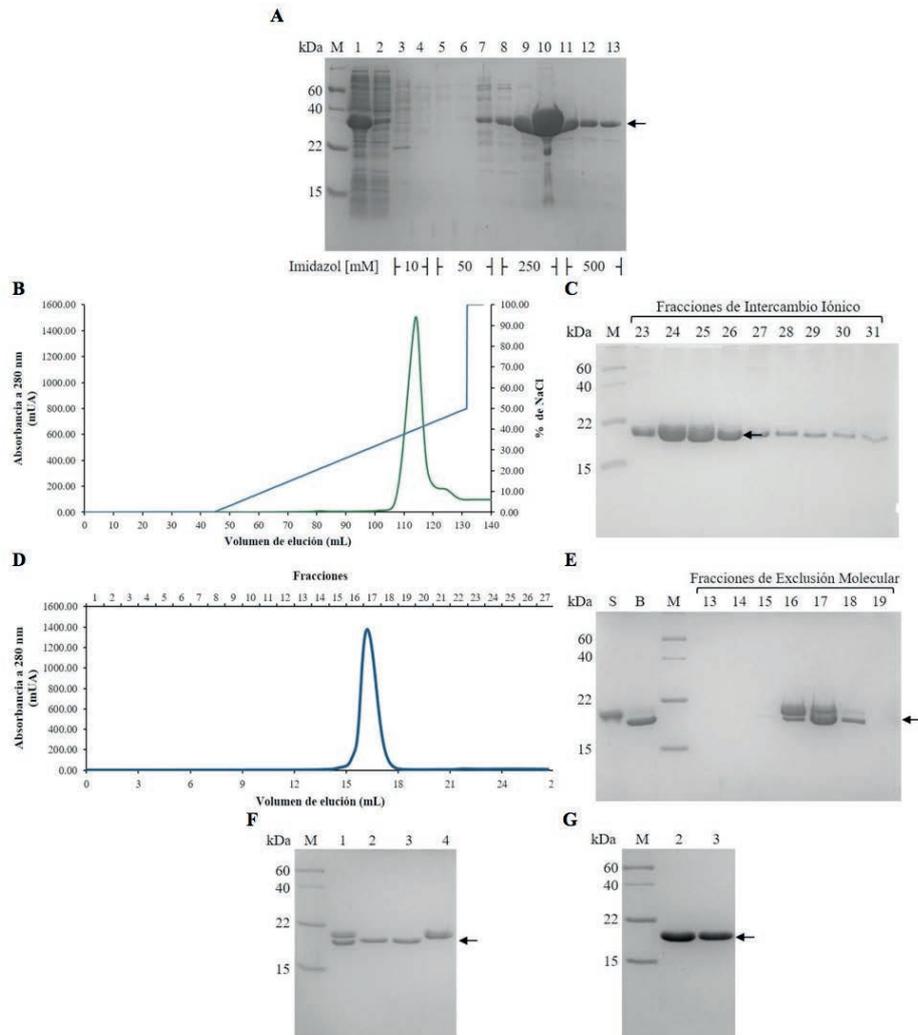


Figura 1. Purificación de Bcl-2 quimera. A, SDS-PAGE de la purificación de SUMO-Bcl-2 por cromatografía de afinidad a níquel. M: marcador molecular; 1: extracto celular; 2: proteína no unida; 3 y 4: proteína eluida con 10 mM de imidazol (2 lavados); 5, 6 y 7: elución con 50 mM de imidazol (3 lavados); 8, 9 y 10: elución con 250 mM de imidazol (3 lavados); 11, 12 y 13: elución con 500 mM de imidazol (3 lavados); B, Cromatograma de la purificación de Bcl-2 quimera por intercambio iónico; C, SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del intercambio iónico; M: marcador, proteínas en las fracciones 23-31; D, Cromatograma de la purificación de Bcl-2 quimera por exclusión molecular; E, SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la exclusión molecular; S: SUMO; B: Bcl-2 quimera; M: marcador; proteínas en las fracciones 13-19; F, SDS-PAGE de la purificación de Bcl-2 Quimera por cromatografía de afinidad a níquel. M: marcador molecular; 1: SUMO y Bcl-2 Quimera; 2: Proteína no unida (frente); 3: elución con 20 mM de imidazol; 4: elución con 500 mM de imidazol; G, Concentración de Bcl-2 quimera. M: marcador molecular, 2: lavado con X, 3: elución con 20 mM de imidazol.

correspondientes a la elución de las proteínas, se analizaron en gel de poliacrilamida (Figura 1C) donde se mostró que la proteína de interés Bcl-2 Quimera se encontró en las fracciones 24-26. Posteriormente se juntaron dichas fracciones y se continuó la purificación a través de una cromatografía por exclusión molecular, la cual se basa en la diferencia de pesos moleculares para separar a las proteínas; se mostró un único pico de elución en el cromatograma (Figura 1D) lo que indica que nuevamente las proteínas, SUMO y Bcl-2 Quimera eluyeron juntas. Después se analizaron las fracciones del pico de elución a través de un gel de poliacrilamida donde se encontró que en las fracciones 16, 17 y 18 estaban presentes ambas proteínas (Figura 1E), por lo que se decidió juntar dichas fracciones y realizar una cromatografía por afinidad a níquel. En el análisis de las fracciones a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 1F) se encontró que tanto la proteína no unida como la eluida con 20 mM de imidazol contenían la proteína de interés, Bcl-2 quimera. Finalmente, dichas fracciones se concentraron por separado y se corrieron en un gel de poliacrilamida, donde se confirmó que la proteína estaba completamente pura (Figura 1G). El rendimiento fue de 4 mg por litro de cultivo.

INTERACCIÓN G0S2-BCL-2 QUIMERA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Una vez purificada G0S2 y Bcl-2 Quimera se analizó la interacción entre ellas a través del análisis por DLS. Zhang y colaboradores reportan que Bcl-2 puede formar homodímeros y homooligómeros, que son capaces de interactuar con Bax. También reportaron que Bcl-2 prefiere interactuar con Bax y formar un heterodímero, que interactuar consigo mismo y formar un homodímero, pero que el modelo propuesto de interacción puede aplicarse para ambos, ya que una molécula de Bcl-2 puede unirse a Bax y a Bcl-2 por vía de la misma superficie aceptora (9). Por lo que se esperaba que G0S2 disociara el homodímero de Bcl-2 Quimera y formara un heterodímero ya que in vivo interrumpe la interacción del heterodímero Bcl-2/Bax. En la Figura 2 se muestra que no hubo efecto aparente sobre el homodímero de Bcl-2 Quimera, ya que no se presentó un recorrimiento en el pico correspondiente a la formación del heterodímero Bcl-2-G0S2.

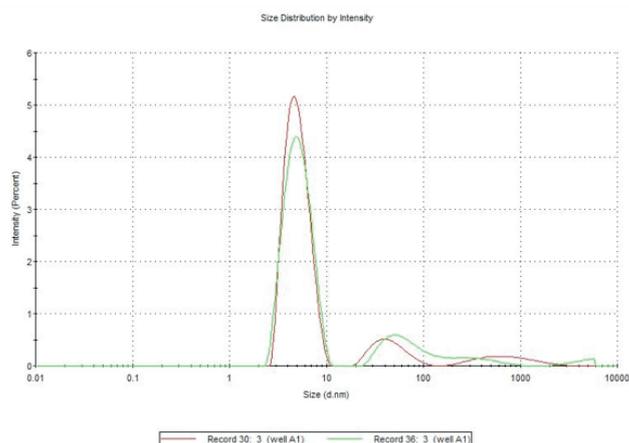


Figura 2. Homooligomerización de Bcl-2 Quimera con G0S2 observado por análisis de DLS. Pico rojo: Bcl-2 Quimera. Pico verde: Bcl-2 Quimera-G0S2

CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron tanto a la proteína G0S2 como Bcl-2 Quimera con un rendimiento final de 15 mg/L y 4 mg/L de cultivo. El análisis de interacción de DLS mostró que G0S2 no es capaz de interaccionar con Bcl-2 Quimera, ya que no hubo una disminución del tamaño correspondiente a la disociación del homodímero de Bcl-2 Quimera y la subsecuente formación del heterodímero Bcl-2 Quimera-G0S2.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión del M. en C. Edgar D. Páez Pérez y del Dr. Samuel Lara González, a quienes me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento al ofrecerme su paciencia, tiempo y dedicación para que dicho proyecto saliera adelante.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CORNACIU, I., Boeszoermyeni, A., Lindermuth, H., Nagy, H. M., Cerk, I. K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. (2011). "The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively" en *PLoS One*, Núm 6, Vol. 6.
- (2) LASS, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., Zechner, R. (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome" en *Cell Metab*, Núm 3, Vol. 5, [pp. 309–319].
- (3) YANG, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G. B., Chi, Y. I., Guerin, T. M., Smart, E. J., Liu, J. (2010). "The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase" en *Cell Metab*, Núm 11, [pp. 194–205].
- (4) RUSSELL, L., Forsdyke, D. R. (1991). "A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated" en *DNA Cell Biol*, Núm 10, [pp. 581–591].
- (5) LASS, A., Zimmermann, R., Oberer, M., Zechner, R. (2011) "Lipolysis - A highly regulated multienzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores" en *Prog. Lipid Res*, Núm 50, [pp. 14–27].
- (6) WELCH, C., Santra, M. K., El-Assaad, W., Zhu, X., Huber, W. E., Keys, R. A., Teodoro, J. G., Green, M. R. (2009). "Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2" en *Cancer Res*, Núm 69, [pp. 6782–6789].
- (7) ROMIER, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P. H. N., Christodoulou, E., De Marco, V., Van Gerwen, S., Knipscheer, P., Lebbink, J. H., Notenboom, V., Poterszman, A., Rochel, N., Cohen, S. X., Unger, T., Sussman, J. L., Moras, D., Sixma, T. K., Perrakis, A. (2006). "Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: Experimental procedures, database tracking and case studies" en *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*, Núm 62, [pp. 1232–1242].
- (8) PETROS, A. M., Medek, A., Nettesheim, D. G., Kim, D. H., Yoon, H. S., Swift, K., Matayoshi, E. D., Oltersdorf, T., Fesik, S. W. (2001). "Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2" en *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Núm 98, [pp. 3012–7].
- (9) ZHANG, Z., Lapolla, S.M., Annis, M.G., Truscott, M., Roberts, G.J., Miao, Y., Shao, Y., Tan, C., Peng, J., Johnson, A.E., Zhang, X.C., Andrews, D.W., Lin, J. (2004). "Bcl-2 Homodimerization Involves Two Distinct Binding Surfaces, a Topographic Arrangement That Provides an Effective Mechanism for Bcl-2 to Capture Activated Bax" en *Journal of Biological Chemistry*, Núm 42, [pp. 43920 - 8].

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA MEDIANTE EL MÉTODO HIDROTHERMAL ASISTIDO POR MICROONDAS

Fonseca Maya Omar 1 y Velázquez Castillo Rodrigo Rafael 2

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizaron crecimientos de distintas nanoestructuras de Hidroxiapatita sintética (HAp) utilizando aminoácidos como orientadores del crecimiento mediante el método hidrotérmico asistido por microondas.

La caracterización se realizó mediante diferentes técnicas: Difracción de rayos X (XRD), para determinar las fases minerales presentes en el nanomaterial y verificar la obtención de la fase cristalina de HAp, además, por esta técnica se determinó la o las orientaciones cristalinas que se obtuvieron en la fase de HAp. Microscopía electrónica de barrido (SEM), mediante esta técnica se evaluó la interacción entre las fases, su unión y por medio de observaciones a diferentes tiempos posteriores a la reacción de síntesis, se determinó si se presenta evidencia de separación de las fases. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétricos (TGA). Para determinar la estabilidad térmica de los materiales y la interacción entre sus fases.

ABSTRACT

In this paper, growth of synthetic hydroxyapatite nanostructures (HpA) using amino acids as growth promoters by means of the microwave assisted hydrothermal method was performed.

The characterization was carried out by different techniques: X-ray diffraction (XRD) was used to determine the mineral phases present in the nanomaterial and to verify the obtaining of the crystalline phase of HAp, in addition, by this technique the crystalline phase orientation of hydroxyapatite was determined. Scanning electron microscopy (SEM), by means of this technique the interaction between the phases and their union was evaluated and by means of observations at different reaction times the existence of phase separation was determined. Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) were used to determine the thermal stability of the materials and the interaction between their phases.

Keywords: hydroxyapatite, amino acids, microwave assisted hydrothermal method, XRD, SEM, DSC, TGA.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los temas más importantes dentro del sector biomédico es lograr obtener un material con propiedades adecuadas para utilizarse como sustituto óseo, la hidroxiapatita sintética tiene una composición química similar a la del componente inorgánico del hueso natural, también cuenta con propiedades semejantes como alta biocompatibilidad, bioactividad, lenta degradación, osteoconducción, osteointegración, osteoinducción, resistencia a la corrosión, resistencia a la compresión, bajas conductividades térmicas y eléctricas. Es conocido que las propiedades de la hidroxiapatita sintética y de cualquier otro material son dependientes del método y de las condiciones de síntesis, por esta razón es importante controlar todos aquellos parámetros en la síntesis que puedan afectar sus propiedades finales, algunos de los parámetros que se pueden controlar son la concentración de los reactivos, temperatura, velocidad de procesos de calentamiento y enfriamiento, tiempo de reacción, presión, agitación, entre otros.

Recientemente se ha encontrado que al sintetizar HAp a través de métodos hidrotérmicos asistidos por microondas se puede tener un mejor control sobre la morfología y la orientación de las estructuras. A su vez, estudios demuestran que el uso de moléculas biológicas como los aminoácidos en el proceso de síntesis ayudan a controlar las orientaciones y morfologías obtenidas de la HAp debido a que los aminoácidos tienen la cualidad de inhibir o de favorecer el crecimiento de la HAp en determinadas direcciones.

El presente trabajo tiene por objetivo analizar el proceso de crecimiento y la orientación de la HAp al utilizar diferentes tipos de aminoácidos.

MARCO TEÓRICO

Calentamiento por microondas

“El calentamiento por microondas puede mejorar la velocidad de reacción y en muchos casos el rendimiento del producto”. (Leadbeater, 2010, p. 25)

Debido a las ventajas que presenta el calentamiento mediante microondas ha sido interesante e importante utilizarlas como medio de energía para promover reacciones químicas tanto orgánicas como inorgánicas. (Leadbeater, 2010).

Los breves tiempos de reacción y el amplio rango de reacción que ofrece la síntesis orgánica asistida por microondas son adecuados para las demandas crecientes de la industria y a nivel laboratorio. (Kingston y Haswell, 1997)

En general, la mayoría de las reacciones orgánicas han sido calentadas utilizando equipos de transferencia de calor tradicionales tales como baños líquidos, baños de arena y chaquetas de calefacción. Sin embargo, estas técnicas de calentamiento son bastante lentas y puede desarrollarse un gradiente de temperatura dentro de

la muestra. Además, el sobrecalentamiento local puede conducir a la descomposición del producto, sustrato o reactivo. (Kingston y Haswell, 1997)
 En contraste, en el calentamiento dieléctrico por microondas, la energía de las microondas es introducida dentro del reactor químico y calienta solamente los reactivos y solventes sin calentar en sí los tubos; si el horno está apropiadamente diseñado el incremento de temperatura será uniforme en toda la muestra, lo cual ayuda a evitar la formación de subproductos o degradación de los productos. Cuando se cuenta con sistemas presurizados es posible aumentar la temperatura rápidamente más allá del punto de ebullición normal del solvente usado en la reacción. (Kingston y Haswell, 1997)

Cristalografía de la HAp

Las apatitas de fosfato de calcio tienen la fórmula química general $Ca_5(PO_4)_3X$. Por su parte la hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ha sido demasiado investigada debido a sus posibles aplicaciones en el sector biomédico principalmente como un material sustituto para hueso. Las apatitas biológicas son descritas como HAp deficiente en calcio modificada por diferentes átomos, por ejemplo PO_4^{3-} y OH^- sustituido por CO_3^{2-} , Ca^{2+} por Na^+ , PO_4^{3-} por SiO_4^{4-} , OH^- por F^- . La sustitución de éstos elementos modifica las propiedades de la apatita como su estabilidad, propiedades mecánicas, morfología, etc.

La hidroxiapatita cristaliza de forma hexagonal representado por el grupo espacial $P6_3/m$. Figura 1. (Mostafa & Brown, 2007).

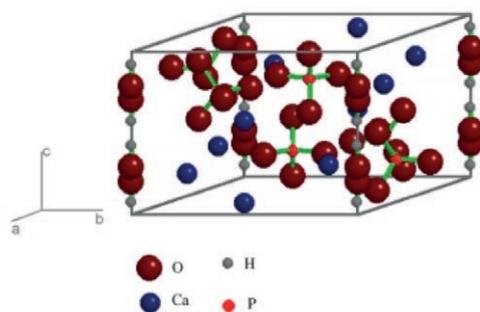


Figura 1. Celda unitaria de la hidroxiapatita en el grupo espacial $P6_3/m$ (Mostafa & Brown, 2007).

La estructura de la HAp contiene dos tipos de átomos de calcio tipo I y tipo II, la diferencia radica en la cantidad de átomos de oxígeno que rodean al átomo de calcio, por lo tanto en su número de coordinación, 9 y 7 respectivamente. Figura 2.(Campa et al., 2007).

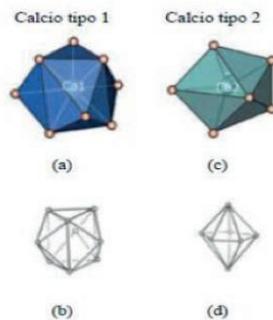


Figura 2. Átomo de calcio tipo I (a, b), tipo II (c, d) (Campa et al., 2007).

Los calcio tipo I, forman prismas trigonales triapuntados, ubicándose en la estructura de la hidroxiapatita apilados uno sobre otro sobre sus caras, esta fenómeno es de vital importancia en las propiedades mecánicas finales de la hidroxiapatita orientada sobre el eje z. Figura 3. (Campa et al., 2007).

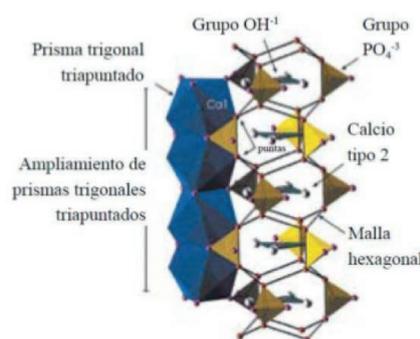


Figura 3. Apilamiento de los calcio tipo I en el eje z. (Campa et al., 2007).

Aminoácidos

Las estructuras de los aminoácidos varía considerablemente. Además del grupo carboxilo y el grupo amino alfa, algunos de aminoácidos tienen un segundo carboxilo (ácidos aspártico y glutámico) u otro potencial en forma de carboxamida (la asparagina); estos se denominan aminoácidos ácidos. Otros contienen un segundo grupo básico que puede ser amino (lisina), guanidino (arginina), o el anillo del imidazol (histidina); éstos se denominan aminoácidos básicos. Algunos contienen sistemas bencénicos o heterocíclicos, grupos fenólicos o alcohólicos, o átomos de halógenos o de azufre. (Morrison y Boyd, 1998).

Efecto de aminoácidos positivos y negativos

Los mecanismos de los aminoácidos en el crecimiento y orientación de la hidroxiapatita aún no están del todo claros, pero estudios han demostrado que las proteínas no colágenas en ciertos organismos inhiben el crecimiento de la hidroxiapatita en algunas direcciones acoplándose a las moléculas de hidroxiapatita en la etapa de nucleación. Debido a estos estudios y conociendo la estructura de las proteínas no colágenas se asume que los aminoácidos y otras moléculas cargadas negativamente son las principales responsables del efecto inhibitorio. (Tavafoghi et al., 2012) y (De Yoreo et al., 2007).

METODOLOGIA

Las nanoestructuras de HAp se sintetizaron mediante el método hidrotermal asistido por microondas, las concentraciones de los precursores se mantuvieron constantes: nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, fosfato de potasio (K_2HPO_4) e hidróxido de potasio (KOH), la temperatura de síntesis se varió de 100 hasta 170°C, también el tiempo de reacción se varió de 20 a 50 min para encontrar el óptimo, durante las síntesis se utilizarán diferentes cantidades de los distintos aminoácidos tanto ácidos (ácido glutámico, ácido aspártico), básicos (Arginina) y neutros (Alanina). Los precursores se disuelven en agua destilada como medio de reacción, facilitando el proceso por medio de agitación constante y calentamiento, esto se realiza en dos partes, primeramente se dispersa el aminoácido con el nitrato de calcio en agua hasta obtener una disolución o una dispersión bastante homogénea, posteriormente se realizará la solución de fosfato de potasio con hidróxido de potasio en agua hasta conseguir una disolución; posteriormente las soluciones se colocarán en el interior de tubos de cuarzo de 50 mL especialmente diseñados para soportar altas temperaturas y presiones; los tubos de cuarzo se taparán mediante tapones y colocarán en el interior de unas capuchas especiales de teflón para protegerlos y poder acomodarlos dentro del rotor de un horno de microondas Synthos 3000 diseñado y construido por Anton Paar. Por último, terminado el tiempo de reacción se recupera el sobrenadante por medio de una filtración y se deja secando a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por medio de la difracción de rayos X se obtuvieron los patrones de difracción de nuestras diferentes muestras, se presentan los difractogramas de la hidroxiapatita sintetizada sin y con ácido glutámico, figuras 4 y 5 respectivamente.

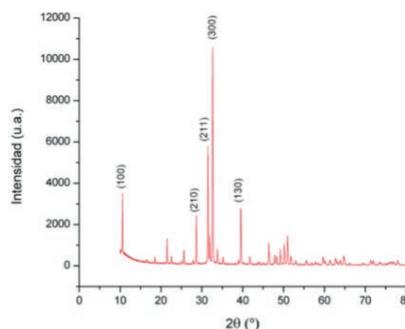
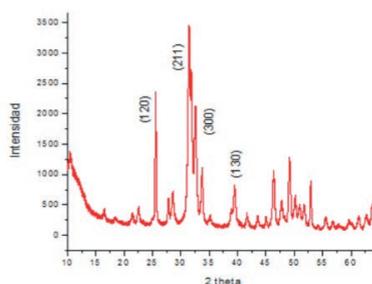


Figura 4. HAp sintetizada sin ácido glutámico. Figura 5. HAp sintetizada con ácido glutámico.

En la figura 4 se presenta un difractograma característico de la hidroxiapatita cuando es sintetizada de manera aleatoria sin una orientación característica, con su reflexión de Bragg más intensa alrededor de los 31.46° en 2θ perteneciente al plano (211) el cual es característico de HAp con crecimiento cristalino aleatorio. En la figura 5 se presenta el difractograma de la hidroxiapatita sintetizada con ácido glutámico, teniendo su difracción de Bragg más intensa alrededor de 32.67° en la escala de 2θ , correspondiente a la familia de planos (300) de acuerdo a lo reportado por (Rivera & Alanís, 2016), prácticamente el doble de intensa que la de los planos (211).

En la figura 6, se muestran las micrografías obtenidas mediante SEM de la HAp sintetizada con ácido glutámico.

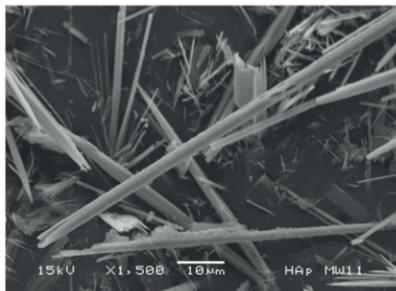


Figura 6. Micrografía de HAp sintetizada con ácido glutámico.

En la figura 6 se aprecian las nanoestructuras en forma de fibras que presentan un perfil transversal hexagonal, con diámetros variables del orden de los nanómetros.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una fase nanocristalina de HAp con una orientación preferencial en el eje z; el ácido glutámico funcionó como un buen orientador del crecimiento de la HAp, favoreciendo la obtención de fibras hexagonales constituidas de muchas nanofibras hexagonales orientadas en su eje z; lo anterior es importante debido a que se ha reportado que la HAp logra sus mejores propiedades mecánicas cuando está orientada en el eje z. Es de vital importancia lograr optimizar y controlar el proceso para obtener HAp con la orientación preferencial deseada, por eso es importante conocer los mecanismo de reacción de los precursores y promotores del crecimiento involucrados en la síntesis.

BIBLIOGRAFIA

- Leadbeater, N. E., (2010). *Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry*. Florida, Estados Unidos: Taylor and Francis Group. 25-73 pp.
- Kingston, H. M., Haswell, S. J., (1997). *Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications*. Washington, Estados Unidos: American Chemical Society.
- Mostafa, N. Y., & Brown, P. W. (2007). Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: structure and substitutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 68(3), 431-437.
- Campa, J., et al. (2007). *Biomateriales: fundamentos, técnicas y aplicaciones*. Universidad de Guadalajara, México.
- Morrison, R. T., Boyd, R. N., (1998). *Química Orgánica*. Estado de México, México: Addison Wesley Longman de México. 1323-1346 pp.
- Jahromi, M. T., Yao, G., & Cerutti, M. (2013). The importance of amino acid interactions in the crystallization of hydroxyapatite. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(80), 20120906.
- De Yoreo, J. J., Wierzbicki, A., & Dove, P. M. (2007). New insights into mechanisms of biomolecular control on growth of inorganic crystals. *CrystEngComm*, 9(12), 1144-1152.
- Alanís-Gómez, J. R., Rivera-Muñoz, E. M., Cervantes-Medina, J. S., Almanza-Reyes, H., Nava-Mendoza, R., Cortes-Romero, C., & Velázquez-Castillo, R. (2016). Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7557-7566.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo por su paciencia, enseñanzas y tiempo dedicado a lo largo de este verano de la ciencia, así como por permitirme y facilitarme trabajar y aprender de este proyecto. Así mismo, a los compañeros de posgrado que participan en el proyecto por su ayuda durante el verano.

DIFERENCIACIÓN DE 3 SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DE LA FRACCIÓN ESTROMAL- VASCULAR DEL TEJIDO ADIPOSO EN ADIPOCITOS MADUROS

Natalia García-Orihuela Xarubet Ruiz-Herrera² y Yazmin Macotela-Guzmán

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad y el sobrepeso como la acumulación excesiva de grasa corporal. En México, los resultados de la ENSANUT 2016 muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos es del 72.5%. La acumulación excesiva de grasa que se presenta en la obesidad se da principalmente en el tejido adiposo. Este tejido está formado por adipocitos, células maduras capaces de almacenar lípidos, y por la fracción estromal-vascular constituida por células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y preadipocitos, células comprometidas al linaje de adipocitos, entre otros. En el presente trabajo se buscó determinar si existen o no diferencias, en el proceso de diferenciación hacia adipocitos maduros de tres subpoblaciones de la fracción estromal-vascular (CD31-/CD45-, CD31-/CD45-/SCA1+/CD34+ y CD31-/CD45-/SCA1-/CD34) del tejido adiposo subcutáneo. Se midió la expresión de adiponectina como marcador final de la diferenciación. Se encontró que las células CD31-/CD45-/SCA1-/CD34 no crecieron, probablemente por un número inicial de células muy bajo o por cultivarlas en un medio no favorable. Mientras que no se observaron diferencias al final del proceso de diferenciación entre las subpoblaciones CD31-/CD45- y SCA1+/CD34+, sin embargo, la expresión de adiponectina a lo largo del proceso de diferenciación sugieren que la diferenciación de CD31-/CD45- inicia antes que la de CD31-/CD45-/SCA1+/CD34+.

Palabras Clave: tejido adiposo, CD31, CD45, SCA1, CD34, diferenciación

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad y el sobrepeso como la acumulación excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud. Esta condición es un factor de riesgo para numerosas enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). En México, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos es del 72.5%. Un análisis de la transición epidemiológica encontró que las enfermedades no transmisibles causaron 75% del total de las muertes. Las principales causas de muerte fueron enfermedad isquémica del corazón (EIC), enfermedad cerebrovascular, DM2 y cirrosis hepática [1].

A raíz del descubrimiento de la leptina en 1994, el tejido adiposo (TA) dejó de ser considerado un tejido inerte que almacena grasa y comenzó a estudiarse su capacidad de sintetizar hormonas y citocinas necesarias para la regulación de la homeostasis metabólica. El TA está formado por adipocitos, células especializadas en el almacenamiento de lípidos, y la fracción estromal-vascular constituida por células endoteliales, macrófagos, eritrocitos, leucocitos, fibroblastos y preadipocitos, que son células comprometidas al linaje de adipocitos, entre otras [2]. Este tejido se une mediante fibras reticulares, principalmente colágena tipo III. La unión de adipocitos forma lobulillos, los cuales conforman los lóbulos adiposos [3]. Existen dos tipos de tejido adiposo en humanos y roedores; el blanco y el café. A su vez el blanco se divide principalmente en subcutáneo y visceral, y su expansión contribuye de diferente manera al riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas secundarias [4]. Recientemente se ha mostrado que estos tejidos no solamente se diferencian por la ubicación anatómica en la que se encuentran, si no que tienen diferentes características intrínsecas, como los niveles de secreción de adiponectina, la sensibilidad a la insulina, la tasa de lipólisis y su tendencia a inflamarse. La acumulación de tejido adiposo visceral se asocia con efectos metabólicos adversos como la resistencia a insulina, DM2, dislipidemia y arterosclerosis acelerada [5-8]. Por el contrario, la acumulación de tejido adiposo subcutáneo preserva la sensibilidad a la insulina y presenta menos riesgo de desarrollar DM2, dislipidemia y arterosclerosis [9-11].

Una de las hormonas principales que secreta el tejido adiposo es la adiponectina, sus principales acciones son estimular la sensibilidad a la insulina y promover la proliferación y la diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos, potenciando la expresión de genes responsables de este proceso, así como aumentar el contenido de lípidos [12].

La diferenciación de preadipocitos (células positivas a SCA1 y CD34) (Macotela et al, Diabetes 2012) hacia adipocitos maduros, se puede realizar bajo condiciones in vitro, utilizando cultivos primarios de preadipocitos y factores de diferenciación y medios de crecimiento específicos, sin embargo, muchas de las veces se obtiene bajo índice de diferenciación. Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de crecimiento del cultivo primario de preadipocitos y diferenciarlos en adipocitos maduros, evaluamos la capacidad de diferenciación de distintas subpoblaciones de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo. Se comparó la expresión de adiponectina en cada una de las etapas del proceso de diferenciación de 3 subpoblaciones celulares: 1) células CD31-/CD45- (todos los tipos celulares excepto células endoteliales y hematopoyéticas), 2) células CD31-/CD45-/SCA1+/CD34+, (sólo células mesenquimales pluripotenciales sin ser endoteliales ni hematopoyéticas) y 3) células CD31-/CD45-/SCA1-/CD34- (el resto de tipos celulares).

METODOLOGÍA

Aislamiento de 3 subpoblaciones de células de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo: CD31-/CD45-, CD31-/CD45-/SCA1+/CD34+, CD31-/CD45-/SCA1-/CD34-: Se sacrificaron diez ratones de la cepa C57BL/6 y se recuperó el tejido adiposo subcutáneo. El tejido adiposo se cortó en pequeños trozos y se incubó en medio DMEM alto en glucosa 1% BSA con 1.5% de colagenasa tipo I por 30 minutos en agitación a 200 rpm y a 37 °C. Se filtró en jeringas con malla de 200 um y se agregó un volumen de DMEM conteniendo 1% BSA para inactivar la acción de la colagenasa. Se centrifugó a 1300 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiraron los adipocitos maduros y el sobrenadante sin tocar el pellet. Se resuspendió el pellet en 20 ml de PBS 2% FBS y se centrifugó 5 min a 1300 rpm a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos. Se incubó en hielo (4 °C) por 5 min. Se agregaron 10 ml de PBS 2% FBS y se centrifugó 5 min con las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200 ul de anticuerpo de bloqueo (1:150). Se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 1300 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 ul de una mezcla de anticuerpos α -CD31 y α -CD45 acoplados a biotina (1:100). Se resuspendió la pastilla y se incubó por 15 min en hielo. Se agregaron 400 ul de PBS 2% FBS y se centrifugó 5 min a 1300 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 100 ul de anticuerpo α -biotina acoplado a partículas magnéticas (1:5). Se resuspendió y se incubó 15 min en hielo. Se agregaron 400ul de PBS 2% FBS y se centrifugó durante 5 min a 1300rpm a 4°C. Se filtró la muestra con una membrana de 70 um (para eliminar partículas mayores a ese tamaño). Se colocaron las muestras en el equipo Auto MACS-Pro para realizar la primera separación, se recolectaron las células no marcadas y las células marcadas (CD31+/CD45+), las cuales fueron desechadas. Una parte de las células CD31-/CD45- se colocó en hielo, mientras que la otra parte se marcó positivamente. Se agregaron 200 ul de la mezcla de anticuerpos α -SCA1 y α -CD34 acoplados a PE y Alexa Fluor 480 (1:100) y se incubó 15 min en hielo. Se agregaron 400 ul de PBS 2% FBS y se centrifugó 5 min a 1300rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 80 ul de la mezcla de anticuerpos α -PE y α -Alexa Fluor 480 acoplados a partículas magnéticas y se incubó en hielo durante 15 min. Se agregaron 400 ul de PBS 2% FBS y se centrifugó 5 min a 1300 rpm a 4 °C. Se llevó una vez más al equipo de separación magnética, para obtener dos grupos celulares de interés: las células marcadas SCA1+/CD34+ y las células no marcadas SCA1-/CD34-. Con esto, se obtuvieron los tres grupos diferentes: CD31-/CD45-, SCA1+/CD34+ y SCA1-/CD34-. Se realizó un conteo de células con una cámara de Neubauer de una muestra de 10 ul de 1 ml total. Se contabilizaron las células en dos cuadrantes y se obtuvo un promedio de ambos resultados. Con el promedio obtenido se calculó el total de células con la ecuación 1), donde x = promedio de células contadas.

$$\text{Número total de células} = (x)(1)(1000)(10) \quad (1)$$

Cultivo celular: Conociendo el total de células en cada subpoblación, se sembraron la misma cantidad de células en cada pozo (35,000 células). Se agregaron 500 ul de Matrigel al 2.5 % a una placa de 12 pozos, se dispersó por toda la superficie del pozo y se retiró el exceso. Se dejó secar en la campa de flujo laminar durante 2 h. A las células CD31-/D45- se les adicionó 1 ml de medio de cremiento (GM APC's 10%FBS + factores de crecimiento (GF, LIF 10 ng/mL, EGF 10 ng/mL, bFGFG 5 ng/mL y PDGF 10 ng/mL) + Normocina) y se sembró en 2 pozos. Las otras dos subpoblaciones se sembraron en 1 pozo directamente. Cada 48 h se realizó cambio de medio a todos los pozos.

Una vez alcanzada un 80% de confluencia, se resembraron las células CD31-/CD45- y SCA1+/CD34+ en placas de 6 pozos. Para ello, se hizo un lavado con 500 ul de PBS 2% FBS. Se agregaron 500 ul de Tripsina y se retiró el excedente. Se incubó durante 3 min a 37 °C. Se agregaron 2 ml de medio y se recolectaron todas las células, evitando la formación de burbujas. Se agregó el volumen necesario del mismo medio para que cada pozo contuviera 1.2 ml.

En las células de CD31-/CD45-/SCA1-/CD34- no se observó crecimiento, por lo que se mantuvieron con cambio de medio de crecimiento cada 48 horas hasta que se decidió desecharlas.

Proceso de diferenciación de las células: Cuando las células CD31-/CD45- y SCA1+/D34+ alcanzaron el 80% de confluencia, se denominó como el día -2. En este día se agregó la proteína morfogénica de hueso 4 (BMP4) (1:1000) en medio de diferenciación (GM APC's 2% FBS). Dos días después, en el día 0, se agregó el coctel de diferenciación (insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina y rosiglitazona). En el día 3 se agregó insulina (1:1000). El proceso de diferenciación finalizó en el día 5 donde se tomaron fotos de las células. En cada uno de los días mencionados se lisaron dos pozos de cada subpoblación con 250 ul de TRIzol y se almacenaron a -20 °C.

Extracción de RNA: Con las muestras tomadas los días -2, 0, 3, y 5 para CD31-/CD45- y SCA1+/D34+ se realizó extracción de RNA. Una vez homogenizadas las muestras con TRIzol, se agregaron 50 ul de cloroformo y se agitó vigorosamente con la mano por 15 s hasta observar un color rosa lechoso. Se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, con mucho cuidado de no tocar la fase orgánica ni la interfase de proteína y se adicionaron 125 ul de isopropanol. Se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Se centrifugaron las muestras 20 min a 12000 rpm y 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se dejaron los tubos con la tapa abierta. Se lavó el pellet con 250 ul de etanol al 75% y se agitó con la mano. Se centrifugó 5 min a 7500 rpm y a 4 °C. Se decantó el sobrenadante. Se centrifugó 1 min en las mismas condiciones para finalmente eliminar el exceso de etanol con una pipeta. Se resuspendió el pellet en 20 ul de agua libre de RNAsas.

Síntesis de cDNA: Para la síntesis de cDNA se midió la concentración de RNA obtenido para calcular el volumen necesario para tener 1 ug de RNA. Dicho volumen se completó con H₂O libre de RNasas para llegar a un volumen de 14 ul. A cada muestra se le agregaron 5.8ul del mix que contenía: 1 ul de enzima RT (50U/uL), 2 ul de buffer (10 X), 0.8 ul de dNTPs (100mM) y 2 ul de random primers (10 X). Se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones: 10 min a 25 °C, 2 h a 37 °C, 3 min a 85 °C y mantenimiento a 4 °C. Una vez concluido este proceso, las muestras se diluyeron en 380 ul de agua. Se almacenaron a 4 °C.

Cuantificación de la expresión de adiponectina: El cDNA sintetizado se utilizó para realizar una reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y evaluar la expresión de adiponectina y se utilizó la expresión de Tbp como gen endógeno. En cada pozo se colocaron 5 ul del mix de reacción, el cual contenía SYBR Green y 1 uM del par de oligonucleótidos correspondiente, y 5 ul de cDNA de cada muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se sembró el mismo número de células de las diferentes subpoblaciones obtenidas. Se obtuvieron las cantidades que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Conteo de células por subpoblaciones obtenidas en el separador magnético.

| Subpoblación | Promedio de células contadas | Total de células |
|-------------------------|------------------------------|------------------|
| CD31-/CD45- | 6.5 | 65,000 |
| CD31-/CD45-/SCA1+/CD34+ | 3.5 | 35,000 |

Con estos resultados se determinó que la subpoblación CD31-/CD45- debía ser sembrada en dos pozos (cada uno con 32,500 células) y SCA1+/CD34 en un solo pozo, para iniciar así con un número similar de células. El conteo de la subpoblación SCA1-/CD34- no pudo realizarse debido a que no se observaban células con claridad, por lo que se decidió sembrarlo en un solo pozo. Fue importante realizar un conteo para sembrar el mismo número de células en todos los tipos, para que cualquier diferencia que se observara no se adjudicara al número de células iniciales.

§

La subpoblación de células SCA1-/CD34- fue desechada porque no se observó crecimiento. Esto se pudo deber a que el medio que se utilizó no era el adecuado para estas células. Al desconocerse el tipo de células que se encuentran en esta fracción se puede tratar de cultivarlas en un medio diferente para promover su crecimiento. Otro factor importante a considerar es que el número inicial de células pudo ser muy pequeño, por lo que se pueden aislar nuevamente a partir de una mayor cantidad de tejido adiposo.

En la figura 1 se observa las veces de cambio de la expresión de adiponectina en las cuatro etapas (día -2, 0, 3 y 5) del proceso de diferenciación de las subpoblaciones CD31-/CD45- y SCA1+/CD34+. Los niveles de expresión de adiponectina aumentan del día -2 al 3, y disminuyen en el día 5 para ambas subpoblaciones. La expresión de dicha hormona es significativamente mayor en la subpoblación CD31-/CD45- en los días -2, 0 y 3, lo que sugiere que el proceso de diferenciación inicia antes en este grupo de células comparada con la subpoblación SCA1+/CD34+. Sin embargo, en el día 5 (dos días después de que se agregó insulina) no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de adiponectina entre ambas subpoblaciones.

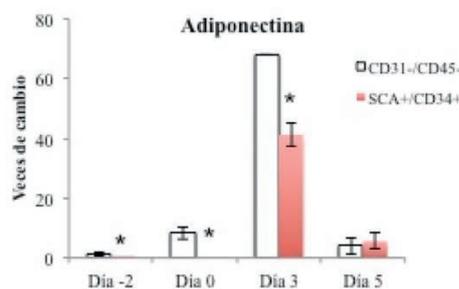


Figura 1. Expresión de adiponectina a lo largo del proceso de diferenciación en 2 subpoblaciones de células. Se realizó una PCR cuantitativa con cebadores específicos para adiponectina de ratón y se normalizó de acuerdo a la expresión de Tbp (TATA box binding protein). Los resultados se analizaron con una t de Student en cada día del proceso de diferenciación para conocer las diferencias en la expresión de adiponectina entre las dos subpoblaciones aisladas *p < 0.05 vs CD31-/CD45-.

En el día 5 se tomaron fotografías de ambos cultivos (Figuras 2 y 3). En ellas no se observa ninguna diferencia en el tamaño de las células y la abundancia de éstas, lo que coincide con que los niveles de expresión de adiponectina en ambas subpoblaciones en el día 5 son similares. Para poder identificar diferencias en todo el proceso se deben tomar fotos en cada etapa del proceso de diferenciación, y compararlas.

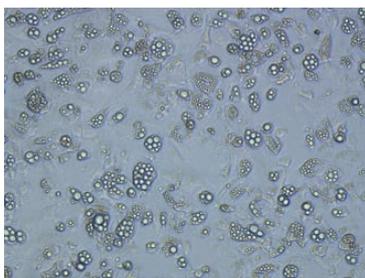


Figura 2. Día 5 del proceso de diferenciación de las células CD31-/CD45-.

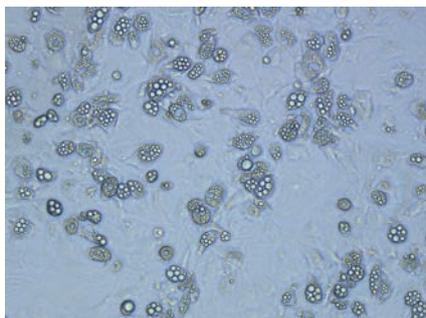


Figura 3. Día 5 del proceso de diferenciación de las células SCA1+/CD34+.

CONCLUSIONES

Se logró inducir la diferenciación de las células CD31-/CD45- y SCA1+/CD34+ en adipocitos maduros, mientras que SCA1-/CD34- tuvo que ser desechado porque no se observó ningún crecimiento. Al día 5 no se observan diferencias de las células cultivadas pero la expresión de adiponectina en el resto de las etapas del proceso sugieren que la diferenciación de CD31-/CD45- inicia antes que la de SCA1+/CD34+. Se debe repetir el experimento aislando células de una mayor cantidad de tejido adiposo para poder identificar algunas células en la subpoblación SCA1-/CD34- y poder corroborar lo encontrado. Además, se podría evaluar la diferenciación de estas mismas subpoblaciones celulares provenientes del tejido adiposo visceral, e inducir la diferenciación sin la rosiglitazona incorporada en el día 3 del proceso, ya que es un potente inductor de la diferenciación celular, lo que podría provocar una estimulación máxima de la diferenciación. También se debería evaluar la expresión de otros marcadores de diferenciación como Cebpa, Pparg, Glut4 y leptina. A pesar de la dificultad de cultivar células primarias, la experimentación en este tipo de células permite hacer preguntas o deducciones directas sobre lo que se observa, ya que al ser aisladas directamente de un organismo y no tener ninguna modificación genética o morfológica, reflejan una mayor similitud de actividad y funcionalidad a su ambiente natural.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] IEPSA, Entidad paraestatal del Gobierno Federal. (2013) “Estrategia nacional para la prevención y el control del sobrepeso, la obesidad y la diabetes” Primera edición, pp. 17-18. Consultada en http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/estrategia/Estrategia_con_portada.pdf (fecha de consulta 18-07-2017)
- [2] Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. (2013) “Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ” en Archives of Medical Science. No. 9(2), pp. 191-200. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648822/> (fecha de consulta 10-07-2017)
- [3] Montalvo, C. (2010) “Tejido adiposo” Pp 1-4. Consultada en http://histologiaunam.mx/descargas/enseñanza/portal_recursos_linea/apuntes/tejido_adiposo_2010.pdf (fecha de consulta 18-07-2017)
- [4] Wajchenberg, B. Giannella-Neto, D. da Silva, M. Santos, R. (2002) “Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome.” en Hormone and Metabolic Research. No. 34 (11-12) pp. 616–621. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660870> (fecha de consulta 18-07-2017)
- [5] Carey, V. Walters, E. Colditz, G. Solomon, C. Willett, W. Rosner, B. Speizer, F. Manson, J. (1997) “Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses’ Health Study.” en American Journal of Epidemiology. No. 145 pp. 614-9. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098178> (fecha de consulta 17-07-2017)
- [6] Wang, Y. Rimm, E. Stampfer, M. Willett, W. Hu, F. (2005) “Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men.” en The American Journal of Clinical Nutrition. No. 81 pp. 555-63. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755822> (fecha de consulta 18-07-2017)
- [7] Nicklas, B. Cesari, M. Penninx, B. Kritchevsky, S. Ding, J. Newman, A. Kitzman, D. Kanaya, A. Pahor,

- M. Harris, T. (2006) "Abdominal obesity is an independent risk factor for chronic heart failure in older people." en *Journal of the American Geriatrics Society*. No. 54(3) pp. 413-20. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551307> (fecha de consulta 19-07-2017)
- [8] Ross, R. Berentzen, T. Bradshaw, A. Janssen, I. Kahn, H. Katzmarzyk, P. Kuk, J. Seidell, J. Snijder, M. Sorensen, T. Després, J. (2007) "Does the relationship between waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference?" *Obesity Reviews*. No. 9 pp. 312-25. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956544> (fecha de consulta 19-07-2017)
- [9] Misra, A. Garg, A. Abate, N. Peshock, R. Stray-Gundersen, J. Grundy, S. (1997) "Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men." en *Obesity Reviews*. No. 5 pp. 93-9. Consultado es <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112243> (fecha de consulta 19-07-2017)
- [10] Snijder, M. Dekker, J. Visser, M. Bouter, L. Stehouwer, C. Kostense, P. Yudkin, J. Heine, R. Nijpels, G. Seidell, J. (2003) "Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study." en *American Journal of Clinical Nutrition*. No. 77 pp. 1192-7. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716671> (fecha de consulta 19-07-2017)
- [11] Tanko, L. Bagger, Y. Alexandersen, P. Larsen, P. Christiansen, C. (2003) "Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women." en *Circulation*. No.1 pp. 107. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668497> (fecha de consulta 19-07-2017)
- [12] Fu, Y. Luo, N. Klein, R. Garvey, W. (2005) "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." en *The Journal of Lipid Research*. No.56 pp.1369-79. Consultada en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15834118> (fecha de consulta 20-07-2017)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yazmin Macotela y a Xarubet Ruiz por todo su apoyo para poder realizar este trabajo. Al Instituto de Neurobiología (UNAM) y al Verano de la Ciencia de la Región Centro.

LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ARSÉNICO ALTERA RITMO CIRCADIANO ACENTUANDO LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN MODELO 3XTG-AD

Ledesma Mendoza, Brenda¹; Niño Esquivel, Sandra A²; Salgado-Delgado, Roberto³.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que cuenta con la mayoría de los casos de demencia, es marcada por la acumulación y la deposición de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares de proteína tau. Estos cambios patológicos eventualmente resultan en una gama de manifestaciones clínicas, especialmente en la disfunción circadiana. La evidencia sugiere que más que presentarse como un síntoma, la desregulación circadiana puede actuar exacerbando la patología, se sospecha de un vínculo recíproco entre el sueño, los ritmos circadianos y la deposición de amiloide, además se ha observado que la exposición crónica de arsénico inorgánico (iAs), presente en el agua potable podría acelerar la aparición de EA. En el presente trabajo se evaluaron mediante un modelo murino triple transgénico de EA (3xTg-AD), las posibles alteraciones circadianas, con el análisis de ritmicidad y actividad hipotalámica mediante inmunohistoquímica de las proteínas Perl y c-Fos respectivamente, la actividad locomotora, los indicios de neuroinflamación (RT-PCR de IL-6); así como la exposición de arsénico en la potencialización de los síntomas respecto a grupos control. En efecto, los ratones expuestos al arsénico presentaron una exacerbación general en las alteraciones circadianas respecto a los grupos control, tanto en las pruebas a nivel molecular como en la prueba conductual de actividad locomotora.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that accounts for the majority of cases of dementia, is marked by the accumulation and deposition of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles of tau protein. These pathological changes eventually result in a range of clinical manifestations, especially in circadian dysfunction. The evidence suggests that rather than presenting as a symptom, circadian dysregulation may act to exacerbate the pathology, a reciprocal link between sleep, circadian rhythms, and amyloid deposition is suspected. In addition, it has been observed that the chronic exposure of inorganic arsenic (iAs) present in drinking water could accelerate the occurrence of EA. In the present work, the possible triple circadian alterations, with the analysis of rhythmicity and hypothalamic activity by immunohistochemistry of Perl and C-Fos proteins respectively, were evaluated by a transgenic triple murine model of AD (3xTg-AD), locomotor activity, Indications of neuroinflammation (IL-6 RT-PCR); As well as the exposure of arsenic in the potentialization of the symptoms with respect to control groups. In fact, mice exposed to arsenic presented a general exacerbation of circadian alterations with respect to the control groups, both in molecular tests and in the behavioral test of locomotor activity.

Palabras Clave: Enfermedad de Alzheimer, ritmo circadiano, arsénico.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es por mucho la causa más común de demencia, representando hasta el 75% de todos los casos. Es una enfermedad neurodegenerativa, cuya patología se caracteriza por la muerte de células neuronales y la atrofia cerebral, marcada por la acumulación y la deposición de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares de proteína tau (Landry y Liu-Ambrosy, 2014). Estos cambios patológicos eventualmente resultan en una gama de manifestaciones clínicas, especialmente en la disfunción circadiana. El reloj circadiano es coordinado por el núcleo supraquiasmático (NSQ) ubicado en el hipotálamo, desde donde controla procesos fisiológicos que incluyen la secreción hormonal, el metabolismo y el sueño; por lo que en la EA se presentan frecuentemente desordenes como somnolencia diurna, despertar continuo durante la noche y fragmentación del sueño (Song et. al, 2015). La evidencia sugiere que más que presentarse como un síntoma, la desregulación circadiana puede actuar exacerbando la patología. Hace tiempo que se sospecha de un vínculo recíproco entre el sueño, los ritmos circadianos, y la deposición de amiloide. La privación o fragmentación del sueño puede ser el resultado del envejecimiento, otras enfermedades, influencias ambientales, disfunción del reloj circadiano o neurodegeneración. El aumento del periodo de vigilia aumenta la actividad simpática, suprimiendo la función del sistema linfático; esto podría resultar en una disminución de la eliminación de las proteínas patógenas, como la β amiloide ($a\beta$). Por otro lado, cada año se reporta un mayor número de personas expuestas al arsénico inorgánico (iAs) a través del agua potable relacionándose con un deterioro de la función cognitiva como resultado de la exposición prenatal y de la infancia iAs, mientras que los estudios en modelos animales en condiciones similares muestran deficiencias neurocomportamentales acompañadas de alteraciones proteicas y enzimáticas asociadas a la EA. La pérdida del sueño y la disrupción circadiana también promueven el estrés oxidativo, la inflamación y la pérdida de la homeostasis sináptica. Estos sucesos combinados promueven a la neurodegeneración, que a su vez causa más disfunción circadiana (Musiek et. al, 2015).

En el presente trabajo se pretende evaluar con un modelo transgénico de EA, las posibles alteraciones circadianas que se podrían presentar al tiempo que se mide la proteína reloj Perl, encargada de la ritmicidad, y la proteína C-Fos, involucrada en la actividad hipotalámica. Así mismo evaluar si la exposición a iAs agrava esta enfermedad, siendo un factor de riesgo ambiental de neurodegeneración, y los efectos de la promoción de la inflamación por disrupción circadiana.

MARCO TEORICO

Mediante el uso de modelos animales diseñados para imitar la exposición ambiental humana al arsénico, sabemos que la administración oral del arsénico produce alteraciones neuroquímicas y conductuales, mismas que se han asociado con la EA en la población humana. Millones de personas están expuestas a este tóxico a través del agua potable, y la exposición afecta a casi todos los órganos del cuerpo además del cerebro. En el presente trabajo se empleó el modelo murino transgénico (3xTg-AD) de 6 meses de edad, ya que simula de manera muy similar a la EA en humanos al expresar el precursor de $\text{A}\beta$ (APP) y la proteína tau, con el objetivo de evaluar si la exposición crónica a iAs exacerba los cambios bioquímicos, conductuales y patológicos de la EA.

MÉTODOS Y MATERIALES

1. Genotipificación de modelo murino 3xTg-AD

Se llevó a cabo la genotipificación de 6 ratones 3xTg-AD (3 controles y 3 en exposición a arsénico por medio del consumo de agua contaminada)

1.1 Extracción de DNA

El tejido empleado fue un segmento de la cola del ratón, la cual se colocó en un tubo eppendorf con 500 μL de NaOH 0.05M durante 15 min en termobloque a 95°C, posteriormente se añadió la solución stop (EDTA 10mM y Tris 1M) y se llevó a vórtex 3s.

1.2 PCR punto final

Se realizó una solución stock para 6 muestras conteniendo oligos (APP, cassette THY, Tau), dNTP's, MgCl, buffer 10X PCR, agua, DNA de la extracción previa (respectivo a cada muestra) y Taq polimerasa; después se llevó a un termociclador con la siguiente configuración: 95°C durante 2.30 min, 35 ciclos a 94°C por 40 s, 62°C por 40 s y 72°C por 1 min, extensión final de 72°C por 2 min y 4°C hasta su almacenamiento.

Para confirmar los productos de amplificación se corrieron los mismos en gel de agarosa al 1% y Bromuro de Etidio, empleando el marcador de peso molecular de 1 000 pb, con las condiciones de 90V por 25 min.

2. Análisis de actividad locomotora

Los ratones se alojaron en jaulas individuales, dentro de un rack para el registro automático de la conducta, el cual cuenta con sensores infrarrojos y de presión que contabilizaron los cambios en la presión y el desplazamiento del animal cada minuto. Se mantuvieron en un periodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad (L/O) tomando como ZT0 las 7 horas (el inicio de la luz, día), y como ZT12 las 19 horas (inicio de la oscuridad, noche); la medición se realizó durante 15 días. Posteriormente se realizaron himnogramas cada 15 minutos para formar un actograma y un perfil de actividad de los grupos control y arsénico, de machos y hembras.

3. Procesamiento de muestras biológicas

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (0.2ml por ratón; concentración 63mg/ml), los tejidos fueron lavados con solución salina 0.9% y fijados con paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez fijado el tejido se extrajo el cerebro, se conservó 4 días en PFA 4% y posteriormente se trasladó a una solución de sacarosa 30% para crio protegerlo y cortarlo. Se realizaron cortes coronales de 30 micras a -18°C en criostato, depositados de forma seriada en 4 pozos por grupo y ratón (Ratones 3xTg-AD, 3 control y 3 con exposición a arsénico).

4. Análisis de actividad hipotalámica con inmunohistoquímica de C-fos

4.1 Pre-incubación

Se realizó un lavado con PBS 1X por 5 min, posteriormente un lavado con PBS 1 X adicionando 900 μL de peróxido 30% por 5 min y 3 lavados con PBS 1 X por 5 min.

4.2 Incubación con anticuerpo primario

Se preparó una solución de anticuerpo anti-rabbit Fos en solución Supermix a una concentración 1/2500 μL y se colocó en una placa de 24 pozos, se agregó el tejido a su pozo correspondiente y se dejó en incubación con agitación durante 2 días.

4.3 Revelado

Se dejó la placa a Tamb por 1 hora, enseguida se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min. Posteriormente se preparó la solución de anticuerpo Antirabbit biotinilado en reactivo Supermix a una concentración 1/200 μL y se dejó en incubación con agitación por 2 hora, después se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min y se añadió la solución de Abidina Biotina a una concentración 1/500 μL y se dejó en incubación con agitación por 2 horas.

4.4 Activación

Se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min, posteriormente se depositaron los tejidos en 50 mL de solución de revelado (Diaminobencidina, TBS 1X, peróxido 30%, Sulfato de amonio y níquel 10%) y se incubó en agitación 1 min, se observó al microscopio para asegurar la presencia de marcaje y se detuvo la reacción con 3 lavados de PBS por 5 min, Se almacenó en PBS 1X hasta su montaje.

4.5 Montaje y conteo de marca

Se colocaron las rebanadas en portaobjetos gelatinizados con ayuda de un pincel y se observaron en microscopio de campo claro AxioScopeA1-Zeiss, posteriormente se ubicaron los núcleos cerebrales NSQ y PVN y se tomaron fotografías de los mismos con el objetivo 10x y 20x. Se realizó un conteo de marca con ayuda del software ImageJ, para posteriormente graficar los resultados.

5. Análisis de actividad rítmica del hipotálamo con inmunohistoquímica de Perl

Se realizó con la misma metodología del punto 4 de esta sección, empleando como anticuerpo primario Antirabbit Perl a una concentración 1/200 y tiempo de revelado de 5-8 min.

6. Extracción de RNA de corteza prefrontal e hipotálamo

Se recolectó 30-40 mg de tejido prefrontal e hipocampo, al cual se adicionaron 200 uL de trizol para homogenizar en condiciones frías con pistilo Potter y proseguir con la extracción con el método Trizol®. Se cuantificó y determinó pureza por medio de espectrofotometría y se corrió en gel de agarosa a condiciones desnaturalizantes.

7. RT-PCR de IL-6

Con el RNA previamente extraído, se realizó una retrotranscripción con el kit GoScript Reverse Transcription System® de promega, con las siguientes condiciones: 25°C por 5 min, 42°C por 42 min, y 70°C 15 min. Se realizó una cuantificación y determinación de pureza del cDNA obtenido y se prosiguió a realizar una amplificación por PCR siguiendo las condiciones del kit dreamTaq DNA®.

RESULTADOS

1. Genotipificación de modelo murino 3xTg-AD

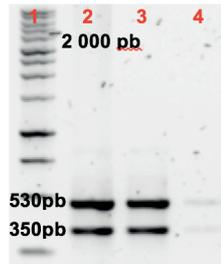


Figura 1. Amplificación de gen APP en ratones 3xTg

La identificación del gen APP correspondiente a la banda de 530 pb y tau en la banda 350 pb nos confirma que el modelo empleado está genéticamente modificado, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer. En el carril 1 el marcador de peso molecular (2 000pb), en el carril 2 y 3 DNA de dos ratones 3XTG-AD, y en carril 4 control negativo.

2. Análisis de actividad locomotora

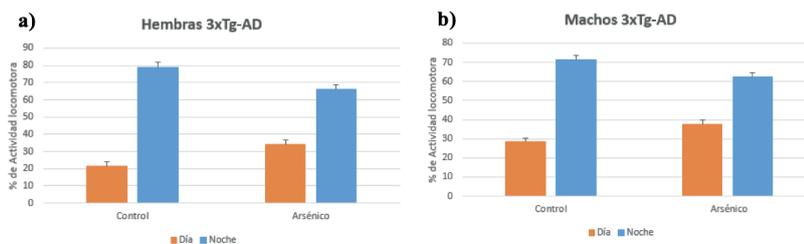


Figura 2. Análisis de actividad locomotora en fotoperiodos 12 horas L/O.

Si bien hasta este punto temporal el posible efecto no es muy pronunciado, en apariencia, la actividad locomotora tiene una variación de aproximadamente 15% en las hembras y 10% en los machos, presentando un aumento de actividad en la fase de descanso de los ratones (Día) y con una disminución en la fase de vigilia (Noche), por lo que se tiene un indicio de alteración de los ritmos en términos de sueño al comparar los grupos control con los arsénico.

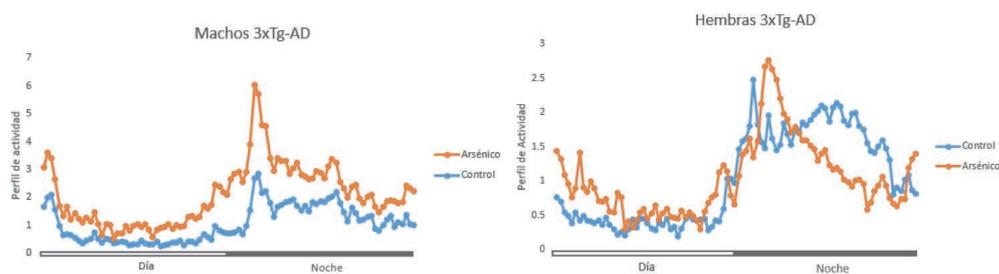


Figura 3. Actogramas en fotoperiodos 12 horas L/O.

El perfil de actividad muestra el promedio de la actividad durante 15 días en intervalos de 15 min durante 24 horas. Los cambios más evidentes se muestran en las hembras 3xTg-AD, en ambos fotoperiodos, mientras que en los machos, a pesar de no mostrar cambios muy destacados, si se observa cierta irregularidad entre los grupos comparados.

4. Análisis de actividad hipotalámica con inmunohistoquímica de C-fos

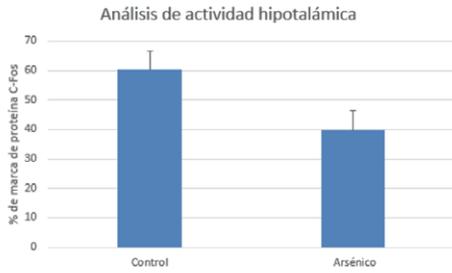


Figura 4. Análisis de actividad hipotalámica.

La expresión protéica de c-Fos es aproximadamente un 20% menor en el grupo con exposición a arsénico respecto al grupo control, al relacionarse directamente con la actividad hipotalámica se sugiere que las alteraciones de procesos fisiológicos coordinados por el hipotálamo, se verán alteradas, siendo que ambos grupos se encuentran en el mismo punto temporal de la EA; sin embargo después de prueba F de varianzas ($\alpha=0.05$) se concluyó que las diferencias no son significativas, por lo que se sugieren mediciones en distintos puntos temporales de acuerdo al avance de la EA en el modelo murino.

5. Análisis de actividad rítmica del hipotálamo con inmunohistoquímica de Per1

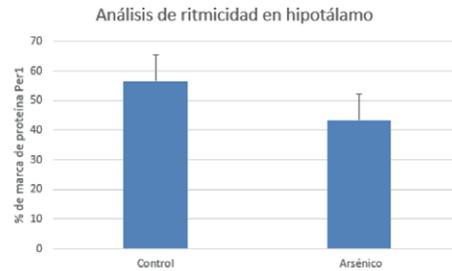


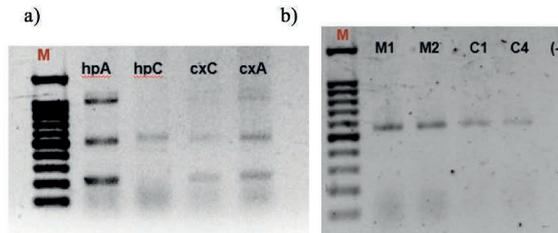
Figura 5. Análisis de ritmicidad en hipotálamo

Este resultado en particular muestra que efectivamente está comenzando un proceso de desincronización en los ritmos circadianos. A nivel molecular, con la expresión de esta proteína reloj Per1, y a nivel conductual en los actogramas antes presentados. Se realizó una prueba F de varianzas ($\alpha=0.05$) para confirmar las diferencias entre grupos, concluyendo que dichas diferencias son estadísticamente significativas.

7 RT-PCR de IL-6

Figura 6. Gel de agarosa 1% con productos de RT-PCR de IL-6

a) Se muestra el marcador de peso molecular, seguido de productos de hipocampo arsénico (hpA) y control (hpC); productos de corteza control (cxC) y arsénico (cxA);
b) Marcador de peso molecular, seguido de productos de corteza, muestras de grupo arsénico (M1 y M2) y control (C1 y 4), y control negativo.



La banda de 555 pb correspondiente a IL-6, se puede observar en ambos grupos y ambos tejidos, sin embargo la visualización más nítida e intensa se observa en los grupos arsénico respecto a los grupos control. De acuerdo con la literatura, la desincronización en el reloj biológico se ve reflejada en alteraciones a procesos como el sueño, lo cual trae consigo cambios en la expresión humoral puntualmente en la melatonina; esta hormona en sobreproducción promueve la neuroinflamación. La IL-6 es una de las citocinas mayormente producidas por el sistema inmune, por lo que podía anticiparse que su expresión fuese mayor al empeorar desincronización circadiana, tal como sucede en los ratones expuestos a arsénico

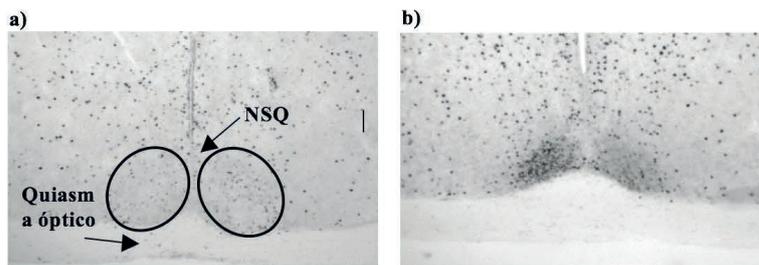


Figura 7. Inmunohistoquímica c-Fos

a) Corte de tejido anterior de ratón 3XTG-AD, grupo con exposición a arsénico. Visto desde 10X, señalando el área del núcleo supraquiasmático (NSQ) en la zona centro, superior al quiasma óptico.
b) Corte de tejido anterior de ratón 3Xtg-AD, grupo control. Visto desde 10X; se observa claramente una mayor presencia de proteína c-Fos respecto al grupo con exposición a arsénico.

CONCLUSIONES

Fue posible evaluar las alteraciones circadianas en el modelo 3xTg-AD, visualizando cambios en la expresión de la proteína reloj Perl, cambios conductuales y cambios correspondientes a los efectos secundarios de dichas alteraciones; lo que nos da un panorama general en el estudio de la reciprocidad entre la EA, los ritmos circadianos y las influencias ambientales, vertientes que seguirán siendo evaluadas debido a su estrecha e incomprendida relación. A su vez, se sugiere la incorporación de más análisis estadísticos para comprobar la significancia de los cambios encontrados entre grupos control y grupos arsénico, así como la incorporación de grupos wildtype que complementen las conjeturas realizadas.

BIBLIOGRAFIA

- LANDRY, G. & LIU-AMBROSE, T. (2014). Buying time: a rationale for examining the use of circadian rhythm and sleep interventions to delay progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, diciembre, Vol. 6, Artículo 325, 1-21.
- SONG, H., MOON, M., CHOE, H. K., HAN, D., JANG, C., KIM, A., CHO, S., KIM, K. & MOOK-JUNG, I. (2015). A β -induced degradation of BMAL1 and CBP leads to circadian rhythm disruption in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, febrero-marzo, 10:13.
- MUSIEK, E.S., XIONG, D. D. & HOLTZMAN, D. M. (2015). Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer Disease. *Experimental & Molecular Medicine*, marzo, Vol. 47.

RELACIÓN ENTRE EL COMPORTAMIENTO DE AUTOMANEJO Y SINTOMAS DEPRESIVOS EN ADULTOS MAYORES CON ENFERMEDAD CRÓNICA DIAGNOSTICADA

Carrillo-Contreras, Treccy Yohana ; Delabra-Salinas, María Magdalena ; Cordova-Peñarrieta María Isabel

RESUMEN

Se realizó un estudio correlacional de la relación entre el comportamiento de automanejo en sus diferentes dimensiones (conocimiento de la enfermedad, adherencia al tratamiento, manejo del impacto físico, mental y social por la enfermedad) y síntomas depresivos de la medición basal en 146 personas en etapa de pre vejez y vejez diagnosticadas con enfermedad crónica, participantes del estudio cuasi experimental de intervención de enfermería "Tomando el control de su salud" Sede Saltillo. Los resultados de la muestra basal no mostraron relación significativa entre el comportamiento de automanejo global, ni por esferas con síntomas depresivos.

ABSTRACT

A correlational study of the relationship between self-management behavior in its different dimensions (knowledge of the disease, adherence to treatment, management of physical, mental and social impact by disease) and depressive symptoms of baseline measurement in 146 people in Stage of pre-old age and old age diagnosed with chronic disease, participants in the quasi-experimental study of nursing intervention "Taking control of their health" Saltillo Headquarters. The results of the baseline sample did not show a significant relationship between self-management behavior in a global approach and depressive symptoms.

Palabras Clave: Depresión, automanejo, enfermedad crónica

INTRODUCCIÓN

El automanejo se refiere a la habilidad de la persona, junto con su familia, comunidad y equipo de salud para manejar síntomas, tratamientos, cambios en estilo de vida y las consecuencias psicosociales, culturales y espirituales de las enfermedades crónicas (Richard y Shea, 2011).

El éxito o fracaso del automanejo en pacientes con enfermedad crónica diagnosticada está determinado por distintos factores como: el tratamiento y la enfermedad (complejidad del tratamiento, duración de la enfermedad y calidad en la prestación de la atención médica), factores intra personales (edad, sexo, autoestima, depresión y ansiedad), factores inter personales (calidad en la relación entre pacientes y facilitadores de servicios de salud) y factores ambientales. (Elsay y Albright, 2001)

Las personas con enfermedades crónicas no solo tienen que lidiar con los síntomas de su enfermedad, sino que además tienen que hacer frente al impacto emocional que ésta pueda tener en su vida. (J. Franek, 2012) Investigaciones recientes confirman que los individuos con enfermedades crónicas son más propensos a presentar síntomas depresivos que aquellos que no las padecen.

De acuerdo a la Organización Panamericana De La Salud, el personal de enfermería juega un rol muy importante al hablar de automanejo ya que son los encargados de brindar recursos para mejorar la confianza de los pacientes en su capacidad para ejecutar tareas específicas de cuidado personal con el objetivo de desarrollar habilidades que los ayudaran a tener un mejor manejo de los síntomas de sus enfermedades crónicas y con esto conseguir una mejor calidad de vida.

El objetivo principal del estudio fue describir la relación entre el comportamiento de automanejo y síntomas depresivos en adultos mayores y personas en etapa de pre vejez con enfermedad crónica diagnosticada que aceptaron inicialmente participar en el proyecto de intervención "Tomando el control de su salud" Sede Saltillo.

MARCO TEORICO

El apoyo eficaz al automanejo ayuda a las personas a enfrentar los problemas generados por los síntomas de padecer una enfermedad crónica, tratando de reducir complicaciones y síntomas, tales como la depresión que puedan causarle algún tipo de discapacidad. Se realizó un análisis de literatura del cual se pueden mencionar diversos programas de automanejo tales como el modelo de automanejo de la Universidad de Stanford para el autocuidado en pacientes con enfermedades crónicas y las redes temáticas de automanejo en enfermedades crónicas, que se centran en la importancia del papel que juega el paciente al momento de manejar los síntomas de su enfermedad.

Se han utilizado diversos métodos al momento de tratar de brindar las herramientas necesarias que puedan aumentar la capacidad de automanejo en los participantes de dichos programas, tales como: consultas comunes, sesiones grupales, cursos virtuales, educación a distancia, aplicaciones para celulares, todo esto con el fin de adecuarse a las necesidades de cada persona.

La mayoría de los programas de automanejo han presentado resultados favorables aunque poco significativos relacionados con la dimensión emocional de los participantes. Independientemente de los resultados es un área que no debe descuidarse ya que un paciente emocionalmente estable es más apto para manejar los

síntomas de su enfermedad, trabaja eficazmente en colaboración con el personal de salud y por consiguiente se presenta una notable mejoría en su calidad de vida.

El programa “Tomando el control de su salud” fue desarrollado por el centro de investigación para la educación de pacientes de la Universidad De Stanford como un proyecto de investigación con el propósito de aumentar el nivel de automanejo y control de síntomas en pacientes con enfermedades crónicas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se utilizó un diseño descriptivo correlacional para describir la relación entre el comportamiento de automanejo en sus tres dimensiones (conocimiento, adherencia y manejo del impacto físico, mental y social por la enfermedad) y la presencia de síntomas depresivos en adultos mayores y personas en etapa de pre vejez participantes del proyecto de intervención “Tomando el control de su salud” Sede Saltillo.

Los datos iniciales fueron tomados por estudiantes de licenciatura y maestría previamente capacitados. La medición basal se tomó en diferentes centros de salud de la jurisdicción #8 de Secretaria de Salud en Saltillo, utilizando un muestreo por conveniencia, ya que los participantes seleccionados fueron adultos mayores y personas en etapa de pre vejez que fueron usuarios de dichos centros de salud, diagnosticados con alguna enfermedad crónica o síntoma crónico y que aceptaron participar en la intervención de enfermería “Tomando el control de su salud”. El comportamiento de automanejo fue medido en un enfoque global utilizando el Partners In Health Scale (PHS) el cual consta de un total de 12 ítems. Para medir el nivel de conocimiento de la enfermedad se utilizaron 2 ítems; la adherencia con 6 ítems y para medir el impacto físico, mental y social de la enfermedad se utilizaron 4 ítems del instrumento original (PHS), para las 3 esferas, la relación del puntaje es directamente proporcional, de tal manera que a mayor puntaje, mayor dominio de automanejo.

En cuanto a la medición de los síntomas depresivos se aplicó una escala analógica visual desarrollada por la Universidad De Stanford, la cual incluye un total de 8 preguntas de escala tipo Likert en donde cada pregunta tiene un valor de 0 a 3, dando una sumatoria total de 24 puntos, en éste un menor puntaje indica menores síntomas depresivos. (Downie W. Leathan, 1975 y González Stewart, 1995)

RESULTADOS

Los resultados representan el 100% de la muestra basal del proyecto de intervención “Tomando el control de su salud” Sede Saltillo, el cual comprendió los Centros de Salud de la jurisdicción #8 de la Secretaria De Salud, conformada por: Centro De Salud Madero, Centro De Salud González, Centro De Salud Girasol, Centro De Salud Ramos en los turnos matutino y vespertino (Tabla 1). La media de edad fue 59 (+ 12.440) años, con rangos de 29 a 88 años. El 89% (130) son de sexo femenino y el 11% (16) de sexo masculino. El 60.3% (88) de los participantes son casados, 21.2% (31) viudos, 4.8% (7) divorciados y 13.7% (20) solteros. En cuanto a las enfermedades padecidas por los participantes, el 37.4% (55) presentó diabetes tipo 2, 16.6% (24) diabetes tipo 1, el 2.1% (3) asma, el 3.4% (5) bronquitis, el .7% (1) alguna otra enfermedad de pulmón, el 65.5% (95) presión alta, el 2.8% (4) alguna otra enfermedad del corazón, el 6.2% (9) artritis, el 1.4% (2) cáncer, el 6.9% (10) depresión, el 2.8% (4) ansiedad y el 6.2% (9) alguna otra enfermedad.

Tabla 1. Centros de salud.

| Centro de salud | Frecuencia | Porcentaje |
|-----------------|------------|------------|
| Madero | 33 | 22.6 |
| González | 30 | 20.5 |
| Girasol | 21 | 14.4 |
| Ramos TM | 34 | 23.3 |
| Ramos TV | 28 | 19.2 |
| Total | 146 | 100 |

Nota: n=146 medición basal

Las pruebas de Kolmogorov se mostraron normales, inicialmente los participantes mostraron un adecuado comportamiento de automanejo.

Los resultados no mostraron una relación significativa entre las variables de comportamiento de automanejo en sus diferentes dimensiones (conocimiento de la enfermedad, adherencia al tratamiento y manejo del impacto físico, mental y social) y los síntomas depresivos presentando $P \geq 0.5$

Al realizar el análisis de la comparación de Automanejo y Síntomas depresivos por género, se encontró una diferencia significativa en el nivel de comportamiento de automanejo en un ámbito global, presentando ($X=70.350+15.63$) por parte de los hombres y ($X=79.1923+13.09$) por parte de las mujeres. Lo que indica que para esta población, el Automanejo es mayor en mujeres que en hombres (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento de automanejo.

| Variables | Hombres | | | Mujeres | | |
|------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|
| | X | D E | M i n - M a x | X | D E | M i n - M a x |
| Su ma m | 7 0. 3 5 0 | 15 .6 38 17 | 3 7 - 9 6 | 7 9. 1 9 2 3 | 13 .0 90 68 | 3 6 - 9 6 |
| AM C | 1 1. 6 6 7 | 4. 59 29 6 | 1 - 1 6 | 1 2. 5 0 0 0 | 4. 06 39 3 | 0 - 1 6 |
| AM A | 3 5. 9 3 3 3 | 8. 25 02 5 | 1 9 - 4 8 | 3 8. 1 2 3 1 | 8. 59 15 2 | 1 1 - 4 8 |
| AM M | 2 6. 9 3 3 3 | 5. 48 33 1 | 1 7 - 3 2 | 2 8. 8 0 9 2 | 4. 11 64 0 | 1 4 - 2 2 |

Nota: n_{hombres}=16; n_{mujeres}=130

37

CONCLUSIONES

Los estudios relacionados muestran que a pesar de no existir relación significativa entre el nivel de comportamiento de automanejo y síntomas depresivos de los pacientes diagnosticados con enfermedad crónica, se deben seguir implementando estrategias para disminuir el nivel de síntomas depresivos en los participantes de los programas de intervenciones pero también llevar a cabo actividades que prevengan la aparición de los mismos en pacientes que en un inicio no los presentan, todo esto con el objetivo de lograr que los participantes tengan un mejor nivel de automanejo de síntomas derivados de su enfermedad y con esto logren desarrollarse satisfactoriamente dentro de todas sus esferas (física, emocional y social)

BIBLIOGRAFIA

Amador-Díaz, MB; Márquez-Celedonio, FG; Sabido-Sighler, AS.; (2007). Factores asociados al autocuidado de la salud en pacientes diabéticos tipo 2. Archivos en Medicina Familiar, Abril-Junio, 99-107.

Grey, M., Knafl, K., & Mccorkle, R. (2006). A framework for the study of self- and family management of chronic conditions. *Nursing Outlook*, 54(5), 278-286. doi:10.1016/j.outlook.2006.06.004

Rosland, A. M. (2008). When is social support important?. The association of family support and professional support with specific Diabetes self management behaviors. *Society of general intern medicine*.

De Cordova, M. P. (2017). Effectiveness of a chronic disease self-management program in Mexico: A randomized controlled study. *Journal Of Nursing Education and practice*, 7, 7th ser., 87-94.

Cuidados innovadores para las condiciones crónicas - paho.org. (n.d.). Retrieved August 17, 2017, from <http://www.bing.com/>

RECUPERACIÓN DE NAPROXENO POR MEDIO DE MEMBRANAS LÍQUIDAS EMULSIONADAS.

CNinfa Anahi Lleverino Sifuentes¹ y Teresa Alejandra Razo Lazcano²

RESUMEN

En este trabajo se estudió la recuperación de naproxeno mediante la técnica de Membranas Líquidas Emulsionadas. Dado a los resultados, se determinó la influencia de la concentración de surfactante (Abil EM 90®) y de extractante (TOA) en la estabilidad de las emulsiones y, por lo tanto, en su eficacia para la recuperación de naproxeno. Los resultados muestran que una concentración de Abil EM 90® al 5% m/V, es adecuada para obtener emulsiones estables capaces de extraer y recuperar naproxeno con porcentajes del 99% y 34%, respectivamente, a partir de soluciones acuosas a pH 5.5, y con perfiles de tamaño de partícula uniformes.

ABSTRACT

In this work, a study of naproxen recovery from aqueous solutions by Emulsion Liquid Membranes was performed. It was possible to determine the effect of the surfactant (Abil EM 90®) and carrier on the emulsions stability and, therefore, on their efficiency to naproxen recovery. The results shown that a surfactant concentration of 5% w/V is favorable to obtain a stable emulsion able to extract and recover naproxen with percentages of 99% and 34%, respectively, from aqueous solutions at pH value of 5.5 and with drop diameter distributions uniform.

Palabras Clave: Membranas líquidas emulsionadas, naproxeno, microcontaminantes.

INTRODUCCIÓN

El aumento en el consumo de productos farmacéuticos en la medicina humana y veterinaria ha ganado suma atención los últimos años por representar un riesgo potencial para el medio ambiente. El medio acuático ha sufrido las mayores consecuencias ya que diversos estudios en agua de ríos, mares y aguas residuales han demostrado la presencia de estos compuestos orgánicos, los cuales son constantemente liberados al medio ambiente sin ninguna restricción. Estos compuestos se encuentran presentes en concentraciones muy bajas, por lo que son nombrados como microcontaminantes, sin embargo, su acumulación puede llegar a ser nociva para los distintos organismos vivos que se encuentran presentes en los medios acuáticos. Aún cuando la investigación científica sobre los efectos tóxicos de los microcontaminantes también va en aumento, la información sigue siendo muy limitada, pero se conoce que algunos organismos del medio acuático presentan los mismos receptores enzimáticos que los humanos, por lo tanto, son susceptibles a efectos farmacodinámicos similares. Por lo anterior, es necesario tomar medidas para salvaguardar los riesgos ambientales que estos desechos representan (Nikolaou et al, 2007; Santos et al, 2007).

Numerosos estudios han comprobado que en el agua residual se encuentra la mayor fuente de desechos farmacéuticos, debido a que los humanos son los principales consumidores tanto en el hogar como en hospitales. Los fármacos más concurridos son los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos. Entre los antiinflamatorios se encuentran el diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno y naproxeno, de los cuales el ibuprofeno y el naproxeno se presentan en concentraciones más altas por su uso como analgésicos y antipiréticos (Lapworth et al, 2012; Razo et al, 2014). Constantemente se han desarrollado nuevos métodos analíticos para controlar y evitar la acumulación de los microcontaminantes en el medio ambiente, sin embargo, se siguen requiriendo diversos estudios para desarrollar soluciones que se puedan adecuar a las condiciones de las fuentes de contaminación. Al ser el tratamiento de aguas residuales la fuente más importante de contaminación, se requiere de una mayor atención hacia ésta, debido a que los tratamientos convencionales no son específicos para eliminar productos farmacéuticos, y la única manera es adsorbiendo las partículas sólidas o por medio de biodegradación, ya sea mediante procesos de coagulación-floculación, ultrasonido, fotodegradación y oxidación. (Nikolaou et al, 2007; Santos et al, 2007)

Un método que ha demostrado ser efectivo para ayudar a la eliminación de estos microcontaminantes, es el uso de membranas líquidas emulsionadas, las cuales se componen de una emulsión primaria compuesta de dos fases inmiscibles, una de ellas orgánica y la otra acuosa. En la fase orgánica se encuentra presente un solvente hidrofóbico, un surfactante y un extractante selectivo para el compuesto de interés, mientras que la fase acuosa presenta condiciones que permiten la recuperación del componente. El proceso se basa en transferir la especie de interés de la fase acuosa externa a la fase de emulsión, y de ésta a la fase acuosa interna (Razo et al, 2014). Así, el objetivo del presente trabajo es el de desarrollar un método de separación mediante la técnica de Membranas Líquidas Emulsionadas para llevar a cabo la recuperación de naproxeno a partir de efluentes acuosos.

MÉTODOS Y MATERIALES.

Se llevó a cabo una serie de estudios para determinar los parámetros que permitieran el desarrollo de

emulsiones estables para la separación de naproxeno presente en soluciones acuosas.

Preparación de emulsiones.

Se puso en contacto volúmenes iguales de fase orgánica (FO) y la fase acuosa interna (FAI). La fase orgánica estaba compuesta por el solvente orgánico N-Dodecano y el surfactante Abil EM 90®, así como, por trioctilamina (TOA), estos dos últimos a diferentes concentraciones. Mientras que la fase acuosa interna se encontraba formada por hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 mol.L⁻¹. Posteriormente, la mezcla se agitó a una velocidad de 15 000 rpm, a temperatura constante (25 ± 1)°C durante 10 minutos.

Proceso de extracción y recuperación.

Una vez obtenida la emulsión, de manera inmediata, se puso en contacto con la fase acuosa externa (FAE) que contenía 50 mg.L⁻¹ de naproxeno (NPX) en un buffer de fosfatos a pH 5.5. Posteriormente, se colocaron en agitación a una velocidad moderada durante 5 minutos. Una vez finalizada la agitación, se recuperó la fase acuosa externa, a la cual se le determinó el valor de pH y se cuantificó el naproxeno mediante Espectrofotometría UV/Vis a una longitud de onda de 272 nm.

Para la recuperación de naproxeno, se llevó a cabo el rompimiento de las membranas mediante choque térmico, el cual consistió en congelar la fase de emulsión y, posteriormente someterla a un cambio de temperatura más alta (37°C), y se procedió a separar la fase acuosa interna de la fase orgánica. Una vez separados se determinó el valor de pH de la fase acuosa interna y se cuantificó el naproxeno a las mismas condiciones que las utilizadas en la fase acuosa externa.

Los porcentajes de extracción y recuperación fueron obtenidos mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%E = \frac{[Naprox]_{inicial} - [Naprox]_{final}}{[Naprox]_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

donde:

%E = porcentaje de extracción.

[Naprox]_{inicial} = concentración inicial de naproxeno en fase acuosa externa.

[Naprox]_{final} = concentración final de naproxeno en fase acuosa externa.

$$\%R = \frac{[Naprox]_{FAI}}{[Naprox]_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

donde:

%R = porcentaje de recuperación.

[Naprox]_{FAI} = concentración de naproxeno en fase acuosa interna.

[Naprox]_{inicial} = concentración inicial de naproxeno fase acuosa externa.

Determinación del tamaño de partícula.

A cada emulsión antes y después del proceso de extracción de naproxeno, se le determinó el tamaño de partícula a través de difracción dinámica de la luz mediante el analizador láser Mastersizer 3000.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Para la preparación de las emulsiones se han considerado diferentes parámetros de formulación como lo es el tiempo de emulsificación (tiempo necesario para formar la emulsión) y la velocidad de agitación para la formación de la emulsión, los cuales ya han sido establecidos en trabajos anteriores (Razo et al, 2014.) con valores de 10 minutos y 15000 rpm, respectivamente.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, en el presente trabajo se estudiaron dos factores: la influencia de la concentración de surfactante y de extractante.

Concentración de surfactante.

Los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la concentración de surfactante se presentan a continuación. La figura 1 muestra las granulometrías obtenidas para cada una de las emulsiones preparadas a las diferentes concentraciones de Abil EM 90®.

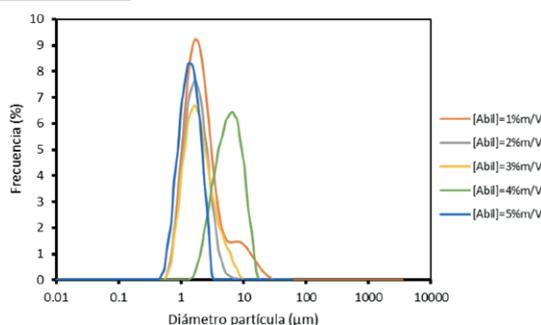


Figura 1. Granulometrías obtenidas a partir del estudio de la influencia de la concentración de surfactante. FO: Dodecano + Abil EM 90®; FAI: NaOH 0.1 mol.L⁻¹; v = 15000 rpm, t_{emulsificación} = 10 min, T = (25 ± 1)°C, V_{FAFO} = 1.

A partir de las granulometrías obtenidas, se observa que conforme se incrementa la concentración de surfactante, la amplitud de la curva de distribución del tamaño de partícula es menor, es decir, existe menor polidispersidad (los tamaños de partícula son más homogéneos en toda la muestra) y, por consecuencia, un aumento en la estabilidad de la membrana líquida.

Los resultados obtenidos en el estudio de recuperación del naproxeno a través de las membranas líquidas emulsionadas son mostrados en la Figura 2, en donde se han graficado los porcentajes de extracción (transferencia de masa desde fase acuosa externa hacia fase orgánica) y recuperación (transferencia de masa desde fase acuosa externa hacia fase acuosa interna), utilizando como fase orgánica dodecano + Abil EM 90® a diferentes concentraciones (1 – 5% m/V).

Analizando la figura, se puede apreciar que a mayor concentración de Abil EM 90®, los porcentajes de extracción del fármaco tienden a incrementar, es decir, el surfactante por sí solo es capaz de extraer al naproxeno. Sin embargo, los porcentajes de recuperación presentan un comportamiento diferente, ya que éstos tienden a aumentar conforme se incrementa la concentración de Abil EM 90® hasta un 3% m/V, pero a concentraciones mayores los porcentajes de recuperación disminuyen. Este comportamiento puede deberse a que muy probablemente el surfactante esté actuando como acarreador o extractante del fármaco, ocasionando que se una fuertemente a la molécula del naproxeno evitando así, una completa liberación del mismo hacia fase acuosa interna.

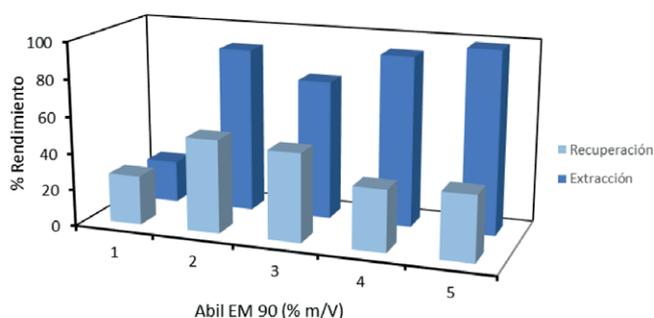


Figura 2. Transferencia de masa en función de la concentración de surfactante. FO: Dodecano + Abil EM 90®; FAI: NaOH 0.1 mol.L⁻¹; FAE: NPX [50 mg.L⁻¹] disuelto en buffer de fosfatos pH 5.5; t_{extracción} = 5 min, V_{FAE/FEM} = 1.

A partir de lo anterior y observando las granulometrías obtenidas, se determinó que una concentración del 5% m/V de Abil EM 90® resultaría la apropiada para la formulación de las membranas líquidas emulsionadas.

Concentración de extractante.

Establecida la concentración de surfactante, se procedió a estudiar la influencia de la concentración de extractante (TOA), utilizando como fase orgánica dodecano + Abil EM 90® al 5% m/V + TOA a diferentes concentraciones. La Figura 3 muestra las granulometrías obtenidas para cada una de las emulsiones preparadas.

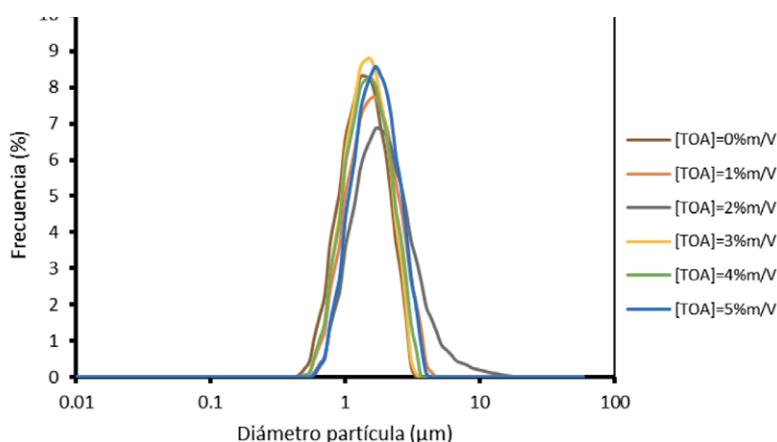


Figura 3. Granulometrías obtenidas a partir del estudio de la influencia de la concentración de extractante. FO: Dodecano + 5% m/V Abil EM 90® + TOA; FAI: NaOH 0.1 mol.L⁻¹; v = 15000 rpm, t_{emulsificación} = 10 min, T = (25 ± 1)°C, V_{FAI/FO} = 1.

Examinando las granulometrías, se aprecia que conforme se incrementa la concentración de extractante, la polidispersidad de las curvas de distribución de tamaño de partícula es menor, es decir, las emulsiones adquieren un tamaño de gota más homogéneo, lo cual, les confiere una mayor estabilidad a las membranas líquidas emulsionadas. Siendo así, la emulsión formulada con 5% m/V de TOA la más monodispersa. La influencia de la presencia de TOA y la variación de la concentración de la misma sobre la recuperación de naproxeno a través de las membranas líquidas emulsionadas se muestra en la Figura 4.

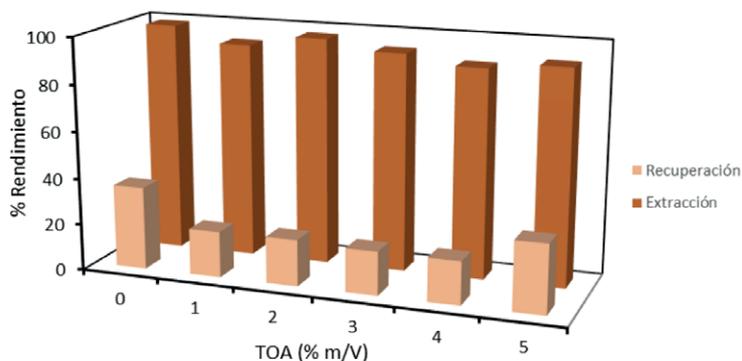


Figura 4. Transferencia de masa en función de la concentración de extractante. FO: Dodecano + 5% m/V Abil EM 90® + TOA; FAI: NaOH 0.1 mol.L⁻¹; FAE: NPX [50 mg.L⁻¹] disuelto en buffer de fosfatos pH 5.5; t_{extracción} = 5 min, V_{FAE/FEM} = 1.

Como es posible observar, la presencia del extractante en la composición de la membrana provoca una ligera disminución en los porcentajes de extracción (desde un 99% hasta un 92.5%) y en los de recuperación (desde un 35.5% hasta un 20%), manteniéndose constantes tales rendimientos a través de todo el intervalo de concentraciones estudiadas (1 – 5% m/V). La presencia de TOA en la formulación de la membrana probablemente provoque cierta dureza a la misma, ocasionando, de esta manera, un ligero descenso en la velocidad de transferencia del fármaco hacia fase orgánica y fase acuosa interna, tal y como se demuestra con los resultados anteriormente discutidos, y lo cual, a su vez, explica el aumento en la monodispersidad de las granulometrías presentadas en la Figura 3.

CONCLUSIONES.

La membrana líquida emulsionada compuesta por 5% m/V de Abil EM 90® + dodecano como fase orgánica e NaOH 0.1 mol.L⁻¹ como fase acuosa interna, resultó ser la de mayor eficacia para llevar a cabo el proceso de recuperación del fármaco (99% de extracción y 36% de recuperación), a partir de soluciones acuosas a pH 5.5, y con perfiles de tamaño de partícula uniformes.

Por otro lado, la presencia de extractante dentro de la composición de la membrana, resultó favorable para aumentar la monodispersidad de las curvas de distribución de tamaño de partícula y, por lo tanto, la estabilidad de la membrana. Sin embargo, el proceso de extracción y recuperación del principio activo no resultó ser favorecido. Por lo cual, se propone como perspectivas, cambiar de extractante o añadir un aditivo, con la finalidad de aumentar las velocidades de transferencia de masa sin afectar la estabilidad de la membrana.

BIBLIOGRAFIA.

- Nikolaou, A., Meric, S. & Fatta, D. (2007). “Ocurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments” en Anal Bioanal Chem, Núm. 387, [pp. 1225-1234].
- Santos, J.L, Aparicio, I., & Alonso, E. (2007). “Ocurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain)” en Environment International, Núm. 33, [pp. 569-601].
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E. & Ward, R.S. (2012). “Emergering organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence” en Environmental Pollution, Núm. 163, [pp. 287-303].
- Razo, T.A., Stambouli, M., González, M.P., Pareau, D. & Ávila, M. (2014). “Emulsion liquid membranes for recovery of ibuprofen from aqueous solutions” en J Chem Technol Biotechnol, Núm. 89, [pp. 890-898].

DIFERENCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN RECIÉN NACIDOS CON Y SIN LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA

Pérez-Ruiz Melissa , Delabra-Salinas María Magdalena y Rodríguez Valdez Atenas

RESUMEN

La microbiota intestinal comprende al conjunto de microorganismos comensales que cohabitan en simbiosis con el individuo.

Recientemente se ha descubierto que la microbiota intestinal de un bebé alimentado exclusivamente con leche materna se asocia con la reducción de riesgo de infección en la infancia, así como un reducido riesgo de ciertas enfermedades crónicas en la edad adulta.

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica para la búsqueda y elección de instrumentos para cuantificar los componentes de la microbiota intestinal en el recién nacido, además de plantear el desarrollo de un protocolo de investigación en enfermería descriptivo a partir de la medición de la microbiota intestinal del recién nacido al momento del nacimiento, 30 días y 1 año de nacido.

ABSTRACT

The intestinal microbiota comprises the set of commensal microorganisms that cohabit in symbiosis with the individual.

The intestinal microbiota of an exclusively breastfed baby is associated with reduced risk of infections in infancy as well as a reduced risk of certain chronic illnesses in adulthood.

This project presents a review of the literature for the search and selection of instruments to quantify the components of the intestinal microbiota in the newborn, in addition to propose the development of a descriptive protocol of nursing research about the measurement of the intestinal microbiota of the newborn at birth, 30 days and 1 year of life.

Palabras Clave: microbiota intestinal, lactancia materna, recién nacido, enfermería.

INTRODUCCIÓN

La leche humana es una mezcla compleja de grasa, proteínas, enzimas, citocinas, anticuerpos y nutrientes que proporcionan protección energética e inmunológica para los lactantes y contribuye al desarrollo de los neonatos creando mecanismos de defensa. La leche materna proporciona varios compuestos bioactivos que influyen en el crecimiento, la modulación y la maduración del sistema inmunitario, la protección contra patógenos y toxinas y, por último, el establecimiento de la microbiota intestinal (Bollard y Marrow 2013).

La leche materna es el alimento más importante para los recién nacidos ya que satisface durante los primeros seis meses de vida todas las necesidades nutricionales del infante. Además, la Lactancia Materna otorga seguridad emocional por la relación establecida entre madre e hijo. La lactancia materna exclusiva es un periodo (los primeros seis meses) ideal para el niño, pues le aporta todos los nutrientes, anticuerpos, hormonas, factores inmunitarios y antioxidantes que necesita para sobrevivir. Protege a los niños frente a la diarrea y las infecciones respiratorias y estimula su sistema inmunitario (Jiménez 2011) Además, la leche materna aporta bacterias asociadas con una disminución del riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas (Azad et al.2013). El cuerpo humano alberga trillones de microbios, colectivamente conocido como la "microbiota humana". La densidad de bacterias comensales más alta la podemos encontrar en el tracto digestivo, donde los microbios residentes superan en número a las células humanas por lo menos 10 a 1. Las bacterias intestinales juegan un papel importante en la salud humana pues promueven la homeostasis intestinal, estimulan el desarrollo del sistema inmunitario, brindando protección contra microorganismos patógenos, y contribuyendo al procesamiento de nutrientes y a las reservas de energía. (Azad et al.2013).

La madre a el recién nacido se produce por contacto directo con la microbiota materna durante el parto, la leche materna sugirió ser un factor importante en la iniciación, desarrollo y / o composición del intestino neonatal durante la lactancia. Algunos componentes de la leche materna tienen la capacidad de modular la microbiota del tracto intestinal infantil, incluyendo los oligosacáridos complejos, inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima y citoquinas (Zivkovic et al., 2011, Newburg, 2005).

La leche materna es una fuente temprana de bacterias y de nutrientes introducidos al intestino del bebé dentro de las primeras horas después del nacimiento. Las bacterias de la leche y de la piel de las madres son las más predominantes en el intestino de sus bebés en el primer mes de vida, que representan casi el 40% de la microbiota intestinal en bebés amamantados desde el nacimiento. Además, la leche materna aporta bacterias asociadas con una disminución del riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas Pannaraj, et al. (2017).

Los estudios han demostrado que la lactancia materna confiere protección contra infecciones respiratorias y gastrointestinales, así como de enfermedades alérgicas, además de reducir el riesgo de enfermedades crónicas como la diabetes, obesidad y enfermedad inflamatoria intestinal. (Pannaraj, et al. 2017).

La leche humana es uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato, ya que este fluido garantiza un aporte continuo de bacterias durante todo el periodo de lactancia. Posiblemente se trate de la principal fuente de bacterias para el recién nacido, ya que se estima que un lactante que ingiera aproximadamente 800mL de leche al día recibe 105 y 107 bacterias. La leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, de forma análoga a lo que sucede en la microbiota intestinal

de niños y adultos. Las especies bacterianas aisladas o detectadas mediante técnicas moleculares en la leche materna de mujeres sanas, son *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* y *faecium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Serratia proteamaculans*. (Rodríguez et al., 2008)

El desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota en la microbiota intestinal ha sido ligada a un incremento en el número de enfermedades, incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis necrotizante, diabetes, obesidad, cáncer, alergias y asma (Azad et al.2013).

El estado crítico de colonización intestinal ocurre dentro de las primeras semanas después del nacimiento y está influenciado por una variedad de factores incluyendo el entorno, la dieta, la edad gestacional, la hospitalización, el uso de antibióticos, el tipo de parto y el tipo de alimentación. (Sang A Lee et. al.2015) Las bacterias de la leche materna influyen en el establecimiento y desarrollo de la microbiota de los bebés con un impacto continuo después de la introducción de alimentos sólidos. (Pannaraj, et al. 2017).

Aun cuando la microbiota intestinal cambia con el paso de los años, el medio ambiente y la microbiota materna durante el parto y la alimentación al seno parecen permanecer como factores muy importantes en el desarrollo de la microbiota en el futuro. Una vez establecida la microbiota en un individuo, es estable en el tiempo. (Costello, Lauber & Hamady, 2009)

La información de esta investigación puede ser útil para las futuras madres que quieran tener hijos, ayudándolas a tomar la mejor decisión en cuanto a la alimentación correcta de su hijo(a), para las instituciones de salud, para crear programas en donde apoyen y fomenten la lactancia materna y para las empresas o lugares de trabajo, para crear espacios cómodos y dar el tiempo establecido por ley para las madres que amamantan.

La madre es quien tiene que decidir cómo quiere alimentar a su bebé, pero el/la profesional de enfermería debe asumir la responsabilidad de que esa decisión se tome con una información adecuada sobre la lactancia materna y sus ventajas, y prestar el apoyo necesario para que la lactancia sea una experiencia exitosa, así como lo mencionan los libros NANDA, NIC y NOC que son instrumento base en la profesión, dando como resultado una lactancia materna eficaz.

La revisión de la literatura fue con la intención de definir el modo en que se van a tomar las muestras, los tiempos de la toma y los materiales a utilizar, necesarios para la elaboración y justificación del proyecto.

Para el presente artículo se realizó una revisión bibliográfica en el tema de microbiota intestinal en recién nacidos lo cual servirá de base para el desarrollo futuro de un protocolo de investigación en donde se pretende describir la microbiota intestinal en recién nacidos al nacer, 48 horas y 30 días del programa del Centro de Maternidad Integral de un Hospital privado de la ciudad de Saltillo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Comparación de la Microbiota Intestinal

Pannaraj (2017), Sang (2015) y Azad (2015) coinciden en que la microbiota de las muestras fecales de los bebés contienen proteobacterias fue más alta en los bebés lactados con fórmula que en los lactados con leche materna lo que sugiere que las comunidades de proteobacterias del intestino del lactante estaban más estrechamente relacionadas con las de la fórmula.

En los estudios realizados por Stearns, (2017) se encontró que las *Bifidobacterium* fueron más abundantes ya que los infantes se encontraban bajo lactancia materna, esto concuerda con el estudio realizado por Sang A Lee et. al. (2015) donde se encontró que la familia más predominante en los lactados con leche materna fue *bifidobacteriaceae* y abarca el 70.12% de las muestras comparado con el 36.61% de las muestras de los bebés lactados con fórmula lo que indica que las *Bifidobacterium* del intestino del lactante tienen una mayor relación con las de la lactancia materna.

La lactancia materna pareció suprimir los aumentos en múltiples familias dentro de phylum Firmicutes, que son productores de butirato (obesidad), Pannaraj (2017). En el estudio realizado por Sang A Lee et. al. (2015) en los lactados con fórmula la proporción de Firmicutes fue de 45.38% y de Proteobacteria 13.85%, así como de la diversidad de cada nivel taxonómico fue más elevada en comparación con los lactantes amamantados, también Stearns, et al. (2017) concluyó que las madres que no se encontraban amamantando, mostraron altas concentraciones de Firmicutes de la orden Clostridiales, lo cual nos indica que la lactancia materna logra eliminar diferentes factores que en un futuro en cierto grado serán precursores del sobre peso.

En el estudio realizado por Martin et al. (2016) La bacteria más prevalente en la primera muestra fecal (meconio) fue *Staphylococcus*, la cual se detectó en el 67.71% de las muestras, seguido de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en cambio los resultados arrojados por Koenig et al. (2011) indicaron que en el meconio se encontró una muy baja diversidad filogenética, en el primero el tipo de parto fue cesárea y el segundo se realizó vía vaginal lo cual pone en duda la esterilidad del bebé al momento del nacimiento.

Metodología utilizada por autores de los artículos revisados

En los artículos revisados se encontraron autores que utilizaron diseños descriptivos, de cohorte prospectivo, longitudinales y observacionales no aleatorios donde sólo los estudios realizados en infantes pretérmino (Cong et al., 2016, 2017) sufrieron intervenciones por parte de los investigadores a cargo.

En la mayoría de los estudios revisados se tomaron como sujetos a recién nacidos que se desarrollaron en un embarazo relativamente sano, tomando con consideración ambos tipos de parto además haber nacido sin complicaciones, también en las investigaciones de Cong et al. en los años 2016 y 2017, se estudia la microbiota intestinal de infantes pretérmino y destaca la importancia de la lactancia materna exclusiva como un factor clave en la disminución del riesgo de sepsis neonatal o enterocolitis necrotizante.

En los diferentes artículos de investigación nos encontramos con grandes coincidencias en la recolección y toma de muestras. Mastromarino et al. (2014) colectaron muestras de meconio y la evacuación de un mes

después.

En sus dos estudios realizados en 2016 y 2017 en infantes pretérmino, Cong et al. recolectará muestras diariamente, desde el nacimiento y hasta los 30 días de vida. El investigador, Martin et al. (2016) utilizó tiempos más cortos de toma entre cada muestra (al considerar las evacuaciones de 2 días, 1 semana, 3 y 6 meses de vida, y 1 semana después del destete) esto coincide con Mastromarino et al. (2014) al recabar muestras del meconio y de la evacuación al mes de vida.

La gran mayoría de los autores revisados coinciden en la importancia que tiene la toma y procesamiento del meconio, ya que es una muestra que nos será de gran ayuda para contrastar los resultados posteriores una vez que sean alimentados con lactancia materna exclusiva, sucedáneos de la leche o de una manera mixta ya que tiene un punto de partida.

Cong et al. y Martin et al., coinciden en la utilización de espátulas estériles desechables para el manejo de las muestras fecales a diferencia de Stearns et al., que optaron por una espátula de acero inoxidable. Los contenedores más utilizados para el almacenamiento de las muestras fueron tubos y bolsas estériles. (Cong, et al. 2016 y 2017). En algunos estudios eran las enfermeras especialistas las encargadas de la toma y manejo de las muestras. Todas las tomas se realizaron durante el cambio del pañal y, en los estudios donde se requería la toma de muestras en periodos cortos de tiempo, las madres eran instruidas para el manejo de la misma. Stearns, et al. (2017).

En un estudio realizado por Martin et al. (2016) se hizo la toma de muestras fecales colocándolas en tubos estériles que contenían RNAlater, una solución estabilizadora que permite almacenar tejidos sin necesidad de congelar las muestras y como consecuencia no pone en peligro la calidad o cantidad de ARN celular., en cambio los autores Sang et al. (2015), Mastromarino, P. et al. (2014), Stearns, et al. (2017), Cong, et al. (2016 y 2017), Azad, et al. (2015) coinciden en que después de la toma de la muestra es necesario congelarse a una temperatura de -80°C para mantener la composición bacteriana.

MÉTODOS Y MATERIALES

Durante el desarrollo de la estancia del Verano de la Ciencia 2017 Se realizó una revisión bibliográfica de 34 artículos de los cuales 08 fueron ensayos y 26 de investigación de los cuales se descartaron 18 tomando en cuenta los requerimientos y el enfoque que tiene el proyecto.

De los 10 estudios de investigación utilizados 1 de ellos son multifactoriales, ya que abarcan variables sociales, culturales, ambientales, uso de antibióticos, etc., 2 de los estudios relacionan variables como la etnia o la raza, otros 2 son sujetos pretérmino de los cuales uno hace una comparación respecto al género y de manera individual se rescata 1 estudio en el cual se destaca el efecto de los antibióticos antes del parto y en el periodo perinatal en el desarrollo de la microbiota del recién nacido

Entre otras actividades, se inició una base de datos de las embarazadas atendidas en el Centro de Maternidad Integral del Hospital Universitario en Saltillo Coahuila, tal información recabada servirá para la consideración de los posibles sujetos para el desarrollo de la investigación a seguir.

La revisión de la literatura fue con la intención de definir el modo en que se va a tomar la muestra, al llegar el momento o fase de colección de datos y los materiales a utilizar para llevar a cabo y sustentar la realización del proyecto.

Se descartaron 18 artículos debido a que la relación que estos tenían con el proyecto era muy poco significativa, de otra manera se tomaron en cuenta 10 artículos y resúmenes de investigación encontrando gran relevancia para los fines del proyecto.

CONCLUSIONES

Una vez revisados los artículos de investigación se llegó a la conclusión de que para la elaboración del proyecto se tomará en cuenta el análisis de las muestras fecales al momento del nacimiento (meconio) al mes y al año de edad de ser posible, ya que en los estudios antes mencionados se notó un cambio significativo en estas fechas principalmente.

La primera muestra será tomada por un profesional de enfermería, del pañal del recién nacido y se colocará en tubos estériles que contendrán RNAlater a una temperatura de -80°C . Las muestras siguientes serán tomadas por la madre y de igual manera las colocarán en la bolsa y se mantendrán en congelación hasta el día de la cita después de la cual se llevará la muestra a congelación a una temperatura de -80°C .

AGRADECIMIENTOS

Para la elaboración de este artículo se contó con el apoyo y participación de diferentes autoridades en el área de enfermería y salud a los cuales les expreso mi más sincero agradecimiento.

Dr. Alfonso Carrillo González, director del Hospital Universitario de Saltillo Coah., por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto en las instalaciones del Hospital.

Mce. María Magdalena Delabra Salinas por tomarse el tiempo dentro de sus actividades como docente para mi asesoramiento en el área de la investigación.

Dr. José Ignacio García de La Torre Jefe de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de la UA de C.

Mce. Raúl Adrián Casillo Vargas, director de la Facultad de Enfermería de la UA de C. por brindarnos su apoyo para llevar a cabo la continuidad del proyecto.

Al comité organizador del 19° Verano de la Ciencia por brindarme la oportunidad de impulsar mi proyecto

BIBLIOGRAFÍA

- Guaraldi, F. & Salvatori, G. (2012) "Effects of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns" en *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 2, Art. 94, Octubre, [pp. 1-4].
- Le Huërrou-Luron, I., Blat, S. & Boudry, G. (2010) "Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects" en *Nutrition Research Reviews*, Núm. 23, Mayo, [pp. 23-26].
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2015) "Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health" en *Nutrition Reviews*, Núm. 7, Vol. 73, [pp. 426-437].
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, J. & Sánchez Castañeda, N. (2014) "La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido" en *Revista Cubana de Pediatría*, Núm. 4, Vol. 86, [pp. 502-513].
- Goldsmith, F., O'Sullivan, A., Smilowitz, J. T. & Freeman, S. L. (2015) "Lactation and Intestinal Microbiota: How early diet shapes the infant gut" en *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, doi: 10.1007/s10911-015-9335-2 PMID: 26227402.
- Pannaraj, PS. et al. (2017). "Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome." en *JAMA Pediatrics*, Núm. 7, Vol. 171, Mayo, [pp. 647-654]. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378
- SANG A LEE et. al. (2015). "Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing" en *Nutrition Research and Practice*, Núm. 3, Vol. 9, [pp. 242-248].
- AZAD, M. B. et al. (2013). "Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months" en *Canadian Medical Association Journal*, Núm. 185, Vol. 5, Marzo, [pp. 385-394].
- Koenig, J. E., et al. (2011). "Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome" en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Núm. 1, Vol. 108, Marzo, [pp. 4578-4585] www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000081107
- Azad, M.B. et al. (2015). "Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study" en *BJOG*, Septiembre, [pp. 1-11] doi: 10.1111/1471-0528.13601.
- Mastromarino, P. et al. (2014). "Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces" en *BioMetals*, Núm. 3, Vol. 27, Junio, doi: 10.1007/s10534-014-9762-3.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A. & Brown, P.O. (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota" en *PLoS Biology*, Núm. 5, Vol. 7, Junio, [pp. 1556-1573]. doi:10.1371/journal.pbio.0050177
- Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., et al. (2016) "Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota" en *PLoS ONE*, Núm. 11, Vol. 6, Junio, [pp. 1-30] doi:10.1371/journal.pone.0158498
- Stearns, J., et al. (2017). "Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome" en *Genome Medicine*, Núm. 9, Vol. 32, Marzo [pp. 1-12].
- Cong, X. et al. (2017). "Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants" en *Nursing Research*, Núm. 2, Vol. 66, Marzo-Abril, [pp. 29-34].
- Cong, X. et al. (2016). "Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender" en *PLoS ONE*, Núm. 11, Vol. 4, Abril, [pp. 1-19] doi:10.1371/journal.pone.0152751
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D. & Gordon, J.I. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology" en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Núm. 31, Vol. 102, Agosto, [pp. 11070-11075] www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504978102
- Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, et al. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloSone*. 2011;6(6):e20647.
- Thum C, Cookson AL, Otter DE, McNabb WC, Hodgkinson AJ, Dyer J, et al. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract *Nutr*. 2012 Nov;142(11):1921-8.
- Donnet-Hughes A, Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc*. 2010;69:407-15.
- Rodolfo Jiménez M, Erika Aranda, Patricia Aliaga, Angélica Alípaz, Nancy López, Sdenka Rocha, Silvia Salazar. Beneficios nutricionales de la lactancia materna en menores de 6 meses. *Rev Med La Paz*, 2011; 17(2): 5-12
- Bollard O, Marrow AL (2013) Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 60:49-74
- Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA (2011) Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *PNAS* 108:4653-4658

EVALUACION DE LAS PROPIEDADES INTERFACIALES DE LOS HIDROLIZADOS DE B-Lg AISLADA A PARTIR DE UN CONCENTRADO DE SUERO DE LECHE

Ramírez Cuenca Daniela de Jesús 1 y Ávila Rodríguez Mario 2

RESUMEN

El suero de leche fue considerado como un desecho durante muchos años, debido a esto se realizaron diversas investigaciones, ya que en él están presentes las proteínas globulares, entre la más importante esta la β -Lg, usada como tensoactivo de origen natural. Esta propiedad permite obtener productos alimenticios benéficos tales como: aderezos, salsas; así como, suplementos para niños, adultos mayores y deportistas. Es una nueva alternativa principalmente en la industria de los alimentos, ya que además de ser un alimento con alto valor nutricional, tiene propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. Se realizaron pruebas experimentales con un suero de leche comercial, obteniendo hidrolizados e identificando sus propiedades tensoactivas de acuerdo a la determinación de ciertos parámetros que indicaron la estabilidad del producto.

ABSTRACT

Whey was considered a waste for many years, due to this fact several investigations were carried out, since globular proteins are present in it, the most important being β -Lg, being used as a surfactant of natural origin. Allowing to obtain beneficial food products such as: dressings, sauces; As well as supplements for children, seniors and athletes. It is a new alternative mainly in the food industry, since in addition to being a food with high nutritional value, it has anticancer and antimicrobial properties. Experimental tests were performed with a commercial whey, identifying its surfactant properties according to the determination of certain parameters that indicated the stability of the product

Palabras Clave: Tensoactivo, propiedades tensoactivas, hidrolizados.

INTRODUCCIÓN

Los ingredientes presentes en las proteínas de suero de leche contienen una mezcla de proteínas globulares. En la actualidad, varios tipos de proteínas son utilizadas en la industria alimenticia para formar y estabilizar productos alimenticios basados en emulsión tales como: aderezos, bebidas, postres y salsas (Lam & Nickerson 2013, Wilde 2009). Las proteínas de suero de leche, son superficialmente activas, es decir, a concentraciones muy bajas se absorben en la superficie o en la interfase de los líquidos. Como resultado, producen una reducción en la tensión superficial y por ende la tensión interfacial. (Leman, Kinsella and Kilara, 1989). Dichas proteínas se adsorben fácilmente a las interfaces grasa-agua, formando emulsiones realmente estables. La adsorción de una proteína requiere la interacción hidrofóbica entre la proteína y la superficie que contiene a la grasa, durante un aumento en la concentración de proteína se facilita la adsorción de más proteína, aumentando la carga de proteína que es adsorbida y como resultado, una mayor estabilidad de la emulsión (Leman, Kinsella and Kilara, 1989). Debido a lo anterior, los objetivos planteados fueron el aislamiento de B-Lg a partir de un concentrado comercial de proteínas de suero de leche e Hidrólisis enzimática de B-Lg y evaluación de propiedades funcionales e interfaciales de los hidrolizados obtenidos.

METODOLOGÍA

El procedimiento constó de 4 etapas, a continuación se presentan detalladamente cada una de ellas.

- I. Obtención de B-Lg.
- II. Hidrólisis enzimática de B-Lg.
- III. Determinación de parámetros (Conductividad eléctrica, Viscosidad y Densidad).
- IV. Propiedades espumantes y emulsificantes del Hidrolizado.

I. Obtención de B-Lg

La muestra se obtuvo de un concentrado de proteínas de suero de leche comercial (7.6 gr, 0.042 gr de Azida de Sodio en 200 ml de agua desionizada, sometiéndola a un proceso de Hidratación por 40 minutos a 40°C, se realizó un ajuste de pH a 4 con H₃PO₄, continuando con el proceso de precipitación en una reacción expuesta a 60 minutos a 55°C.

Para separar el precipitado formado se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 15 minutos pasando al proceso de neutralización del sobrenadante ajustando el pH a 7 con NaOH 1.5M. Para finalizar esta etapa, se purificó la muestra por medio de Microfiltración, usando una membrana de 0.45 μ m. Se verificó la concentración de la muestra (3%) por medio de espectrofotometría UV. Previo al proceso de hidrólisis, la muestra se sometió a un proceso de desnaturalización térmica (reacción a 90°C por 15 minutos) para hacer que la estructura terciaria por la que B-L se compone mayormente se rompiera más rápido sin afectar la secundaria.

II. Hidrólisis enzimática:

Utilizando un pequeño reactor, se ajustó el pH a 2 con HCl 2M, a 38 °C, al tener estas condiciones se agregó la enzima (0.152 gr de pepsina), para activarla. La activación dura un tiempo de 30 minutos, al término de la reacción se inactivó a la enzima neutralizando el pH a 7 con NaOH 1.5. Finalmente se purificó la muestra mediante 2 filtraciones, la primera por medio de UF usando una membrana de 10 KDa a una presión de 30 PSI, para completar el proceso se cambió la membrana a 1 KDa a 40 PSI. (Retenido Hidrolizado)
Se obtuvo una muestra control, realizando el mismo procedimiento a excepción de la Hidrolisis enzimática, siguiendo los mismos pasos pero sin la adición de la enzima (pepsina).

III. Caracterización fisicoquímica

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA:

Se calibró el conductímetro a 25°C con una solución estándar de 1413 µS/cm.

DENSIDAD:

Con parámetros de 25 °C y una desviación de 0.0015, siendo esta aceptable para realizar la medición.

VISCOSIDAD:

A 25 °C se tomó el tiempo que la muestra tardó en atravesar el viscosímetro, para después calcular la Viscosidad cinemática y dinámica correspondientes.

I.V Propiedades espumantes y emulsificantes

En esta etapa se realizaron 2 pruebas diferentes: Estabilidad del espumado e índice de espumado. Las pruebas se realizaron por triplicado tanto para la muestra como para el control.

INDICE DE ESPUMADO: Se calcula de la siguiente manera, fórmula 1).

INDICE DE ESPUMADO: Se calcula de la siguiente manera, fórmula 1).

$$(1) \quad \frac{\text{Volumen final} - \text{Volumen inicial}}{\text{Volumen inicial}} \times 100$$

ESTABILIDAD DEL ESPUMADO: Utilizando un homogeneizador de alto rendimiento, se colocó la muestra en un matraz a 7000 rpm por 2 minutos, enseguida se añadió el espumado en una probeta de 25 ml, midiendo el tiempo que tardaba en subir la solución y el tiempo en el que bajaba la espuma. Los cálculos se realizaron con la fórmula 2).

$$(2) \quad \frac{V_{Max} - V_{min}}{V_{Max}} \times 100$$

Propiedades emulsificantes

Mediante la relación 70/30 (W/O) a la muestra se le añadieron 12gr de aceite de canola. Se colocó en un matraz, en homogeneizador de alto rendimiento a 24,000 rpm durante 3 minutos, finalmente se llevó la muestra al equipo de Master Sizer para medir el tamaño de gota de la emulsión.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los parámetros que se muestran en las Tablas 1, 2 y 3 fueron determinados para la caracterización de la muestra hidrolizada y muestra control.

Tabla. 1. **CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA MUESTRA HIDROLIZADA Y MUESTRA CONTROL**

| MUESTRA | CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (SIEMENS) |
|-----------|-----------------------------------|
| Control | 6.358 |
| Muestra 1 | 1.712 |

Tabla. 2. **DENSIDAD DE MUESTRA HIDROLIZADA Y MUESTRA CONTROL**

| | |
|-----------------|---------------------------|
| Muestra control | 1.0092 gr/cm ³ |
| Muestra 1 | 1.0037 gr/cm ³ |

Tabla. 3. **VISCOSIDAD DINAMICA Y DESVIACION ESTANDAR**

| MUESTRA | VISCOSIDAD DINÁMICA (CP) | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
|-----------------|--------------------------|---------------------|
| Agua | 0.9975 | 0.43038742 |
| Muestra 1 | 1.0439 | 0.15394804 |
| Muestra control | 1.0347 | 0.2145538 |

Propiedades espumantes. Al hacer una comparación entre la muestra hidrolizada y el control, el índice de espumado de la muestra hidrolizada (muestra 1), es mucho mayor, es decir que el proceso que se realizó logró mejorar las propiedades espumantes de las proteínas, como se muestra en la Tabla. 4.

Tabla. 4. PROPIEDADES ESPUMANTES DE MUESTRA CONTROL Y MUESTRA 1

| PROPIEDADES ESPUMANTES | MUESTRA CONTROL | MUESTRA 1 |
|------------------------|-----------------|--------------|
| Índice de espumado | 79.179% | 147.91% |
| Estabilidad | 5.6 minutos | 6.66 minutos |

Propiedades emulsificantes. Al hacer una comparación entre los tamaños de gota de la Figura 1 y 2, no se observa un mejoramiento significativo de las gotas obtenidas, es decir, al finalizar el proceso de hidrólisis no se tienen gotas más pequeñas. Por lo tanto el proceso de hidrólisis no cambió ni mejoró dichas propiedades. Los resultados de los tamaños medios de gota se presentan en la Tabla 5.



Figura 1. Propiedades emulsificantes muestra control.

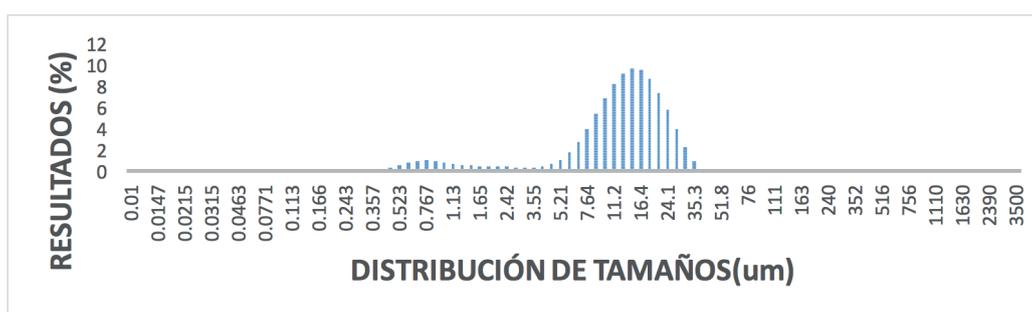


Figura 2. Propiedades emulsificantes muestra 1.

TABLA. 5. TAMAÑOS MEDIOS DE GOTAS DE MUESTRA CONTROL Y MUESTRA 1

| TAMAÑOS MEDIOS DE GOTAS | D(3,2) | D(4,3) |
|-------------------------|--------|--------|
| Muestra control | 5.86 | 12.96 |
| Muestra 1 | 6.82 | 14.96 |

CONCLUSIONES

Podemos considerar a la β -Lg como una proteína capaz de reducir la tensión superficial. La percepción del consumidor de la calidad está influenciada por la apariencia, es por ello que las espumas resultan importantes puesto que presentan un alto índice de estabilidad, necesaria en los alimentos.

Por ende, los parámetros determinados son de gran ayuda para verificar que tan estable puede llegar a ser una proteína globular, por ejemplo en cuanto a viscosidad, es una medida de resistencia, por lo tanto se puede determinar la interacción que existe entre una proteína y otra. Todos estos parámetros se determinaron en función del tiempo, debido a que es un punto importante a tomar en cuenta puesto que reflejan la estructura y la interacción entre las proteínas.

BIBLIOGRAFIA

- Rodríguez Patino, J., Carrera Sánchez, C. and Rodríguez Niño, M. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), pp.95-113.
- Leman, J., Kinsella, J. and Kilara, A. (1989). Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(2), pp.115-138.
- Nalewajski, R. (1996). *Density functional theory*. Berlin: Springer.



4.Leman, J., Kinsella, J. and Kilara, A. (1989). Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(2), pp.115-138.

EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL N-GLUCOSILACIÓN EN PROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR LC-MS EN PACIENTES CON RIESGO CARDIOVASCULAR.

María Teresa Rivas Medina , Carla Montserrat Ramírez Ponce y Nicté Guadalupe Figueroa Vega .

RESUMEN

Las modificaciones postraduccionales están tomando auge por su papel en el desarrollo de enfermedades metabólicas. La glucosilación regula el transporte de glucosa, y las alteraciones en esta vía inducen DM2 y enfermedades cardiovasculares; por lo que el estudio de la glucosilación sería un posible mejor biomarcador que la hemoglobina glucosilada. El objetivo es evaluar estas moléculas como procedimientos innovadores y complementarios; mediante un estudio clínico, comparativo, transversal de adultos diabéticos de 30-50 años, sin enfermedades crónico-degenerativas, neoplásicas o infecciosas, con y sin control metabólico; evaluado por valoración médica y LC-MS. Este abordaje permitirá esclarecer el papel de cada uno de los glicanos para tener un análisis con un enfoque personalizado en el control metabólico, progresión y tratamiento de la enfermedad.

ABSTRACT

Postraductional modifications are standing out for their role in the development of metabolic diseases. Glycosylation regulates transport of glucose, and alterations in this pathway induce T2DM and cardiovascular diseases. Therefore, the study of glycosylation could be a possible better biomarker than glycosylated hemoglobin. This study pretends to evaluate these molecules as innovative and complementary by a clinical, compared, cross-sectional study of diabetic adults from 30-50 years without any chronic-degenerative, neoplastic or infectious diseases, with and without metabolic control; evaluated by medical consultation and LC-MS. This approach will clarify the role of each of the glycans, as it will allow to have a more personalized approach in metabolic control, progression and treatment of the disease.

Palabras clave: diabetes mellitus, glucosilación, biomarcador, LC-MS, riesgo cardiovascular.

INTRODUCCIÓN

Las complicaciones macrovasculares tienen alta mortalidad y morbilidad en la población y urgen perspectivas novedosas para la identificación precoz de los factores que intervienen en el deterioro vascular. Los instrumentos actuales como la hemoglobina glucosilada son insatisfactorios.

Una de las alteraciones tempranas inducidas por el descontrol de la glucemia es la glucosilación; una modificación postraducciona. Las modificaciones postraduccionales están tomando auge por su papel en el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

La glucosilación es un proceso bioquímico enzimático en el cual se adiciona una molécula de azúcar a una proteína. Existen 2 clases: la N-glucosilación y la O-glucosilación. La N-glucosilación se caracteriza por la adición de un oligosacárido complejo al grupo amino libre de un residuo de asparagina en una proteína en el retículo endoplásmico rugoso con la implicación de un gran número de enzimas.

La N-glucosilación está involucrada en la modificación de proteínas circulantes a través de la adición de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y fucosa. Estos glicanos pueden dar estabilidad a las proteínas, participar en procesos de adhesión celular, transporte, depuración celular y transducción de señales. Sin embargo, puede ser causa de enfermedades. Durante la inflamación, se favorece el incremento de sialilación, fucosilación y decremento de la galactosilación. Por lo tanto, las proteínas susceptibles de sufrir esta modificación postraducciona pueden servir como biomarcadores de inflamación aguda y crónica y tener relevancia clínica en la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones macrovasculares.

Las principales proteínas que sufren esta modificación son: α -1-glicoproteína ácida, haptoglobina, α -1-antitripsina, α -1-antiquimiotripsina, transferrina, además de una correlación positiva con la proteína C reactiva, fibrinógeno, IL-6, proteína amiloide A sérica y fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína; todos ellos asociados con inflamación de bajo grado y eventos cardiovasculares.

La O- y N-glucosilación regulan el transporte de glucosa; y las alteraciones en esta vía inducen obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, nefropatía diabética, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Por ello, el estudio de la glucosilación sería un posible mejor biomarcador de hiperglucemia, resistencia a la insulina y disfunción metabólica, que la hemoglobina glucosilada.

Desde un abordaje con técnicas como cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS), se permitirá realizar mediciones que distingan las diferencias en la estructura de los glicanos; lo que ayuda a tener un análisis más complejo y detectar y/o dilucidar aquello que realmente contribuye a la enfermedad, además de proporcionar un enfoque más personalizado en la progresión y tratamiento de la enfermedad.

Por ello, se plantea la evaluación de estas moléculas como procedimientos innovadores y complementarios a los ya existentes, que aportarán un mayor valor predictivo y diagnóstico de las complicaciones macrovasculares en la diabetes.

Objetivos:

Dilucidar si los niveles de N-glicosilación son un mejor predictivo de complicaciones macrovasculares de la diabetes mellitus tipo 2 que la HbA1c. Obtener resultados que sirvan de base para, en etapas posteriores, examinar otros elementos de estas vías y de componentes aferentes de estos mecanismos de daño vascular. Colectar datos antropométricos, signos vitales, antecedentes personales y familiares, niveles de glucosa en ayuno, HbA1c, perfil de lípidos y subtipos de HDL. Detectar los datos ultrasonográficos de daño vascular a través de la medición del IMT (grosor de la túnica media) y PWV (velocidad de la onda de pulso).

METODOLOGÍA

Estudio clínico, comparativo, transversal, con 120 voluntarios adultos de ambos sexos, de 30 a 50 años, sin hipertensión y otras enfermedades crónico-degenerativas, neoplásicas o infecciosas. Grupos de 20: adultos sanos de peso normal; adultos con DMT2 de evolución menor a 5 años y buen control metabólico, con HbA1c <7.0%; adultos con DMT2 de evolución menor a 5 años y descontrol metabólico, con HbA1c >7.0%; adultos con DMT2 de evolución mayor a 10 años, con datos de daño cardiovascular; adultos con DMT2 con datos de nefropatía moderada con microalbuminuria; adultos con DMT2 con macroalbuminuria y/o creatinina sérica >1.5 mg/dl. Se obtendrán antecedentes personales, familiares, patología concurrente y se medirán tensión arterial y somatometría.

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Se cuantificaron los N-glicanos en proteínas séricas utilizando el GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan kit para la desglicosilación previa al análisis mediante la LC-MS.

Medición del engrosamiento de la íntima media de la carótida (IMT). Se usó un ultrasonido Eco-Doppler con transductor lineal para identificar la carótida, y pulsado para medir la velocidad de flujo. El IMT se analizó en Modo B, obteniendo el promedio de tres mediciones.

Procedimiento:

Se utilizó un volumen de 7,5 µl de solución de glicoproteína en este procedimiento (2 mg/ml). Se añadieron 1,2 µL de GlycoWorks Rapid PNGase F mezclando hasta homogenizar. Posteriormente, se añadieron 12 µL de la Solución de Reactivo RapiFluor-MS a la mezcla de desglicosilación preparada anteriormente. Se acondicionarán los pozos de una placa GlycoWorks HILIC µElution con 200 µl de agua por pozo y se equilibraron añadiendo 200 µl de agua/acetonitrilo 15:85. Finalmente, los glicanos eluidos se diluyeron con 310 µl de diluyente de muestra GlycoWorks-DMF/ACN incluido en el kit antes de la cromatografía HILIC.

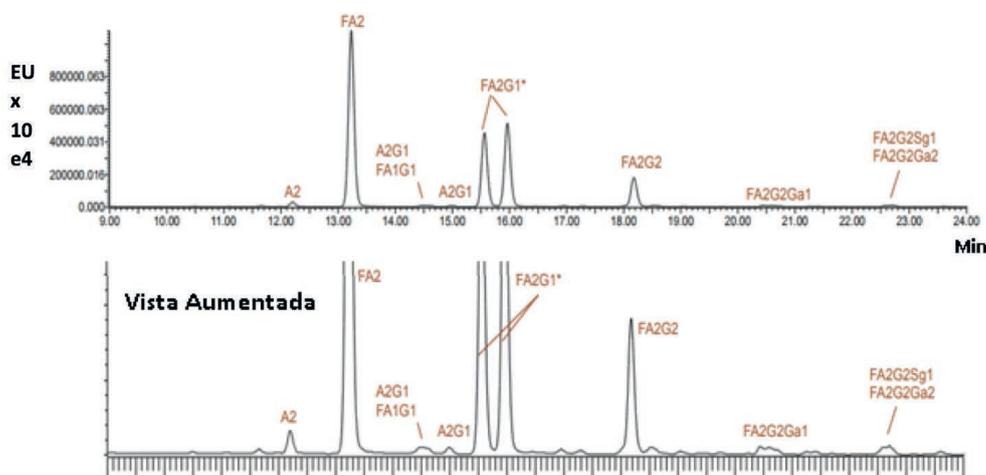


Figura 1. Datos representativos de HILIC - FLR - MS para RapiFluor - MS con Intact mAb Standard. El primer pico es F(6)A2[6]G(4)1, el segundo es F(6)A2[3]G(4)1.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Este abordaje permitirá esclarecer el papel de cada uno de los glicanos, en la obesidad, diabetes y riesgo cardiovascular. Además, la evaluación de estas moléculas proveerá información de estos como procedimientos innovadores y complementarios a los ya existentes que aportarán un mayor valor predictivo y diagnóstico de las complicaciones macrovasculares en la diabetes. El abordaje de este tema con técnicas como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) está permitiendo realizar mediciones que distinguen las diferencias en la estructura de los glicanos, lo que permitirá tener análisis más complejos, detectar y/o dilucidar aquellos que realmente contribuyen a la enfermedad, además de ofrecer un enfoque más personalizado en la progresión y tratamiento de la enfermedad. Para esto, en una cohorte de pacientes con diabetes y diverso control metabólico, se identificaron y cuantificaron los N-glicanos en proteínas plasmáticas mediante el GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan kit, que permite la identificación de 10 N-glicanos.

BIBLIOGRAFÍA

- AKINKUOLIE, A. O., PRADHAN, A. D., BURING, J. E., RIDKER, P. M., & MORA, S. (2015). "Novel Protein Glycan Side-Chain Biomarker and Risk of Incident type 2 Diabetes Mellitus". En *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Journal of The American Heart Association, Abril, [pp.1-11].
- FREEZE, H. H. (2013). "Understanding Human Glycosylation Disorders: Biochemistry Leads the Charge". En *Journal of Biological Chemistry*, Núm. 10, Vol. CCLXXXVIII, Enero, [pp. 6936-6945].
- FROST, D. C., & LI, L. (2014). "Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Glycoproteomics". En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Vol. XCV, Julio, [pp.71-123].
- GOWD, V., GURUKAR, A., & CHILKUNDA, N. D. (2016). "Glycosaminoglycan remodeling during diabetes and the role of dietary factors in their modulation". En *World Journal of Diabetes*, Núm. 4, Vol. VII, Febrero, [pp. 67-73].
- KOZA, S. M., LAUBER, M., FOUNTAIN, K. J., CHAMBERS, E. E., MCCALL, S., BHARADWAJ, R. ET AL. (2016). *Waters Application Notes. Glycans*, Massachusetts: Waters Corporation.
- NISHIKAZE, T. (2017). "Sensitive and Structure-Informative N-Glycosylation Analysis by MALDI-MS; Ionization, Fragmentation, and Derivatization". En *Mass Spectrometry*, Vol. VI, Agosto, [pp. 1-12].
- NOWOTNY, K., JUNG, T., HÖHN, A., WEBER, D., & GRUNE, T. (2015). "Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus". En *Biomolecules*, Vol. V, Marzo, [pp.194-222].
- PIARULLI, F., SARTORE, G., & LAPOLLA, A. (2013). "Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update". En *Acta Diabetológica*, Vol. L, Julio, [pp.101-110].
- STADLER, K. (2013). "Oxidative Stress In Diabetes". En Ahmad, S. I. *Diabetes. An Old Disease a New Insight*, Nueva York, EUA: Landes Bioscience. Springer Science + Business Media LLC, [pp. 272-287].
- TAKAMIYA, R., OHTSUBO, K., & TANIGUCHI, N. (2015). "Glycoredox: New Paradigm for Glycosylation and Redox Signaling Research". En Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G. W., Seeberger, P. H. & Wong, H. *Glycoscience: Biology and Medicine*, Japón: Springer Japan, [pp. 1275-1281].
- TESTA, R., VANHOOREN, V., BONFIGLI, A. R., BOEMI, M. OLIVIERI, F., CERIELLO, ET AL. (2015). "N-Glycemic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters". En *PLoS ONE*, Núm. 3, Vol. X, Mayo, [pp. 1-16].
- VAN SCHERPENZEEL, M., WILLEMS, E., & LEFEBBER, D. J. (2016). "Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation". En *Glycoconjugate Journal*, Vol. XXX, Enero, [pp. 345-358].
- YAMAMOTO, Y. (2015). "Enzymatic and non-enzymatic post-translational modifications linking diabetes and heart disease". En *Journal of Diabetes Investigation*, Núm. 1, Vol. XI, Enero, [pp.16-17].

IMPACTO DE LA DIABETES EN HUESO

Jorge Andrés Dávila-Moreno¹, Gabriel Herrera-Pérez² y Esmeralda Rodríguez-Miranda³

RESUMEN

La diabetes mellitus es un problema epidemiológico mundial y nacional importante presentándose en el 9.4 % de la población mexicana. Como enfermedad crónico-degenerativa tiene un gran impacto en la salud del paciente teniendo diversas complicaciones, Sin embargo su impacto y efecto a nivel oseoso no ha sido del todo estudiado. En este trabajo utilizamos un modelo de diabetes experimental en rata wistar para estudiar el impacto de esta enfermedad en la composición química del fémur por espectroscopia infrarroja. Nuestros resultados muestran que son muy semejantes los grupos control y con diabetes experimental a nivel de grupos funcionales (CO₃)-2, (SiO₄)-3 y (PO₄)-3, sin embargo, por las diferencias presentadas en las bandas 599 y 558 cm⁻¹, se presume que estos iones se encuentran en ambientes químicos diferentes en los enlaces C-O y P-O respectivamente.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is one of the biggest trouble in the national and global epidemiology it is in the 9.4% of the mexican population. As a chronic-degenerative disease it has a great impact on the patient's health which many different complications, nevertheless its impact and effect in the bone it has not been studied at all. In this investigation we used a diabetic experimental model in wistar rat to observe the impact in the femur's chemical composition by infrared spectroscopy. The results show that they are very equal both groups the control and the diabetic rats in the level of functional groups (CO₃)-2, (SiO₄)-3 y (PO₄)-3 but the difference show it in the band 599 y 558 cm⁻¹, show us that the ions in the bone are in different chemical environment on the bond C-O and P-O respectively.

Palabras Clave: Diabetes, Fémur, Aloxana.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome clínico con alteración en el metabolismo de los carbohidratos; producida principalmente por una falta relativa o absoluta de la hormona insulina, esta es producida por las células β del páncreas (Smushkin 2010). Su clasificación se ha dividido principalmente en 3 tipos:

a) DM tipo 1 (DM1) corresponde al 5% de los pacientes diagnosticados con DM (Asociación Americana de Diabetes 2017) se produce por una destrucción de las células β del páncreas presentándose la ausencia total parcial de insulina.

b) DM tipo 2 (DM2) se presenta en el 95% los afectados (ADA 2017). Este tipo se caracteriza por niveles de glucosa plasmática elevados crónicos (>126mg/dl en ayuno o >200 mg/dl tras 2 horas de ingesta de alimentos) (Smushkin 2010) producida por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos y en casos tardíos una disminución en la producción y sensibilidad a la insulina (Smushkin 2010).

c) DM gestacional (DMG) se presenta en alrededor del 9.2% de los embarazos (ADA 2015). Por lo regular en la semana 24 de gestación (Federación Internacional de la Diabetes 2015). Presenta una elevación en los niveles de glucosa plasmáticos (glucosa postprandial 1 hora >180 mg/dl, glucosa postprandial 2 horas >153mg/dl ambas con una ingesta de glucosa previa de 75 g. o una glucosa en ayuno de >92 -125 mg/dl) (FID 2015). Aun no se ha identificado la causa, sin embargo se cree las hormonas placentarias (gonadotropina coriónica humana, estrógenos y progesterona) promueven una menor sensibilidad orgánica a la insulina. (ADA 2015).

Epidemiología:

Según estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2014 la prevalencia de DM a nivel mundial fue del 8.5 %. Según el informe mundial sobre la diabetes publicado en el 2016, existe un total de 422 millones de personas afectadas. A nivel nacional, se estima existían hasta el año 2016 una prevalencia de pacientes diagnosticados con diabetes de 9.4 % (ENSANUT 2016). A nivel región centro donde se incluye Aguascalientes y Guanajuato existe una prevalencia mayor del 9.8 % de la población diagnosticada. (ENSANUT 2016).

Fisiopatología:

La insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas que mantiene la concentración de glucosa en sangre entre 80-105 mg/dl teniendo su principal blanco en músculo liso, tejido adiposo y en los hepatocitos, teniendo impacto particular principalmente a nivel metabólico (Olivares Reyes et al. 2008). En la Figura 1 se ilustra la secreción de la insulina por el páncreas:

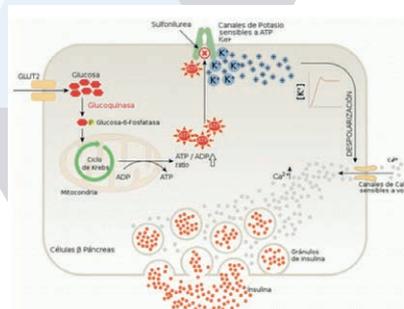


Figura 1 Metabolismo de la Insulina a nivel Pancreático
Fuente: Bazaga-Isla M. (2011). "Insulina" en Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado. Consultado en: http://cerezo.pntic.mec.es/~jgarc247/2_bachto/anho_internacional_quimica/05insulina.htm (fecha de consulta 3-07-2017)

1. Los transportadores Glut 2 permiten el paso de glucosa de la circulación al interior de la célula β del páncreas. La glucosa que ingresa es metabolizada por las vías de la glucólisis, por el Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa produciendo ATP. El cociente ATP/ADP promueve el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP provocando la despolarización del potencial de membrana de la célula.

2. La despolarización activa los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje permitiendo su entrada, provocando que las vesículas cargadas con insulina liberen su contenido al torrente sanguíneo.

La principal función de la insulina es activar y exponer el transportador de glucosa Glut 4 presente en músculo y tejido adiposo mediante la activación de segundos mensajeros. El transportador Glut 4 permite la entrada de glucosa al interior de la célula para ser utilizada en la generación de ATP (Figura 2). En la DM2 la afección sucede principalmente a nivel del receptor el cual se vuelve menos sensible a la insulina evitando así la exposición de Glut 4 a la membrana celular. Lo anterior promueve la hiperglicemia en la DM2.

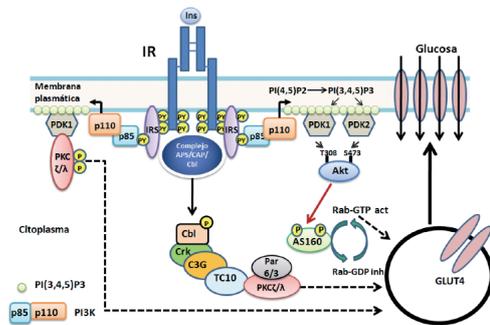


Figura 2 Acción a nivel celular de la insulina en las células diana. Fuente: Olivares-Reyes J. A. et al. (2008). "Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina" en Revista de Educación Bioquímica, Núm. 1, Vol. 27 Marzo, [pp. 13].

Daños de la DM2:

Retinopatía diabética: es un padecimiento presente en el 60% de los pacientes con DM2. Inicia como una retinopatía no proliferativa resultado de la glicación de las proteínas en la retina y la isquemia propia de la DM. Al avanzar esta isquemia se promueve la angiogénesis evolucionando a retinopatía proliferativa.

Cataratas: en los pacientes con DM2 existe 2 tipos las cataratas: subscapulares y las seniles, predominando estas últimas, ambas promovidas la glicación de las proteínas que constituyen al cristalino.

Nefropatía Diabética: esta comienza como un proceso de microalbuminuria (albumina urinaria entre los 30-300mg/24 horas) que progresa a una macroalbuminuria (mayor a 300 mg/24horas) posterior a una proteinuria (150 mg/24 horas de proteína en orina) donde el cuadro se establece llegando en algunos casos a la insuficiencia renal crónica.

Neuropatía diabética: en los pacientes con DM se presenta principalmente 2 complicaciones clásicas, la primera es neuropatía autonómica, manifestada principalmente por disfunciones digestivas y en casos avanzados disfunción sexual. La segunda es la neuropatía periférica manifestada por dolor de tipo urente o quemante y en gran medida por disestesias y anhidrosis.

Cardiovascular: dentro de esta encontramos cardiopatía producida por microangiopatías y enfermedad vascular periférica dada por la producción de placas de ateroma.

Relación del Esqueleto con la DM:

Existe evidencia que sugiere que la DM2 se asocia con un aumento moderado del riesgo de fracturas de cadera y no vertebrales, a pesar de que la densidad mineral ósea (DMO) es normal a elevada en los pacientes con DM2 independientemente del sexo y el origen étnico del paciente. En la DM2 y el índice de masa corporal (IMC) se asocia estrechamente con la DMO y esto podría explicar, en parte, el aumento de la DMO en comparación con las personas sanas. Sin embargo, muchos estudios muestran que la DMO más elevada persiste en los pacientes con DM2 aún después de ajustar el IMC, lo que sugiere la existencia de otros factores, como la hiperinsulinemia, que podrían contribuir a una mayor DMO en estos pacientes. También la DMO se asocia con un aumento de la tasa de pérdida ósea lo cual podría contribuir al riesgo de fractura en los pacientes con DM2. El mayor riesgo de fractura a pesar de una masa ósea normal o incluso aumentada en las personas con DM2 implica la alteración de la microarquitectura ósea o déficit en las propiedades del material óseo que contribuyen a la fragilidad esquelética en estos pacientes. Adicionalmente, también está implicado el aumento de la incidencia o la gravedad de las caídas, tal vez atribuible a la hipoglucemia después del tratamiento con insulina, o a las complicaciones de la enfermedad microvascular, como la neuropatía o la retinopatía.

Muchas complicaciones de la DM2 están producidas por la acumulación de los productos finales de la glicación avanzada (PFGA) en diversos tejidos lo que podría tener efectos negativos sobre la calidad ósea, sin embargo aunque se presume que los PFGA acumulados en el tejido óseo de las personas con DM2, los datos muestran que el aumento de los PFGA en el hueso de estos pacientes es escaso y por lo tanto se desconoce cuál es la importancia de estos hallazgos respecto de la fragilidad del esqueleto en los seres humanos con DM. Por otro lado, en investigaciones in vitro, se ha demostrado que la osteocalcina, una proteína que anteriormente se correlacionaba únicamente con la remodelación ósea, tiene una clara relación con el metabolismo de los carbohidratos al intervenir en la proliferación de las células β del páncreas y en la expresión y secreción de insulina (Preciado-Estrella 2009).

La evaluación de las propiedades mecánicas de la matriz ósea y en general de la composición química del hueso es problemática por la complicación para obtener las muestras de médula ósea o hueso, lo cual se vuelve inviable hacerse rutinariamente en los estudios clínicos. Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se utilizó un modelo de diabetes experimental (DE) en rata wistar mediante el empleo de alloxana con la finalidad de obtener información sobre las alteraciones en la composición química del hueso entre ratas

sin DE y con DE las cuales pudieran estar asociadas a la fragilidad mediante la utilización de la técnica de Espectroscopia Infrarroja (FTIR).

MÉTODOS Y MATERIALES

Animales

Los animales utilizados en este trabajo se trataron de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, correspondiente a técnicas experimentales (analgesia y anestesia), administración de fluidos y sustancias, así como métodos de eutanasia de los animales empleados y tomando en cuenta las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio utilizados para la investigación científica.

Se utilizaron 8 ratas hembra de la cepa Wistar, con un peso promedio de 180 g, se mantuvieron bajo condiciones estándar; ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se les proporciono agua y alimento ad libitum. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición, de la División de Ciencias de la Salud, Campus León, de la Universidad de Guanajuato

Inducción de diabetes experimental

La inducción de DE se realizó mediante la administración vía intraperitoneal de 200 mg de alloxana/Kg de peso corporal. Posteriormente se registró el peso y nivel de glucosa de los grupos semanalmente. Para determinar el nivel de glucosa en las ratas se utilizó un glucómetro. La muestra de sangre se obtuvo de la vena de la cola; las muestras se tomaron antes del periodo de oscuridad. Se consideraron ratas con DE aquellas que presentaron >200 mg/dl.

Obtención de fémur

Se realizó la disección de los fémures (izquierdo y derecho de cada rata), posteriormente se eliminó todo el tejido con tijeras y pinzas, evitando dañar la superficie del hueso. Para evitar el daño a la superficie del hueso se utilizaron escarabajos del Orden Coleóptera y de la Familia Dermestidae para limpiar los fémures de las ratas evitando así utilizar algún tratamiento químico o enzimático.

Análisis químico de los huesos: Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

La técnica de Espectroscopia Infrarroja permite la identificación de los grupos funcionales específicos en un compuesto, para que dichos grupos funcionales sean activos o se asocien con una interacción con la radiación infrarroja se deben cumplir dos condiciones fundamentales, la energía asociada a la vibración de los átomos A-B debe estar comprendida en el intervalo de frecuencias o longitud de onda de la radiación infrarroja que se utiliza para perturbar al sistema y la segunda condición fundamental del enlace químico es que debe presentar un momento bipolar $\mu = q \times r$, donde r es la distancia con carácter vectorial. Actualmente los espectrofotómetros que son empleados para el análisis vibracional de los enlaces químicos cuentan integrado en sus programas de manejo de espectros un algoritmo a base de combinaciones lineales de funciones senos y cosenos conocida como la Transformada de Fourier (FT por sus siglas en inglés), la aplicación de esta herramienta matemática permite sustituir el interferograma con amplitudes negativas y positivas a solamente valores positivos y en una escala directamente proporcional con la frecuencia. Para este trabajo se utilizó un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer modelo Spectrum IX.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis espectroscópico infrarrojo de las cabezas pulverizadas de los fémures de rata se muestran en la Figura 3. Se muestra el espectro de la absorbancia en un intervalo de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1} . Tanto para el caso de ratas control (C) como para el caso de rata diabética experimental (DE). En la región de los 3700 a 3000 cm^{-1} se identifica una banda fuerte y muy ancha asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces MO-H asociadas principalmente al agua molecular ligada a los diferentes componentes del hueso. En ambos casos se identifican señales de vibraciones a 2920 y 2846 cm^{-1} correspondientes a especie de C-H siendo un poco más intensas relativamente para el caso DE. Entre los valores de 1700 y 1390 cm^{-1} , así como a 872 y 599 cm^{-1} la señal a se tiene una de las principales zonas de intención para esta técnica que es la región en donde el ión carbonato (CO_3)-2 presenta sus vibraciones principales, no se identifica un cambio importante entre el caso C y el DE, solamente un poco más intensa la señal a 1538 cm^{-1} que puede ser afectada por la cantidad de agua (MO-H). Se confirma la presencia de silicatos (SiO_4)-3 en ambos casos con la banda a 1246 cm^{-1} , para ambos casos la señala correspondiente al ión fosfato (PO_4)-3 de 1000 y 558 cm^{-1} (Beasley 2014). En la Figura 4 se muestra la región de los 1725 a 550 cm^{-1} de los espectros, en esta región se puede notar un cambio en la intensidad el espectro de C y la DE en la banda que está a 1538 cm^{-1} , un cambio relativamente importante a nivel de los grupos funcionales de ión carbonato (CO_3)-2 a 599 cm^{-1} y para el ión fosfato (PO_4)-3 en 558 cm^{-1} .

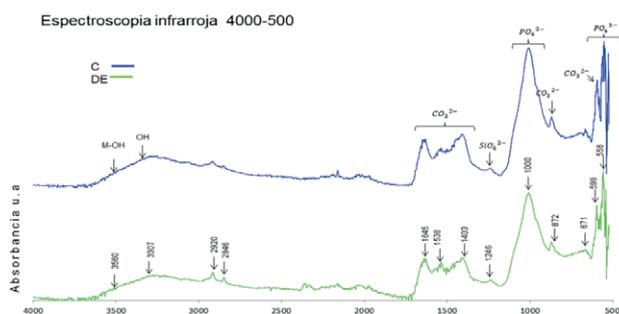


Figura 3 Espectroscopia Infrarroja con escala 4000-500 cm^{-1} comparativa entre una rata wistar control y una con DM.

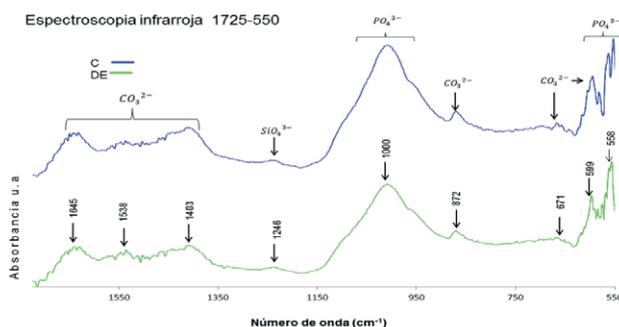


Figura 4 Espectroscopia Infrarroja con escala 1725-550 cm^{-1} comparativa entre una rata wistar control y una con DM.

CONCLUSIONES

Basado en los resultados de espectroscopia infrarroja se puede comprobar que a nivel de grupos funcionales en ambos casos C y DE correspondientes al $(CO_3)^{2-}$, $(SiO_4)^{3-}$ y $(PO_4)^{3-}$ es muy semejante, sin embargo por las diferencias presentadas en las bandas por las diferencias presentadas en las bandas 599 y 558 cm^{-1} , se presume que estos iones se encuentran en ambientes químicos diferentes en los enlaces C-O y P-O respectivamente mostrando que pudo existir una alteración en ambos compuestos químicos presentes en el fémur de la rata con DE.

BIBLIOGRAFIA

Libros

Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe Mundial de la Diabetes (Resumen de Orientación), Francia: World Health Organization.

Artículos de libros

Federación Internacional de la Diabetes. (2015). “¿Qué es la diabetes?” en Atlas de la diabetes de la FID, Bruselas: International Diabetes Federation, [pp. 21-32].

Federación Internacional de la Diabetes. (2015). “La carga mundial” en Atlas de la diabetes de la FID, Bruselas: International Diabetes Federation, [pp. 47-66].

Hernández-Ávila, M. et al. (2016). “Resultados” en Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016), México: Instituto Nacional de Salud Pública, [pp. 36-127].

Artículos de revista

Olivares-Reyes J. A. et al. (2008). “Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina” en Revista de Educación Bioquímica, Núm. 1, Vol. 27 marzo, [pp. 9-18].

Preciado-Estrella D. A. (Julio-Agosto 2009). “El hueso, ¿un regulador del metabolismo energético?” en Revista Médica MD, Núm. 2, Vol. 1, [pp. 9-11].

Artículos en línea

Smushkin, G., y Vella, A. (2010). “What is type 2 diabetes?” en Medicine, Núm. 11, Vol. 38, noviembre, pp. 597-601. Consultada en <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2010.08.008> (fecha de consulta 22-06-2017).

Asociación Americana de Diabetes. (2015). “¿Qué es la diabetes gestacional?” en Asociación Americana de Diabetes. Consultada en <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-gestacional/que-es-la-diabetes-gestacional.html> (fecha de consulta 21-05-2017).

Asociación Americana de Diabetes. (2015). “Diabetes tipo 2” en Asociación Americana de Diabetes. Consultada en <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-tipo-2/?loc=db-es-slabnav> (fecha de consulta 21-05-2017).

Bazaga-Isla M. (2011). “Insulina” en Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado. Consultado en: http://cerezo.pntic.mec.es/~jgarc247/2_bachto/anho_internacional_quimica/05insulina.htm (fecha de consulta 3-07-2017)

Beasley, M. M. et al. (2014). “Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone bioapatite diagenesis”, en Journal of Archaeological Science, Núm. 1, Vol. 46, pp. 16–22. Consultado en <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.03.008> (fecha de consulta 1-07-2017)

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI) por el apoyo en el uso de la infraestructura del Laboratorio de Análisis de Materiales. Al Bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato, a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo prestado durante la realización del proyecto y a mis papás por su dedicación y esmero para llegar a este punto.

EXPOSICIÓN AMBIENTAL DURANTE EL EMBARAZO Y MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN EL HOSPITAL MATERNO INFANTIL DE IRAPUATO

Jessica Paola Delgado González, Dr. Benigno Linares Segovia y Dra. Virginia Álvarez Jiménez

RESUMEN

Las malformaciones congénitas son un problema de salud pública, ya que causan mortalidad infantil, enfermedades crónicas y discapacidad. El origen puede ser causas genéticas, ambientales o desconocidas. Se ha estimado que 47% ocurre por causas desconocidas, 25% son genéticas, 25% son multifactoriales y 3% son causados por agentes físicos, químicos o biológicos. Metodología: Se realizó un estudio de casos y controles, durante el periodo de junio-julio del 2017 se registraron los casos de recién nacidos con malformaciones congénitas en un Hospital Materno Infantil, para los controles se seleccionaron aleatoriamente recién nacidos teóricamente sanos. La herramienta empleada para evaluar los factores de riesgo fue la hoja verde de salud ambiental reproductiva. Resultados: Se registraron 13 casos de malformaciones congénitas, la tasa de malformaciones congénitas fue de 14 x 1000 recién nacidos sanos, los 3 factores que más se asociaron a la presencia de malformaciones congénitas fueron: Ser adolescente (OR= 1.52, IC= 95%, 1.02- 4.3), primigesta (OR= 1.57, IC= 95%, 1.07 - 5.1) y la exposición a sustancias químicas (OR= 9.3, IC=95%, 2.2 - 39.4). Conclusión: Los factores sociodemográficos, ambientales y culturales influyeron en el desarrollo de malformaciones congénitas. En nuestra serie, la exposición a sustancias químicas y el embarazo en adolescentes fueron los principales factores de riesgo modificables.

Palabras clave: malformaciones congénitas, factores de riesgo, embarazo.

ABSTRACT

Congenital malformations are a public health problem, as they cause infant mortality, chronic diseases and disability. The source may be genetic, environmental or unknown causes. It has been estimated that 47% occur for unknown causes, 25% are genetic, 25% are multifactorial and 3% are caused by physical, chemical or biological agents. Methods: A case-control study was carried out during the period June-July 2017. Cases of newborns with congenital malformations were registered in a Maternal and Child Hospital. For the controls, randomly selected neonates were theoretically healthy. The tool used to assess risk factors was the green leaf of environmental reproductive health. Results: There were 13 cases of congenital malformations, congenital malformations rates were 14 x 1000 healthy newborns, the three factors that were most associated with the presence of congenital malformations were: Being adolescent (OR = 1.52, CI = 95% , 1.0-2.3), primigest (OR = 1.57, CI = 95%, 1.07 - 5.1) and exposure to chemicals (OR = 9.3, CI = 95%, 2.2 - 39.4). Conclusion: Sociodemographic, environmental and cultural factors influenced the development of congenital malformations. In our series, exposure to chemicals and pregnancy in adolescents were the major modifiable risk factors.

Key words: congenital malformations, risk factors, pregnancy.

INTRODUCCIÓN

Las malformaciones, defectos o anomalías congénitas (MC), se deben a alteraciones en el desarrollo morfológico, estructural, funcional, o molecular del embrión. Sus repercusiones pueden ser: el aspecto estético, las alteraciones funcionales con secuelas transitorias o permanentes, o incluso la muerte (Nava Flores, 2011). Las malformaciones congénitas son un problema de salud pública, ya que causan mortalidad infantil, enfermedades crónicas y discapacidad.

Se calcula que cada año 276.000 recién nacidos fallecen durante las primeras cuatro semanas de vida en el mundo debido a anomalías congénitas. (OMS, 2015). Los defectos de nacimiento son la principal causa de mortalidad infantil en todo el mundo y en 2010 fue la segunda causa en México (Fernández Cantón, 2012). Su frecuencia varía del 3 al 5% en los neonatos vivos, pero se eleva al considerar los fallecidos y los productos de abortos. Cuando una mujer embarazada se expone a algún agente teratógeno, a un proceso infeccioso o padece una enfermedad crónico-degenerativa, la frecuencia de MC aumenta hasta 14.9 por 1,000 y la mortalidad hasta 15.1%, comparada con el 12.2% de la mortalidad perinatal general (Nava Flores, 2011).

El origen puede ser causas genéticas, ambientales o desconocidas. Se ha estimado que 47% ocurre por causas desconocidas, 25% son genéticas, 25% son multifactoriales, es decir una combinación de factores genéticos y ambientales; y 3% son causados por agentes físicos, químicos o biológicos (Benítez Leite, 2009). Estudios epidemiológicos han encontrado una mayor prevalencia de malformaciones congénitas en los niños nacidos de madres que viven en regiones con alto uso de plaguicidas. La mayoría de los plaguicidas son disruptores endocrinos, con acción mutagénica, teratogénica y genotóxica. Entre las principales razones de las mujeres embarazadas que tienen contacto con sustancias teratogénicas se encuentra la asociación de problemas de salud pública preexistentes (como la falta de atención médica, consumo de drogas y alcohol, falta de saneamiento básico) a otras cuestiones sociales como la pobreza y el analfabetismo (Reidpath y Allotey, 2003, Organización Mundial de la Salud, 2015a). Por lo tanto, los descendientes de las mujeres socialmente desfavorecidas son más vulnerables a los defectos de nacimiento, causando un impacto en la mortalidad infantil y los gastos de salud con atención especializada. (Ueker, M. E., 2017).

Como se ha explicado entonces el 25% de los casos aproximadamente de MC a nivel mundial se debe a

múltiples factores modificables y que debemos identificar precisamente para crear estrategias y programas que controlen o terminen con las exposiciones antes y durante el embarazo y disminuir la incidencia de anomalías congénitas. Objetivo general:

- Determinar los factores de riesgo para el desarrollo de malformaciones congénitas en el Hospital Materno Infantil de Irapuato.

Específicos:

- Determinar la prevalencia de malformaciones congénitas.
- Aplicar la encuesta de salud ambiental reproductiva para detectar factores de riesgo.
- Conocer los factores de riesgo asociados a malformaciones congénitas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se realizó un estudio de casos y controles, a los cuales se les aplicó la hoja verde de salud ambiental reproductiva validada en el Hospital Materno Infantil de Irapuato que detecta los principales riesgos medioambientales durante el embarazo y la lactancia y se recolectaron los datos de dichas encuestas en una base de datos (Epi info 7.2®). El universo de trabajo fue el Hospital Materno Infantil de Irapuato (HMII), para los casos se encuestó a las madres con recién nacido vivo o muerto con malformación congénita, deformidad o anomalía cromosómica diagnosticada y a sus parejas. Se recabaron los datos de los casos de malformaciones congénitas registrados en el Hospital Materno Infantil de Irapuato del año 2016 a la fecha considerando como base la clasificación que propone la Clasificación Internacional de Enfermedades Revisión 10 (CIE-10) en el capítulo XVII “Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas”. Para los controles se tomaron en cuenta los datos de las madres y padres con recién nacido vivo sano dentro del HMII y se excluyeron aquellos con malformación congénita de etiología ya definida o con errores congénitos del metabolismo.

Los factores de riesgo analizados fueron: uso de anticonceptivos, patología en el embarazo, exposición a radiaciones ionizantes 3 meses antes del embarazo o durante, riesgo laboral del padre, riesgos ambientales en el hogar, exposición a sustancias químicas antes y durante el embarazo, tabaquismo activo de la madre 3 meses antes del embarazo, tabaquismo pasivo durante el embarazo, tabaquismo activo del padre, consumo de drogas en la madre, consumo de drogas por el padre, alcoholismo de la madre 3 meses antes del embarazo, alcoholismo del padre, uso de plaguicidas domiciliarios y morbilidad en la madre y/ o el padre.

Para el análisis se incluyeron 13 casos de malformaciones congénitas mediante muestreo por simple disponibilidad (muestreo no probabilístico) y 93 controles de los cuales se eliminaron 13 por no contar con la información suficiente y se utilizó el programa SPSS versión 15.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 93 pacientes, 13 casos de malformaciones congénitas (13.98%) y 80 controles (86.02%). La relación casos-contróles fue de 1:6. En la tabla 1 se muestran las características demográficas y clínicas de los grupos de estudio. No observamos diferencia significativa por la edad de la madre entre grupos ($p=0.10$); pero en el grupo de las casos la edad del padre fue significativamente mayor que en los controles ($p=0.01$). No se observó diferencia significativa en la escolaridad de las madres entre grupos ($p=0.15$) ni en los padres. El promedio de edad gestacional fue de 36.3 ± 6.7 semanas.

Se observó que en la mayoría de los casos de MC (53.8%) la madre fue primigesta mientras que en los controles fue multigesta (54.8%) ($p=0.02$). No se observó diferencia significativa en número de partos, abortos, ni cesáreas entre los grupos. En el 53.8% de los casos y el 55.7% de los controles del embarazo fue un embarazo deseado ($p=0.90$). El 100% de los casos y 92.5% de los controles recibió control prenatal adecuado con un promedio de 6.75 ± 2 consultas antes del parto.

Tabla 1. Características demográficas de los grupos de estudio

| Variable en estudio | Casos n= 13 | Controles n= 80 | p |
|-------------------------------|----------------|--------------------|------|
| Edad de la madre | 24 (18 – 36) | 22 (21 – 24) | 0.10 |
| Edad del padre | 29 (20 – 39) | 24 (22 – 25) | 0.01 |
| Escolaridad de la madre | No. (%) | | |
| Analfabeta | 0 | 1 (1.3) | 0.15 |
| Primaria | 1(7.7) | 17 (21.3) | |
| Secundaria | 8 (61.5) | 50 (62.5) | |
| Bachillerato | 4 (30.8) | 7 (8.8) | |
| Profesional | 0 | 5 (6.3) | |
| Escolaridad del padre | | | |
| Analfabeta | 0 | 4(4.3) | 0.74 |
| Primaria | 3 (23.1) | 22 (27.8) | |
| Secundaria | 8 (61.5) | 34 (43.0) | |
| Bachillerato | 2 (15.4) | 12 (15.2) | |
| Profesional | 0 | 7 (8.9) | |
| Posgrado | | | |
| Antecedentes ginecobstétricos | | | |
| N° de gestas | 1 (1-4) | 2 (1-2) | 0.09 |
| N° de partos | 1 (0-3) | 1 (0-1) | 0.48 |
| N° de cesáreas | 1 (0-1) | 0 | 0.28 |
| N° de abortos | 1 (0-1) | 0 | 0.29 |
| Embarazo planificado | 7 (53.8) | 44 (55.7) | 0.90 |
| Control prenatal | 13 (100) | 74 (92.5) | 0.59 |

En el análisis de regresión logística, los 3 factores que más se asociaron a la presencia de malformaciones congénitas fueron: Ser adolescente (OR= 1.52, IC= 95%, 1.02- 4.3), primigesta (OR= 1.57, IC= 95%, 1.07 – 5.1) y la exposición a sustancias químicas en áreas de recreo, tales como mecánica automotriz, pintura y motociclismo (OR= 9.3, IC=95%, 2.2 – 39.4).

CONCLUSIONES

El embarazo constituye una situación que modifica la fisiología de distintos órganos y sistemas. La aparición de enfermedades antes o durante la gestación predisponen el riesgo de presentar complicaciones. Las complicaciones durante el embarazo pueden ser consecuencia de enfermedades crónicas de la madre, enfermedades infecciosas, patologías relacionadas con el embarazo o resultado de exposiciones ambientales. Esto tendrá repercusiones en la formación del producto que podría derivar en malformaciones congénitas. La metodología tradicionalmente empleada en el análisis de factores de riesgo hace uso único del subsistema de información a nivel nacional que recaba los datos del recién nacido vivo o de las muertes fetales en los formatos del certificado de nacimiento y certificado de muerte fetal, respectivamente. Se ha sugerido que la recopilación de estadísticas mediante dicha metodología pudiera infraestimar asociaciones importantes puesto que sólo considera factores demográficos y clínicos y deja fuera los factores ambientales. Los factores sociodemográficos, ambientales y culturales influyeron en el desarrollo de malformaciones congénitas. En nuestra serie, la exposición a sustancias químicas durante las actividades recreativas y el embarazo en adolescentes fueron los principales factores de riesgo modificables. La herramienta empleada, la hoja verde de salud ambiental reproductiva, fue de utilidad para identificar dichos factores que podrían contribuir a la presencia de malformaciones congénitas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por apoyar a sus estudiantes y brindarles oportunidades como ésta; agradezco al Hospital Materno Infantil por recibirme calurosamente para la realización del proyecto y fomentar la investigación a través del Dr. Benigno Linares Segovia que nos orientó en todo momento en el desarrollo de dicho trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Benítez-Leite S, Macchi ML, Acosta. (2007). "Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos" en *Pediatr. (Asunción)*, Núm 34. Vol. 2, [pp. 111-121].
2. Fernández Cantón Sonia B., Gutiérrez Trujillo Gonzalo, Viguri Uribe Ricardo. (2012). "Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes". *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*; Núm. 69. Vol. 2, [pp. 144-148]. Consultado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166511462012000200011&lng=es. (fecha de consulta 21-06-2017).
3. Harris S. Benjamin, Bishop C. Katherine, Kemeny R. Hanna, Walker S. Jennifer, Rhee Eleanor, Kuller A. Jeffrey. (2017) "Risk factor for birth defects". *Obstetrical and gynecological survey*. Núm 2. Vol. 72, [pp. 123-135].
4. Mazzu-Nascimento, T., Melo, D. G., Morbioli, G. G., Carrilho, E., Vianna, F. S. L., da Silva, A. A., & Schuler-Faccini, L. (2017). Teratogens: a public health issue – a Brazilian overview. *Genetics and Molecular Biology*, Núm 40, Vol. 2, [pp. 387–397]. Consultado en: <http://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0179>, (21-07-2017).
5. Nava Flores Gerardo, Pérez A Thelma Valentina, Pérez B Martha María. (2011). "Malformaciones congénitas diagnosticadas en un hospital general". *Acta Pediatr Mex Núm 32 Vol. 2*, [pp. 101-106]. Consultado en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2011/apm112d.pdf>, (fecha de consulta 21-06-2017).
6. Navarrete Hernández Eduardo, Canún Serrano Sonia, Reyes Pablo Aldelmo E., Sierra Romero María del Carmen, Valdés Hernández Javier. (2013). "Prevalencia de malformaciones congénitas registradas en el certificado de nacimiento y de muerte fetal: México, 2009-2010". *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* Núm 70, Vol. 6, [pp.499-505]. Consultado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166511462013000600011&lng=es. (fecha de consulta 21-06-2017).
7. Organización Mundial de la Salud. Anomalías congénitas Nota descriptiva N°370 [actualizada abril del 2015; acceso el 21 de junio de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/es/>
8. Rojas R Alejandra, Ojeda B María Elena, Barraza O Ximena. (2000). "Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas". *Rev. méd. Chile* . Núm 128, Vol. 4 [pp. 399-404]. Consultado en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-9887200000400006&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-9887200000400006>. González JG, M. M. (fecha de consulta 21-06-2017).
9. Ueker, M. E., Silva, V. M., Moi, G. P., Pignati, W. A., Mattos, I. E., & Silva, A. M. C. (2016). Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study. *BMC Pediatrics*, 16, 125. Consultado en: <http://doi.org/10.1186/s12887-016-0667-x> (fecha de consulta 01-08-2017).

CAMBIOS CELULARES PRODUCIDOS EN EL SISTEMA NERVIOSO DURANTE EL DESARROLLO LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN RATONES 3xTg-AD.

María Fernanda Del Aguila Cabrera¹ y Sofía Yolanda Díaz Miranda²

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una de las demencias más con mayor prevalencia en el mundo, ya que es neurodegenerativa, grave y mortal; por lo que se busca encontrar y comprender cuales son los cambios celulares que se producen en el sistema nervioso durante el desarrollo de esta enfermedad. Se realizaron distintas pruebas siendo la técnica de inmunohistoquímica una de las principales para marcar los puntos de interés en el sistema nervioso durante la enfermedad de Alzheimer. Con estas pruebas se comprobó la presencia de la proteína tau, el péptido β -amiloide y la glía en el sistema nervioso de los ratones 3xTg-AD a diferentes edades, lo cual puede ayudar a comprender mejor ésta patología y proponer a futuro algún tratamiento para ello.

Palabras Clave: Alzheimer, inmunohistoquímica, hipocampo, ratón, 3xTg-AD

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most important dementias in the world, since it is neurodegenerative, severe and deadly; So it is sought to find and understand what are the cellular changes that occur in the nervous system during the development of this disease. Several tests were performed being the technique of immunohistochemistry one of the main to mark the points of interest in the nervous system during Alzheimer's disease. With these tests the presence of tau protein, β -amyloid peptide and glia in the nervous system of 3xTg-AD mice at different ages was verified, which can help to better understand this pathology and to propose some treatment in the future. it.

Keywords: Alzheimer, immunohistochemistry, hippocampus, mice 3xTg-AD

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo, que, a su vez, es la causa más común de demencia durante el envejecimiento; se caracteriza por dos lesiones distintivas: placas difusas y neuríticas, compuestas predominantemente por el péptido β -amiloide ($A\beta$), y marañas neurofibrilares, compuestas de agregados filamentosos de proteína tau hiperfosforilada (Oddo et al., 2003). La EA es un proceso degenerativo con una anatomía patológica bien definida que habitualmente comienza a nivel del hipocampo, incluyendo el subículo, para irse extendiendo progresivamente hacia los lóbulos temporal lateral, frontal y parietal; este patrón de progresión anatomopatológica correlaciona bien con la evolución de los déficits cognitivos. A medida que progresa la enfermedad, la atrofia hipocámpica se extiende con un patrón que sigue la trayectoria conocida de la diseminación de placas neurales y marañas neurofibrilares, lo que resulta ser un predictor significativo de diagnóstico clínico.

Para imitar las neuropatologías de los humanos en ratones se utilizan distintos modelos como los transgénicos o las inyecciones intracerebrales; por lo que se buscó duplicar o imitar mejor las características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA) mediante un modelo triple transgénico de EA (3xTg-AD) que alberga tres transgenes: la proteína precursora β -amiloide (β APP^{Swe}), presenilina-1 (PS1M146V), y tauP301L. (Oddo et al., 2003).

La glía es el grupo de células más abundante en el cerebro; participa en la formación, operación y modulación de los circuitos sinápticos, en consecuencia, los estudios recientes presentan a la glía como un elemento fundamental para investigar y conocer sobre la fisiología del sistema nervioso central (Reyes-Haro, et al., 2014). La inmunohistoquímica es un método histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen a un antígeno específico que se quiere identificar; ésta técnica permite localizar una sustancia tisular o citológica, identificando los marcadores antigénicos característicos de una línea celular, células que secretan una proteína, receptores de membrana, gradientes de concentración tisulares o células que han respondido a una hormona (Key, et al., 2006). Por ello, se propone implementar el modelo triple transgénico en ratones de diferentes edades para poder analizar los cambios celulares que suceden en el sistema nervioso durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer por medio de inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos (anti-Bam10, anti-499, GFAP) que nos permiten detectar la expresión de las placas neurales, las marañas neurofibrilares y la glía en las zonas específicas del cerebro como el hipocampo, que está relacionado con la memoria. La tinción de Nissl es un método utilizado para teñir los cuerpos celulares mediante colorantes básicos y que marca la distribución de las neuronas, tiñéndose solamente los núcleos de las células gliales.

El propósito de este documento es evidenciar las actividades que se realizaron durante la estancia del verano 2017 de la ciencia región centro en el laboratorio de Neuromorfometría y desarrollo del Instituto de Neurobiología de la UNAM-campus Juriquilla, presentando algunos de los protocolos que se llevan a cabo para cumplir con los objetivos de encontrar y comprender cuales son los cambios celulares que se producen en el sistema nervioso durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

METODOLOGÍA

Para el desarrollo experimental en el presente trabajo se utilizaron ratones 3xTg-AD de 30 días y 19 meses de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) campus Juriquilla, Qro., cumpliendo con las normas oficiales para el manejo de animales de laboratorio.

PERFUSIÓN

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal, se tomó el peso corporal y fue registrado. Se realizó la técnica de perfusión intracardiaca, colocando al animal en un bote con rejilla para comenzar a incidir en piel con tijeras rectas en línea media abdominal, tomando con una pinza el extremo inferior de la piel, incidiendo en músculo y cortando con las tijeras en una sola línea central hasta el diafragma, el cual también se corta. Se tomó la base del tórax y por medio de dos líneas laterales se cortó y se colocó hacia atrás para dejar expuesta la cavidad torácica y poder manipular el corazón. El corazón fue canalizado introduciendo una aguja sin filo, por la que fluye la solución salina y después el fijador (paraformaldehído al 4% con un pH de 7.4), en el ventrículo izquierdo del corazón, y se abre la llave de solución salina para que fluya por el torrente sanguíneo, sujetando la aguja y el corazón con una pinza para que no se muevan. Se incidió en la aurícula derecha del corazón para que saliera la solución salina y pasara por el organismo para lavar. Inmediatamente, sin sacar la aguja del corazón se hace pasar la solución fijadora hasta observar que los ojos, lengua y cola estén completamente blancos. Posteriormente, se extrajo el encéfalo por decapitación y posija en la misma solución fijadora de paraformaldehído al 4% y 24 horas después se coloca en sacarosa al 30% almacenándose en el refrigerador por 24 h o hasta que el encéfalo se sumerja en el fondo del frasco.

Después se realizaron cortes sagitales de ambos hemisferios en un criostato marca Leica a 40 μm , recogiendo los cortes cada 320 micras (siendo 8 series); los tejidos obtenidos se colocaron en PBS al 0.1M con Azida de sodio 0.1% para conservarlos hasta realizar la técnica de inmunohistoquímica.

INMUNHISTOQUÍMICAS

Se eligieron 8 tejidos cerebrales de cada serie de ratones 3xTg-AD que tuvieran la región del hipocampo. Se colocaron en pozos con peróxido de hidrógeno con metanol en 50ml de agua para desenmascarar los epitopes. Seguido de un lavado con PBS 0.1 M por 10 minutos. Se pusieron en PBS-Tritón 0.1% (50ml de PBS con 500ml de tritón). Se cambiaron a PBS-T con el anticuerpo anti-499 (1:500) y antiBam10 (1:500) y GFAP (1:500) y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5min cada uno con PBS 0.01M y se agregó el anticuerpo secundario (crecido en ratón con concentración 1:500) por 2 horas y procediendo a hacer tres lavados de 5-10min con PBS 0.01M. Se agregó A+B (2 gotas 1:1) y se dejó a temperatura ambiente por 1:30h. Después se hicieron 3 lavados con PBS 0.1M de 10 minutos y 1 lavado con acetato de sodio (pH 6, 0.2M). Posteriormente se reveló con diaminobenzidina (DAB), diluyendo 0-0001g de glucosa oxidasa en 100 μl de agua desionizada, se tomaron 10 μl y se agregaron a la solución para activar DAB. (Solución para 10 mL: En 1mL de agua desionizada se agregaron 10 mg de DAB, en 9 mL de NAS 0.1M, pH 6 agregar 40 mg D' glucosa y 8 mg de cloruro de amonio). Por último, se montaron los tejidos en un portaobjetos, colocando resina a base de xilenos y se sobrepuso un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

TINCIÓN DE NISSL

Esta técnica sirve para marcar los cuerpos celulares (en el citoplasma, específicamente el retículo endoplásmico rugoso) presentes en tejidos de 8 series primero, se montaron las series de tejidos en portaobjetos y después, se hidrataron durante 15 minutos en PBS 0.1M, para después pasarlos por la tinción con violeta de cresilo por 1 minuto. Se preparó un tren de alcoholes del 50%, 60%, 70%, 80%, 96% y del 100%, para así pasar los portaobjetos por cada uno de ellos, metiendo y sacando las laminillas con el propósito de enjuagar para así quitar el exceso de colorante. Después de terminar de lavar en alcohol al 100%, se procedió a pasarlos por xilol usado para que terminaran de transparentar y después pasarlos a xilol nuevo. Se secaron al aire y enseguida se cubrió la superficie del portaobjetos con suficiente resina disuelta en xilol para sobreponer un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmunohistoquímica muestra la presencia de beta amiloide, las marañas neurofibrilares y la glía en los tejidos cerebrales de los ratones transgénicos de 30 días (1a,1b,1c) y 19 meses (1c,1d,1e) de edad, como se muestra en la figura 1. Se puede observar y distinguir claramente el gran aumento de la marca con la diferencia de edades, debido a que la presencia de Bam10, tau y GFAP es más evidente en los ratones de 19 meses de edad. Los cortes fueron tomados de hipocampo con una imagen de aumento de 100 μm .

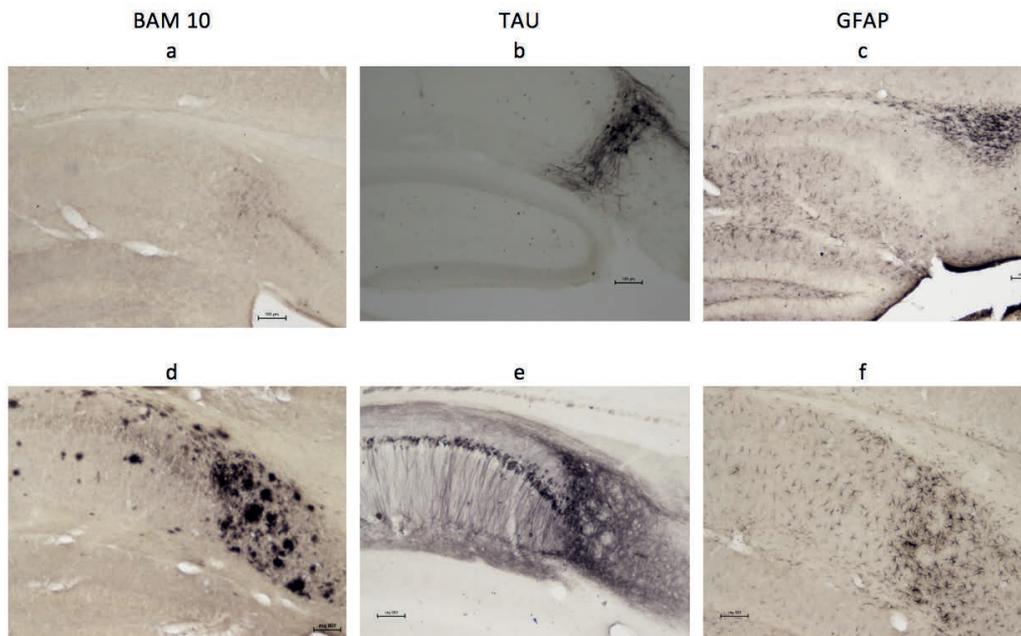


Figura 1. Inmunotinción de Bam10, tau y GFAP en tejidos de ratones 3xTg-AD.

El panel a nos muestra la presencia de Bam10 y la aparición de la placas neurales en hipocampo en un tejido de un ratón 3xTg-AD con 30 días de edad, en b se observa la presencia de tau formando las marañas neurofibrilares a los 30 días de edad, específicamente en subículo. En el panel c se observa la glía existente en hipocampo a los 30 días de edad. En el panel d,e y f se puede observar de la misma manera la expresión de Bam10, tau (marañas neurofibrilares) y GFAP (glia), respectivamente, en los tejidos de 19 meses de edad en hipocampo y subículo, se puede apreciar la diferencia entre ambas edades, ya que es muy claro que hay mayor expresión y concentración de genes en los tejidos de 19 meses de edad a comparación con los de 30 días, lo que nos lleva a concluir que la presencia de placas neurales y marañas neurofibrilares son las lesiones distintivas durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La figura 2 nos muestra que la tinción de Nissl se llevó a cabo con eficacia, éstas son las imágenes representativas de la tinción con violeta de cresilo aplicada a los tejidos de diferentes aproximaciones del cerebro de 30 días de edad. Los cortes fueron realizados de manera sagital y se tomaron cortes donde apareciera hipocampo desde lo más externo hasta lo más interno del cerebro

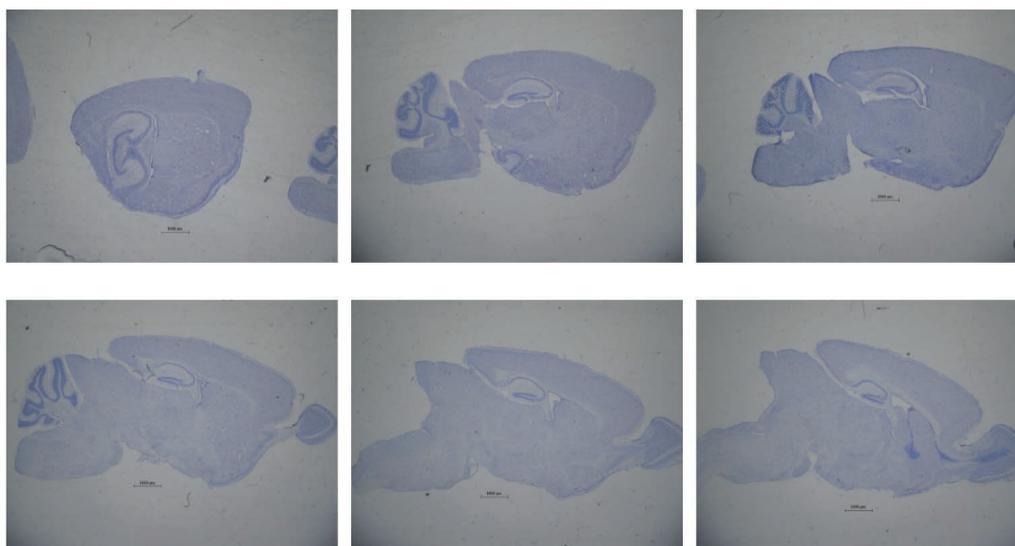


Figura 2. Histología con técnica de violeta de cresilo en tejidos de ratones 3xTg-AD.

CONCLUSIONES

El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se puede observar mediante pruebas de inmunohistoquímica que nos muestren la expresión de beta amiloide, las marañas neurofibrilares y la glía en el hipocampo, siendo éstas consideradas como características principales y más evidentes de ésta demencia. Es evidente que en animales 3xTg-AD de edad corta (30 días) no hay mucha expresión de la proteína tau y el péptido β -amiloide, sin embargo, en los ratones adultos (19 meses de edad) existe gran presencia de éstos, lo que nos lleva a

concluir que, en efecto, la enfermedad de Alzheimer es una demencia neurodegenerativa que va progresando con el tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del 19° Verano de la Ciencia Región Centro, a la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda y al Instituto de Neurobiología de la UNAM por haberme aceptado en esta estancia de verano y permitirme vivir esta experiencia, a mi coordinadora Valeria Martín del Campo Pérez y al ITSPR por el apoyo y consejos brindados, a la M en C.F. Azucena Ruth Aguilar Vázquez y a la Dra. Erika María Orta Salazar por haberme asesorado y ayudado durante el transcurso de mi verano, y, finalmente a todos los integrantes del laboratorio C-02 de Neuromorfometría y desarrollo del INB por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia, apoyo, consejos y experiencias durante mi estancia en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- ODDO, S. (2003). "Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction" en *Neuron*, Núm. 3, Vol. 39, 31 Julio 2003, [pp. 409-421].
- ODDO, S. (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease" en *Neurobiology of Aging*, Núm. 8, Vol. 24, diciembre 2003, [pp. 1063-1070].
- ORTA SALAZAR, E. (2013). "Marcaje colinérgico en corteza e hipocampo y su relación con la enfermedad de Alzheimer". *Neurología*. 2013. doi: 10.1016/j.nrl.2012.10.007
- REYES-HARO, D. (2014). "La glía, el pegamento de las ideas" en *Revista Ciencia*, mayo de 2014.
- SOLITO, E. (2012). "Microglia function in Alzheimer's disease" en *Frontiers in Pharmacology*, No.3, 14, consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878730> (14-07-2017).
- NUOVO, G. (2017). "Diagnostic pathology of Alzheimer's disease from routine microscopy to immunohistochemistry and experimental correlations" en *Annals of pathology*, Vol. 28, junio de 2017, [pp. 24-27].
- KEY, M. (2006). "Immunohistochemical Staining Methods, Fourth edition", California, Education Guide, Dako.
- SHUANG-QING, C. (2014). "Neural stem cell transplantation improves espacial learning and memory via neuronal regeneration in Amyloid- β precursor protein/presenilin 1/tau Triple Transgenic Mice" en *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, Núm.2, Vol. 29, 01 marzo 2014, [pp. 142-149].
- GEORGE, S. (2014). "Lesion of subiculum reduces the spread of amyloid beta pathology to interconnected brain regions in a mouse model of Alzheimer disease" en *Acta Neuropathologica Communications*, Núm. 2, Vol. 17, 2014.
- MANZANO, S. (2009). "Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer" en *Neurología*, Núm. 24, Vol. 4, 2009, [pp. 255-262].

CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Claudia Elizabeth Ramírez Rodríguez¹ y Martha Leticia Santos Martínez²

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la enfermedad más importante en la hematología pediátrica, ya que es la neoplasia más común en niños menores de 15 años. Las células *E. coli* químicamente competentes BL21 (DE3) son ideales para el uso con sistemas de expresión basados en el promotor T7 bacteriófago, éstas contienen lisógeno DE3 que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacC5, por lo tanto se utiliza IPTG para inducir la expresión de la RNA polimerasa. Los marcadores genéticos más importantes ayudan al ARN y a las proteínas a acumularse a altos niveles sin degradación.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most important disease in pediatric hematology, since it is the most common neoplasm in children under 15 years of age. Chemically competent *E. coli* cells BL21 (DE3) are ideal for use with expression systems based on the bacteriophage T7 promoter, they contain the lysene DE3 containing the T7 RNA polymerase gene under the control of the lacC5 promoter, hence Both IPTG is used to induce the expression of RNA polymerase. The most important genetic markers help RNA and proteins accumulate at high levels without degradation.

Palabras Clave: LLA, IPTG, cepas BL21.

INTRODUCCIÓN

La leucemia aguda se caracteriza por la proliferación neoplásica de cualquier célula del tejido hematopoyético. Es una enfermedad muy grave que puede ocasionar la muerte en un lapso corto, si no se trata de manera adecuada. La leucemia se clasifica de acuerdo con la célula de la cual se origina (denominados blastos). Se reconocen dos grandes familias de leucemia aguda: la linfoblástica (LLA) y la mieloblástica (LMA), clasificación muy útil porque la leucemia aguda es un padecimiento de evolución variable, según sea el tipo de célula afectada. (Almaguer y Pérez, 2015).

Debido a que las fórmulas comerciales de esta enzima tienen origen enterobacteriano provocando reacciones de hipersensibilidad y formación de anticuerpos entre los pacientes; además, tienen una limitada distribución farmacocinética y una rápida eliminación del cuerpo. Las L-ASNasa se clasifican en dos tipos: bacteriano y planta. Las L-ASNasa de tipo planta poseen una alta similaridad con las aspartilglucosamidasa, que también poseen actividad de L-ASNasa, provenientes de bacterias y humanos. Estás se expresan primero como precursores inactivos, requiriendo de una posterior autoproteólisis para su activación y la formación de formas oligoméricas activas así como heterotetrámeros (dímeros de heterodímeros alfa y beta). El presente trabajo muestra la sobreexpresión heteróloga de la proteína L-ASNasa, purificación de L-ASNasa por cromatografía de afinidad por níquel y la cuantificación de la proteína por el método de Bradford.

MÉTODOS Y MATERIALES

Optimización de la concentración de IPTG utilizada para la producción de la L-ASNasa recombinante
Uno de los parámetros comúnmente utilizados durante la optimización del rendimiento de producción de proteínas recombinantes, es la concentración de IPTG. Esta optimización se realizó en 26.25 ml de medio de cultivo debido a que no se cuenta con la cantidad suficiente de IPTG para realizarla en biorreactor. Inocular 6 ml de medio LB, adicionado con Kanamicina (0.03 mg/ml) y cloranfenicol (0.033 mg/ml). Dejar crecer el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación constante. Inocular cada uno de los cinco matraces de 25 ml de medio LB (previamente calentados y con antibióticos correspondientes) con 1.25 ml de pre-inóculo. Permitir crecer el cultivo a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO600 de 5.5–6.0. Inducir la expresión de la proteína añadiendo IPTG, crecer el cultivo durante ocho horas y Tras finalizar el periodo post-inducción, cosechar las células mediante centrifugación a 4000 x g por 20 minutos.

Purificación de L-ASNasa por cromatografía de afinidad por níquel

Centrifugar tubos Falcon a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C (guardar pellets a -20°C), posteriormente resuspender pellets en buffer A; y agregar lisozima y DNasa, mezclar bien e incubar en hielo por 15 a 30 minutos. Centrifugar el lisado a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C y por último recuperar el sobrenadante y guardar en el refrigerador. La capacidad de unión es de 40 mg de proteína/ml de resina por lo tanto se utilizaron 3 ml de resina para 5 Lt de cultivo, el cual cuenta con menos de 40 mg de proteína/ Lt aproximadamente. En un vaso de precipitado de 200 ml agregar la resina y lavar con 60 ml de buffer A. Dejar en agitación toda la noche en refrigeración

Cuantificación de la proteína por el método de Bradford

La concentración de L-ASNasa fue determinada a partir de una curva de calibración de Albúmina de Suero Bovino (BSA). El ensayo se realizó por duplicado. El rango de concentración de las soluciones estándar de

BSA fue de 0.002 mg/ml a 0.02 mg/ml. La solución problema se preparó con 10 µl de proteína dializada y 990 µl de agua. A todas las soluciones se les agregó 300 µl de reactivo de Bradford. Se les dejó reposar por 15 minutos. Finalmente se leyeron las absorbancias a 600 nm en espectrofotómetro (Eppendorf biophotometer) y se generó la curva de calibración.

RESULTADOS

Electroforesis SDS-PAGE

Se mostró la presencia de la Asparaginasa en el gel, así se pudo determinar el peso molecular de la proteína. En este gel podemos observar el peso de la subunidad alfa que es de 18 kDa y la subunidad beta de 13 kDa. Sin embargo la banda de 13 kDa no se observa muy bien debido a que hubo mal manejo de corrida aumentando el voltaje de la misma y quedando no muy definida la banda. A pesar de ello, este resultado es similar al reportado por Guzmán-Rodríguez y col., 2014, concluyendo que la proteína que trabajamos es la de interés. Por otro lado, se observó la casi nula presencia del precursor de 32 kDa debido a que la proteína se hidrolizo ya que la proteína permaneció en incubación a 37°C por un mes.



Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las muestras de inducción y proteína purificada.

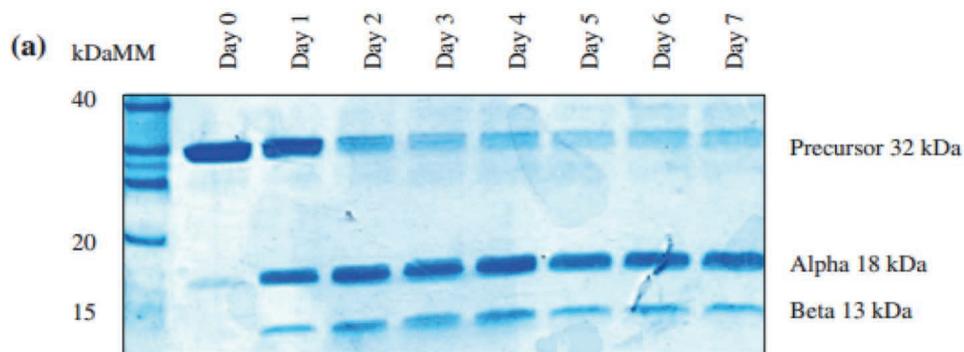


FIGURA 2. Gel de corrida de asparaginasa (Guzmán-Rodríguez y col.)

CONCLUSIONES

L-ASNasa se ha utilizado para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA). En este trabajo se pudo expresar la proteína y se pudo purificarla después. Actualmente siguen las investigaciones sobre la producción de la proteína L-ASNasa. Posteriormente se determinaría la actividad enzimática de la proteína, sin embargo no se pudo desarrollar por falta de tiempo. El siguiente paso es utilizar la proteína en líneas celular de linfoblastos.

BIBLIOGRAFIA

José Carlos Jaime Pérez, David Gómez Almaguer (2015). "Hematología. La sangre y sus enfermedades", McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V.

BALLON COSSIO (2014). "L-Asparaginasa, un arma de doble filo pero de vital importancia" en Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, No. 1, pp. 24-28. Consultada en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752014000100007 (fecha de consulta 15-07 2017).



AMERICAN CANCER SOCIETY (2016). ¿Qué es la leucemia linfocítica aguda? Obtenido de <http://www.cancer.org/espanol/cancer/leucemialinfociticaagudaadultos/guiadetallada/leucemialinfocitica-aguda-adultos-what-is-what-is-a-l-l>

Guzmán-Rodríguez, M. Serna-Domínguez, M. & Santos, L. (2014). Identification, heterologous expression and detection of enzymatic activity of an asparaginase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *informa healthcare*, 32, 295-301.

EVALUACIÓN DEL METABOLISMO ÓSEO EN RATAS WISTAR CON DIABETES EXPERIMENTAL

Ramírez-Chan Irasema Sacnicté 1 Rodríguez-Miranda Esmeralda 2 Herrera-Pérez Gabriel 3

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad caracterizada por la deficiencia de la acción de insulina, se relaciona a variaciones del metabolismo de carbohidratos. En estudios recientes se ha demostrado que la insulina estimula la secreción de osteocalcina por los osteoblastos la cual a su vez estimula las células β del páncreas, células del tejido adiposo, hígado y músculo regulando de esta manera los niveles de glucosa en sangre. En este trabajo se utilizó un modelo de Diabetes Experimental (DE) para la medición de osteocalcina. Los resultados demuestran que en las ratas con DE el nivel de osteocalcina (239 ± 36 pg/mL) fue menor al control (338 ± 36 pg/mL). Palabras clave: Osteocalcina, diabetes experimental, alloxana, metabolismo óseo, termogravimetría

ABSTRACT

The diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by a deficiency of the action of insulin is related to change in the metabolism of carbohydrates. Recent studies have shown that insulin stimulate osteocalcin secretion by the osteoblast which in turn stimulates the β cells of pancreas, adipocyte tissue, liver and muscle regulating glucose blood levels in the body. In this work we use an experimental diabetes (DE), model. Our results show DE rats osteocalcin levels (239 ± 36 pg/ml) was lower than the control (338 ± 36 pg/ml). These data support the hypothesis osteocalcin participates in glucose metabolism.

Keywords: Osteocancin, experimental diabetes, alloxan, mineral metabolism, termogravimetric

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM), cuarta causa de muerte en los países desarrollados, constituye una amenaza creciente para la salud mundial, en México es la segunda causa de muerte de acuerdo a las cifras del INEGI del 2014. La DM describe un desorden metabólico multifactorial caracterizado por una hiperglucemia crónica consecuencia de defectos en la secreción y/o en las acciones de la insulina (Sacks et al.2011). De acuerdo a la Sociedad Americana de Diabetes (ADA), la DM está clasificada en tres categorías principales: Diabetes tipo I (DM1), la tipo 2 (DM2), y la tercera categoría (DM3) se refiere otros tipos específicos de la enfermedad causadas por defectos genéticos, endocrinopatologías, entre otros (Sacks et al., 2011). Actualmente, el número de pacientes con DM se incrementa notoriamente cada año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 382 millones de personas con DM, una cifra poco exacta ya que existen miles de personas que padecen la enfermedad y no saben que la tienen. México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en DM, siendo la DM2 la más frecuente teniendo 90% de los casos (Radenković, Stojanović, & Prostran, 2015). De los 13 millones que padecen esta enfermedad sólo el 25% tiene algún tipo de control metabólico, De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012 la prevalencia de DM diabetes paso de 9.2% en el 2012 a 9.4% para el 2016. El costo total de la DM en México paso de 2, 970 millones de pesos en el 2003 a 8, 836 millones para el 2010.

1 Departamento de Biología, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Irapuato - Silao Kilómetro 12.5, Centro, 36821 Irapuato, Gto., México. isacnicté@hotmail.com

2 Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato Campus León. Aquiles Serdán 924 Col Obregón CP 36200-. León Gto. Mexico.

3 Departamento de Materiales, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Irapuato - Silao Kilómetro 12.5, Centro, 36821 Irapuato, Gto., México. gaherrera@itesi.edu.mx

Relación del esqueleto y la DM

La remodelación ósea, es el proceso biológico en el que el tejido óseo es destruido por los osteoclastos y renovado por los osteoblastos, este proceso es dependiente en gran medida por el gasto energético del organismo, se ha visto que en la anorexia nerviosa y la DM se encuentran asociadas con la osteoporosis y la pérdida ósea (Ferron & Lacombe, 2014). El vínculo entre el esqueleto y la DM es la osteocalcina (Ferron & Lacombe, 2014). la osteocalcina favorece la proliferación de células β y adipositos. Lee et al., 2007 establece que el esqueleto ejerce una regulación endócrina del metabolismo energético, lo cual contribuye a la aparición de trastornos metabólicos.

Los huesos están compuestas por matrices de nanocompuestos, principalmente nanocristales de hidroxiapatita en una matriz rica de colágeno, especializados en dar soporte mecánico y como reserva de minerales, en particular calcio y fosfato. El mineral óseo está compuesto principalmente por hidroxiapatita y una parte proteica de colágeno. El colágeno actúa como base en la cual diminutos cristales planos de hidroxiapatita se unen para formar el hueso. De manera similar, la hidroxiapatita en el mineral del hueso está en forma de nanocristales de dimensiones entre $4 \times 50 \times 50$ (nm) (Bernabéu Martínez et al., 2006). El principal papel de los minerales es dotar de dureza y rigidez al hueso, mientras que el colágeno lo dota de resistencia a la tracción y

flexión. Por otro lado, la formación del hueso es un proceso estrictamente regulado que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, el crecimiento, la remodelación y la reparación de fracturas. En condiciones fisiológicas el hueso se encuentra en constante renovación o remodelación gracias a la acción coordinada de los osteoblastos que son los responsables de la síntesis y mineralización de la matriz ósea y de los osteoclastos cuya función es la de reabsorber la matriz ósea liberando el calcio a la sangre. La remodelación ósea es un proceso dependiente en gran medida por el gasto energético del organismo, se ha visto que en patologías como la anorexia nerviosa y la DM se encuentran asociadas con la osteoporosis y la pérdida ósea (Ferron & Lacombe, 2014). El vínculo entre el esqueleto y la DM es la osteocalcina (Ferron & Lacombe, 2014).

La Osteocalcina es una proteína secretada por los osteoblastos la cual, tiene una función hormonal (Lee NK 2009). Actúa sobre las células β pancreáticas para aumentar la secreción de insulina en el músculo y el tejido adiposo blanco para promover la homeostasis de la glucosa (Ferron, et al 2014). En 2007, Lee et al 2007, sugirieron que en ratones, la osteocalcina actúa como la hormona que afecta la sensibilidad de la insulina y el gasto de energía. Se reportó que la osteocalcina mejora la tolerancia a la glucosa mediante el aumento de la proliferación de células β y la expresión y secreción de insulina. Estos mismos autores también demostraron que la osteocalcina, aumenta la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos y la expresión de adiponectina, protegiendo de esta manera a los ratones de la adiposidad (Mathieu Ferron, Jianwen Wei, Tatsuya Yohizawa, Patricia Ducy, 2011).

Muchas complicaciones de la DM2 están producidas por la acumulación de los productos finales de la glicación avanzada (PFGA), que se generan a partir de la glicación química no enzimática de los grupos amino de las proteínas y que se acumulan en diversos tejidos, incluyendo el hueso, en función del tiempo y la concentración de glucosa. Sin embargo, aunque se presume que los PFGA acumulados en el tejido óseo de las personas con DM2, los datos muestran que el aumento de los PFGA en el hueso de estos pacientes es escaso y por lo tanto se desconoce la razón de la fragilidad del esqueleto en pacientes con DM2.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se cuantifico el nivel de osteocalcina en el suero para evaluar el metabolismo óseo en las ratas Wistar con DE, así como cuantificar el nivel de osteocalcina en las ratas con DE, comparar parámetros macroscópicos del fémur de las ratas Wistar con DE y sin DE, mediante esta forma hacer la caracterización del fémur mediante, análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).

MÉTODOS Y MATERIALES

Los animales utilizados en este trabajo fueron tratados de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, correspondiente a técnicas experimentales (analgesia y anestesia), administración de fluidos y sustancias así como métodos de eutanasia de los animales empleados, así como especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio utilizados para la investigación científica.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas (11machos y 11hembras) de la cepa Wistar, con un peso promedio de $193.5g \pm 37$, se mantuvieron bajo condiciones estándar; ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de $22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Se les proporciono agua y alimento ad libitum. Los animales de experimentación fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición, de la División de Ciencias de la Salud, Campus León, de la Universidad de Guanajuato.

Inducción de DE. De acuerdo con Figueroa G., Pérez H., & Mejía Z., 2013 se realizó la inducción de DE mediante la administración vía intraperitoneal de 200mg de Alloxana/Kg de peso corporal. Se registró el peso y nivel de glucosa de los grupos previo a la inducción y posteriormente de forma semanal. Se consideraron ratas con DE aquellas que presentaron >200 mg/dl de glucosa, para la determinación de glucosa se utilizó un glucómetro (71361-80 Monitor FreeStyle Optium Neo).

Obtención de suero. Después de tres semanas de la inducción de DE se obtuvo una muestra de sangre mediante punción cardiaca. Los animales se anestesiaron con Pentobarbital sódico (xxx) (0.3-04ml) siguiendo a la NOM-062-ZOO-1999. La sangre obtenida se centrifugo a 3500 rpm de 3 a 5 minutos, posteriormente el sobrenadante (suero) se volvió a centrifugar a 5000 rpm. Con el suero (sobrenadante) se hicieron alícuotas de 200 μ L y se almaceno a $-20^{\circ}C$ para su uso posterior.

Cuantificación de osteocalcina. Se cuantifico el nivel de osteocalcina con un kit para ratas (Rat ucOC(Undercarboxylated Osteocalcin ELISA Kit) el cual se leyó en un lector de microplacas, utilizando el sistema de captura de imágenes Gen 5TM(Microplate Data Collection and Analysis Software).

Diseción y limpieza del fémur. Después de haber obtenido la sangre por punción cardiaca se realizó la diseción de los fémures (izquierdo y derecho de cada rata), se eliminó todo el tejido con tijeras y pinzas, evitando dañar la superficie del hueso posteriormente se utilizaron escarabajos del Orden Coleóptera de la Familia Dermestidae para limpiar los fémures de las ratas evitando utilizar algún tratamiento químico o enzimático, que pudiera dañara la composición química de la superficie del hueso.

Registro de parámetros macroscópicos. Una vez limpios los fémures, se procedió a registrar el peso, longitud total, diámetro de la epífisis superior e inferior, diáfisis y del cuello, utilizando un vernier digital así como también se utilizó el software para la captura de fotografías y verificación de las medidas de previamente realizadas con el vernier.

Análisis químico de los huesos

Análisis termogravimétrico (TGA). Mediante el análisis TGA se usó para caracterizar las propiedades físicas y químicas de los huesos, en función de la temperatura en una atmósfera controlada de forma precisa. Los instrumentos comerciales empleados en termogravimetría constan de: una balanza analítica, un horno, un sistema de gas purga para proporcionar una atmósfera inerte y un microprocesador/microordenador para el control de instrumento, así como la adquisición y visualización de datos (Skoog Douglas A. et al, 2001).

Análisis Térmico Diferencial (DTA) Mediante esta técnica se identificó el tipo de proceso térmico cuando hay cambio de temperatura controlada que actúan sobre una muestra.

RESULTADOS

Se obtuvo un grupo de ratas con DE cómo se reportó en la literatura. El peso del grupo control fue de 263.66 ± 84.75 , mientras que el grupo con DE mantuvo un peso de $193.5g \pm 37$, el peso del grupo con DE fue más lento con respecto al grupo control, el nivel de glucosa que se registró para el grupo control fue de 61 ± 9 y 360 ± 64.10 mg/dl estos datos fueron obtenidos a partir de la tercer semana de inducción, para la obtención de estos datos se utilizó el modelo de Radenković et al., 2015. (ver figura 1 y 2).

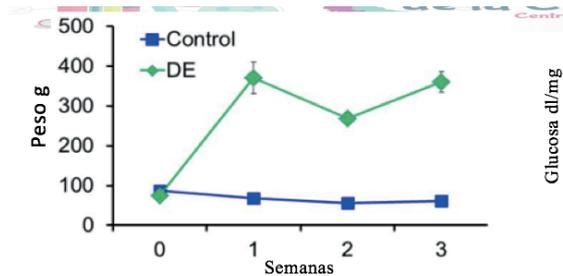


Figura 1. Peso del grupo control y grupo con DE

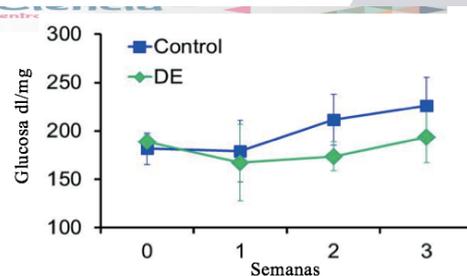


Figura 2. Niveles de glucosa del grupo control y el grupo con DE

Nuestros resultados demuestran que el nivel de osteocalcina en las ratas con DE fue de 239 ± 36 pg/mL y para el control 338 ± 36 pg/mL. El valor de osteocalcina fue mayor en el grupo control que en el grupo con DE, lo cual sugiere que la osteocalcina tiene una relación con el metabolismo de la glucosa.

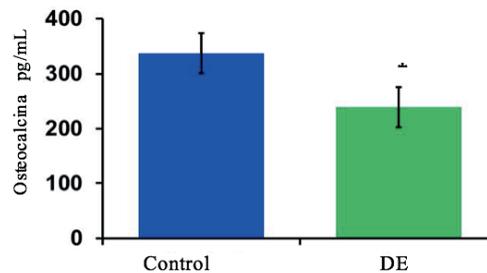


Figura 3. Nivel de osteocalcina * $P < 0.05$, $n \geq 4$

Se obtuvieron los fémures (izquierdo y derecho) del grupo control y el de las ratas con DE, sin embargo los datos indicaron que no hubo una diferencia significativa en los parámetros macroscópicos del fémur entre los dos grupos (datos no mostrados).

De acuerdo a los análisis de TGA, la máxima velocidad de pérdida de peso fue a 340°C en ambos casos, sin embargo el grupo con DE solo perdió el 26.23 % mientras que el control el 35.23%. El análisis por DTA no muestra diferencias en el proceso de calcinación entre ambos grupos (ver figura 4 y 5).

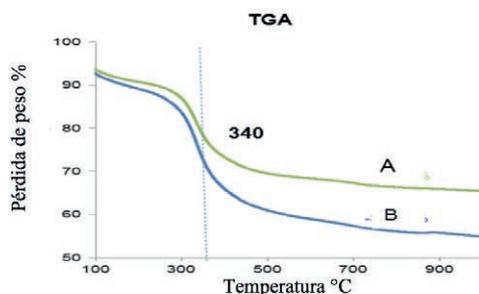


Figura 4. Termograma. A) se observa una pérdida de peso de 26.23% para el grupo con DE. B) Pérdida de peso de 35.23% grupo control

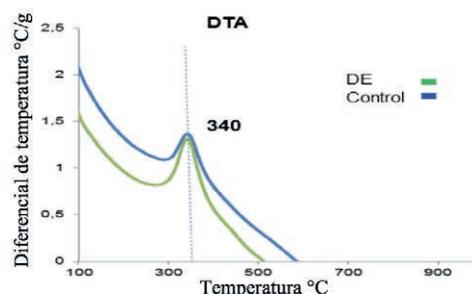


Figura 5. Termograma. Se observa una reacción exotérmica por parte de la muestra, a partir de los 340°C .

CONCLUSIONES

Se observó una diferencia de ~100 pg/ml de osteocalcina entre el grupo control y el grupo con DE. De acuerdo al análisis macroscópico no mostrarán diferencias significativas entre ambos grupos. De acuerdo a los análisis de TGA, la máxima velocidad de pérdida de peso fue a 340 °C en ambos casos, sin embargo el grupo con DE solo perdió el 26.23 % mientras que el control el 35.23%. El análisis por DTA no muestra diferencias en el proceso de calcinación entre ambos grupos.

AGRADECIMIENTOS

MVZ Ana Cristina Araiza Martínez (Responsable de Bioterio) y Miriam Guzmán Salas (personal operativo). División de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato. Dra. Rebeca Monroy Torres. Laboratorio de nutrición ambiental y seguridad alimentaria LANAySA. Brayan Israel Lira Gutiérrez. Licenciatura en Médico Cirujano Universidad de Guanajuato. Dr. Francisco Alejo Iturbide, Departamento de Biología, ITESI.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernabéu Martínez, E., López-Oliva Muñoz, F., Larena Pellejero, a., Tur Gil, a., de la Piedra Gordo, M. C., & Montero Escobar, M. (2006). Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados Bone composition study for an appropriate regeneration with implanted materials. *Fundación Mapfre*, 202–207.
- ENSANUT. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Encuesta, 2006(figura 2), 3–6.
- Ferron, M., & Lacombe, J. (2014). Regulation of energy metabolism by the skeleton : Osteocalcin and beyond. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, 137–146. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.022>
- Figueroa G., M. C., Pérez H., I., & Mejía Z., R. (2013). Characterization of a type 2 diabetes model in female Wistar rats. *Revista MVZ Córdoba*, 18(3), 3699–3707. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4687628&info=resumen&idioma=ENG>
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., ... Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton, 456–469. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047>
- Mathieu Ferron, Jianwen Wei, Tatsuya Yohizawa, Patricia Ducy, and G. K. (2011). Method, AN Elisa-based Quantify, T O Mice, Carboxylation I N, (212). <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.008>.AN
- Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2015). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13–31. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Kirkman, M. S., ... Nathan, D. M. (n.d.). Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. <http://doi.org/10.2337/dc11-9998>
- Skoog Douglas A., Jamene Holler F, N. T. A. (2001). Principios De Análisis Instrumental.Pdf. (F.-M. Concepción, Ed.) (Quinta Edi). Madrid.

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES EN MUESTRAS DE AGUA DE BEBEDEROS DE ESCUELAS PÚBLICAS DEL MUNICIPIO DE IRAPUATO.

Fernanda Gómez Páramo , Francisco Alejo Iturvide , Maria Azucena Márquez Lucio

RESUMEN

En los últimos años, algunas organizaciones han implementado un programa de bebederos de agua potable en las escuelas del país. Este programa se ha implementado en Irapuato y ya se cuenta con varias las escuelas beneficiadas, aunque el funcionamiento no es muy eficiente, así como el mantenimiento. Sin embargo, otras escuelas de Irapuato, que no han sido beneficiadas con este programa, cuentan con bebederos, pero también carecen de mantenimiento y su funcionamiento en ocasiones es deficiente. Además, en varias escuelas con este servicio se han presentado casos de niños enfermos, esto causado por el consumo del agua abastecida mediante estos sistemas. El objetivo de este trabajo es evaluar la calidad del agua de 6 escuelas públicas de Irapuato, realizando un análisis microbiológico y buscando como principales indicadores de contaminación a Bacterias Coliformes, a partir de muestras representativas de cada bebedero de agua potable. El análisis microbiológico de agua es una práctica que nos ayuda a conocer la carga bacteriana que se encuentra en este recurso. Este dato, específicamente de Coliformes, nos ayudará a saber si el agua de los bebederos y grifos de las escuelas es buena para su consumo.

ABSTRACT

In recent years, some organizations have been implemented a drinking water fountains program in the schools of the country. This program has been implemented in Irapuato and there are several schools benefited, although the operation is not very efficient, as well as the maintenance. Nevertheless, other schools of Irapuato, that have not been benefited with this program, have drinking water fountains, but also there have lack of maintenance and its operation is sometimes deficient. In addition, in several schools with this service there cases have been filed of sick children, this caused by the consumption of the water supplied by these systems. The objective of this work is to evaluate the water quality of six Irapuato public schools, performing a microbiological analysis and searching like main contamination indicators to Coliform Bacteria, from representative samples from each drinking water fountains. The microbiological analysis of water is a practice that helps us to know the bacterial load found in this resource. This data, specifically of Coliforms, will help us to know if the water of drinking fountains and taps of the schools is good for consumption. Palabras Clave: Bebedero, calidad del agua, Coliformes.

INTRODUCCIÓN

El agua engloba una gran cantidad de temas de discusión en cuanto a su calidad, tratamiento y consumo, es también el principal detonante de varias enfermedades en todo el mundo, teniendo como enfermedad sobresaliente a la gastroenteritis, causante de diarreas y vomito. Actualmente existen muchos problemas con la contaminación del agua, esto debido a la sobrepoblación y abuso de este recurso. más de la mitad de la población mundial consume agua contaminada con bacterias patógenas de origen fecal, causantes de enfermedades que van desde gastroenteritis leve hasta casos graves de disentería, cólera y fiebre tifoidea (Mora et al. 2012) y por falta de un tratamiento adecuado, las aguas subterráneas presentan una amenaza, ya que en muchos lugares el abastecimiento es a partir de estas aguas y el riesgo de contraer alguna enfermedad es más latente. El consumo de agua es muy promovido, hay organizaciones que implementan programas referentes a esto, por ejemplo, la instalación de bebederos en las escuelas del país, con el fin de disminuir el consumo de las bebidas azucaradas en los niños. En Irapuato hay varias escuelas que cuentan con bebederos, pero representan un riesgo de salud para los niños que consumen el agua proveniente de estos sistemas, además se han manifestado enfermedades como la diarrea debido a su consumo. El principal problema con esto es que los bebederos no cuentan con el mantenimiento adecuado, en algunas escuelas no funcionan al 100 %, en otros casos, los niños no saben utilizarlos de la forma correcta. En otras escuelas suspenden su uso por el riesgo que representan. Los principales contaminantes que se presentan en el agua son los microorganismos, y estos son de cierta forma los causantes de enfermedades. Las Bacterias Coliformes son unos de estos microorganismos, estas bacterias indican la contaminación fecal en el agua y, por lo tanto, en este trabajo se pretende encontrar a estos indicadores en el agua de los bebederos de seis escuelas de Irapuato, esto mediante el muestreo en cada una de ellas y procesando las muestras por normatividad correspondiente.

MARCO TEORICO

La técnica del Numero Más Probable (NMP) es una de las más utilizadas para el recuento de Bacterias Coliformes en agua. Los métodos para Coliformes Totales se basan en la siembra de una cantidad de muestra en tubos con Caldo Lactosado el cual contiene una campana de fermentación en la que se encontrará el gas producto de la fermentación de la lactosa a 35°C (Martínez et al. 2012). Después de este procedimiento se continua con una confirmación utilizando medios selectivos. La técnica utilizada en este trabajo es estandarizada, por lo que se da seguimiento a la norma correspondiente a la determinación (NOM-112-SSA1-1994). Para la expresión de resultados se tomará en cuenta el índice del NMP tomado tablas de referencia

en norma de acuerdo a la cantidad de muestra y concentraciones inoculadas (NOM-210-SSA1-2014).

MÉTODOS Y MATERIALES

LUGARES DE MUESTREO

Para este trabajo se eligieron seis escuelas públicas de la ciudad de Irapuato que contaran con bebederos, su distribución no es de manera equitativa debido a que son muy pocas las escuelas que cuentan con este servicio o que tienen sus bebederos en funcionamiento, debido a esto, la mitad de las escuelas seleccionadas tenían sus bebederos en funcionamiento, mientras que las otras tres escuelas contaban con funcionamiento nulo de bebederos. Sin embargo, no se descartaron pues se observó y se tomó en cuenta que los niños toman agua directamente de la llave, ya sea de los baños o de tomas alternas en el interior de la escuela y además con esa agua también se lavan las manos. Se tomaron 100ml de muestra de bebederos para las escuelas que contaban con ellos y muestras adicionales del grifo, y para las que no, se tomaron muestras del grifo en baños de niñas y niños y otra muestra de una llave adicional dentro de las escuelas.

En la Figura 1 que se presenta a continuación se pueden observar los seis sitios de muestreo. Las escuelas no se presentan con nombres, en acuerdo con cada una de ellas. Para esto se nombran con E1, E2, E3, E4, E5 y E6.



Figura 1 Sitios de muestreo en Irapuato.

Las muestras se recolectaron en frascos estériles y siguiendo las indicaciones de la norma correspondiente para este procedimiento (NOM-014-SSA1-1993)

De acuerdo a la norma para la determinación de Coliformes (NOM-112-SSA1-1994), la metodología fue la descrita a continuación.

Mediante la técnica de tubos múltiples de fermentación se inocularon los tubos con las concentraciones indicadas por norma, se incubaron a 35°C y se realizó la observación de resultados a las 24 y 48 horas, este primer paso corresponde la prueba presuntiva para Coliformes Totales. Se consideraron positivos los tubos que presentaron formación de gas. Posteriormente, se resembraron los tubos positivos en medio Bilis Verde Brillante y Medio E. C. para la confirmación de presencia de Coliformes Fecales y E. coli, se incubaron de 24 a 48 horas y se observó la formación de gas en los tubos. Los positivos se tomaron para el cálculo del NMP en 100 ml de muestra teniendo como referencia datos de tablas presentes en normatividad (NOM-210-SSA1-2014)

RESULTADOS

En la siguiente tabla se presentan los resultados de cada una de las escuelas para Coliformes, las muestras de cada una de ellas se tomaron de acuerdo a las posibilidades de estas. Como se puede ver, tres de las escuelas no fueron muestreadas en bebedero debido a que no contaban con ellos. Dos de las escuelas presentaron su valor máximo para cada una de las pruebas y para cada una de las fuentes de muestreo, esto es, >1600 NMP/100 ml.

Tabla 1 Resultados obtenidos y expresados en NMP/100 ml de muestra de cada una de las escuelas objeto de estudio.

| Escuela | | Coliformes Totales NMP/100ml | Coliformes Fecales NMP/100ml | E. coli NMP/100ml |
|---------|----------|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| E1 | Bebedero | >1600 | 210 | 24 |
| | Llave | 920 | 920 | 64 |
| E2 | Bebedero | 13 | 13 | 13 |
| E3 | Baños | >1600 | 180 | 32 |
| | Llave | 20 | 11 | 14 |
| E4 | Baños | >1600 | 210 | 24 |
| | Llave | 6.1 | 4 | <1.8 |
| E5 | Bebedero | | | |
| | Llave | | | |
| | M | | | |
| | H | >1600 | >1600 | >1600 |
| E6 | M | | | |
| | H | | | |

Para las muestras de bebedero en tres de las escuelas se encontró que el agua no es apta para su consumo ya que la presencia de Bacterias Coliformes sobrepasa los límites establecidos por las normas, aunque una de ellas muestra un valor bajo de 13 NMP/100 ml de muestra sigue siendo no apta para su consumo. Comparando, por ejemplo, los resultados en dos escuelas, tanto en bebedero como para agua de la llave, se observa que no existe una diferencia significativa en su calidad pues presentan valores cercanos o similares (véanse resultados de la escuela E1 y E5) y por lo tanto el consumo de cualquiera de las dos fuentes no es recomendable, además, estos resultados se presentan en las muestras de las fuentes abastecidas por pozos que constituyen la principal fuente de agua potable.

Actualmente, ya se cuentan con varios estudios sobre la calidad del agua potable que hacen referencia a la presencia de Coliformes, y al igual que en este trabajo, su presencia es elevada. De acuerdo a (Mora et al. 2012) y a (Sánchez et al. 2000), la presencia de Coliformes Totales, Fecales y E.coli en el agua destinada al consumo humano representa un peligro potencial para la salud humana y sugiere un tratamiento más eficiente para lograr una mejora en su calidad para que por lo tanto no represente un riesgo para los consumidores, principalmente niños.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos revelan que la calidad del agua en las escuelas es muy variada, esto se debe a que en la mayoría de estas se tenían tomas distintas, abastecimiento de agua subterránea y abastecimiento de la red pública. todos estos valores indican la presencia de contaminación fecal en el agua, y sobrepasan los límites establecidos por las normas, por lo que representa un riesgo para los niños que la consumen. Pero hay que tomar en cuenta que esa contaminación no se puede deber totalmente a las redes de abastecimiento, el mantenimiento de los sistemas de bebederos o en las tuberías influye en los resultados. Si bien los bebederos que se encontraban en funcionamiento contaban con filtros, estos no eran suficientes. Se puede establecer que a pesar de que el agua de bebedero debería presentar mejor calidad que el agua procedente de grifos, esto no es así, pues en la mayoría de las muestras se presentaron resultados similares y máximos. Todo esto sugiere un mantenimiento, tratamiento y funcionamiento eficiente para bebederos, filtros y tuberías, con el objetivo de que el agua presente una calidad que sea apta para su consumo, y que, por lo tanto, no represente un riesgo para la salud.

BIBLIOGRAFIA

MARTINEZ, A., LOPEZ, M., SEGURA, O., ORTEGA, J., FIGUEROA, U., CERVANTES, M., RUIZ, E., ALBA, J. (2012). "Microorganismos presentes en agua de bebederos de las escuelas públicas de la ciudad de Gómez Palacio, Durango causantes de gastroenteritis" en *Química Viva*, Vol. 11, No. 3, pp. 210-228. Consultada en <http://www.redalyc.org/html/863/86325090006/> (fecha de consulta 10-07-2017).

MORA, D., SANCHEZ, L., DEL RAZO, L., GONZALEZ, C., MEDINA, I., ROBLEDO, M. Y ROJAS, E. (2012). "Presencia de arsénico y coliformes en agua potable del municipio de Tecuala, Nayarit, México" en *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 28, No.2, pp. 127-135. Consultada en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200003 (fecha de consulta 17-08-2017)

SANCHEZ, H., VARGAS, M. Y MÉNDEZ, J. (2000). "Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas" en *Salud Pública de México*, vol. 42, No. 5, pp. 397-406. Consultada en <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v42n5/3990.pdf> (fecha de consulta 17-08-2017)

NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-014-SSA1-1993 "PROCEDIMIENTOS SANITARIOS PARA EL MUESTREO DE AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO EN SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO DE AGUA PUBLICOS Y PRIVADOS

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO-LIMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACION

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-201-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. AGUA Y HIELO PARA CONSUMO HUMANO, ENVASADOS Y A GRANEL. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-210-SSA1-2014. PRODUCTOS Y SERVICIOS. MÉTODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO TEMPRANO, NO INVASIVO DE CÁNCERES EN HUMANOS, MEDIANTE EL EFECTO RAMAN REALZADO POR SUPERFICIES (SERS), POR NANOPARTÍCULAS

Vela Solís, D.1; Hernández Arteaga A.2; Navarro Contreras H.R.2

1 Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera Torreón - Matamoros Km. 7.5, C.P. 27000, Torreón, Coahuila, MÉXICO; di.velasol@gmail.com

2 Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Álvaro Obregón 64, CP: 78000, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO; aida.arteaga@uaslp.mx; hnavarro@uaslp.mx

RESUMEN

Una de las causas más recurrentes de muerte en la actualidad es el cáncer en sus distintas modalidades. A pesar de que se cuenta con tecnología avanzada, varias de las técnicas de diagnóstico temprano o tratamiento resultan invasivas o dolorosas para los pacientes, por lo que con éste trabajo se busca desarrollar un método de diagnóstico de cáncer de mama que no sean invasivos para los pacientes. Aplicando el efecto SERS con nanopartículas de Ag para espectroscopía Raman, se buscó cuantificar la cantidad de ácido siálico en muestras de saliva de mujeres con probabilidad de presentar éste tipo de cáncer, para luego comparar los resultados con los de una biometría.

Palabras clave: cáncer de mama, ácido siálico, espectroscopia Raman, efecto SERS, nanopartículas

ABSTRACT

One of the most common causes of death on the actual world is cancer in its different modalities. Although the advanced technology is available, most of the techniques of early diagnosis or treatment are painful or invasive for the patients, so in this investigation seeks to develop a method of diagnosis of breast cancer that is not invasive for patients. The SERS effect with nanoparticles of Ag for Raman spectroscopy, we search to quantify sialic acid on salivary samples of women with probability of have this type of cancer, and then compare the results with those of biometry.

Key words: breast cancer, sialic acid, Raman spectroscopy, SERS effect, nanoparticles

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los casos de cáncer en el mundo han aumentado considerablemente en los últimos años, siendo el de mama uno de los más frecuentes (Marie-Knaul et al., 2009). Las numerosas muertes que se dan cada año debido a esta causa, podrían evitarse si se realizara un diagnóstico temprano.

Para prevenirlo o diagnosticarlo antes de que se vuelva un problema grave, existen diferentes métodos como los ultrasonidos, mamografías, imágenes de resonancia o biopsias, pero cada uno de ellos presenta limitaciones frente a varios factores (Tabla 1), por lo que se ha buscado implementar otro tipo de técnicas que optimicen la detección de ésta enfermedad y sean menos invasivos para los usuarios.

Tabla 1. Métodos de detección oportuna de cáncer de mama.

| Método | Sensibilidad y especificidad | Beneficios | Limitaciones |
|----------------------|---|---|--|
| Mastografía | Sensibilidad: 77 a 95 %, con un rango de 54 a 58% entre las mujeres menores de 40 años Especificidad: 83.61% | <ul style="list-style-type: none"> • Detecta abultamientos de 2 mm. • Contribuye a la disminución de la mortalidad por cáncer de mama | <ul style="list-style-type: none"> • 10% de falsos negativos en mujeres de entre 50 y 69 años, y de 25% en mujeres de entre 40 y 49 años • De 7 a 8 % de falsos positivos en mujeres de entre 40 a 59 años y de 4 a 5% en las de 60 a 79 años. |
| Ecografía | Sensibilidad: 97.61% Especificidad: 91.49% | <ul style="list-style-type: none"> • Valora estructura interna en múltiples planos. • Efectivo en mamas de predominio graso o denso. | <ul style="list-style-type: none"> • Es recomendable usarla como técnica complementaria. |
| Análisis clínicos | Sensibilidad: 40 a 69% Especificidad: 88 a 99% | <ul style="list-style-type: none"> • Detecta abultamiento de hasta 2 mm. • Puede detectar cánceres que la mastografía no. | <ul style="list-style-type: none"> • Puede provocar la realización de biopsias complementarias. |
| Resonancia magnética | Sensibilidad: 78 % aprox. Especificidad: 30 a 95% | <ul style="list-style-type: none"> • No hay compresión de los senos | <ul style="list-style-type: none"> • La radiación puede provocar alteraciones en células sanas. • Es costoso. • Son tardadas |

Fuente: *Elaboración propia.* Cuadro en el que se hace una comparación entre las ventajas, desventajas y confiabilidad de algunas de las técnicas de detección temprana de cáncer de mama.

Una de ellas ha sido aplicar el uso de espectroscopia Raman amplificada por resonancia superficial (SERS por sus siglas en inglés Surface-enhanced Raman Scattering) la cual se fundamenta en la detección de la estructura molecular de analitos a muy bajas concentraciones (Ortiz, 2014) aplicándola en muestras biológicas, como la saliva, implementando nanopartículas metálicas. Los avances en el desarrollo de nanopartículas han permitido orientar su uso al área médica y contribuir a la detección e incluso cura de enfermedades letales como el cáncer. Las nanopartículas son útiles para éste fin debido a su estabilidad, tamaño (miden entre 1 a 100 nm), relación con el agua, por el tiempo que pueden permanecer dentro del cuerpo y que pueden llegar a los lugares más recónditos de él, además de su funcionalidad (Perfézou et al., 2012).

La técnica con nanopartículas en este caso tiene como función amplificar la intensidad de las señales del compuesto de interés. La aplicación de la técnica SERS está directamente relacionada con las propiedades morfológicas y superficiales de los metales empleados (García & Sánchez, 2005). La reducción del tamaño y la dimensionalidad de los metales son factores fundamentales en las propiedades electrónicas ya que al disminuir el tamaño, también disminuye la escala de longitud espacial del movimiento electrónico (Ortiz, 2014).

METODOLOGÍA

Se utilizaron 10 muestras de saliva de pacientes voluntarios del hospital de Soledad, San Luis Potosí, las cuales fueron lavadas en la centrífuga durante 10 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante fue extraído y transferido a nuevos viales para su análisis.

Síntesis de nanopartículas.

Para la síntesis de nanopartículas (NPs), se prepararon dos soluciones de 100 mL; una de citrato trisódico y otra de AgNO_3 . Ésta última se calentó a 90°C en una placa de calentamiento cuidando de subir la temperatura poco a poco. Después se agregó la solución de citrato, todo esto mientras las soluciones eran mezcladas por un agitador magnético. Se dejó enfriar la solución resultante a temperatura ambiente. Para el lavado de las NPs, se centrifugó la solución en una mini centrífuga Thomas Scientific modelo C1008-R, repartiéndola en viales. Se hicieron 2 lavados por cada vial. Se desechó el sobrenadante y el precipitado resultante de cada uno fue vertido dentro de un vial pequeño de vidrio. Debido a que las NPs estaban muy concentradas, se diluyeron poniendo 1 mL de éstas en un tubo Eppendorff y se agregaron 10 mL de agua desionizada, sometiendo al baño ultrasonificado Branson 1-291 por unos segundos, para obtener una mezcla homogénea. Se puso cada muestra en celdas Malvern código zen0118, la técnica empleada fue DL con el software Zetasizer para identificar el tamaño y estabilidad de la muestra.

Se utilizaron sustratos de silicio como base para las observaciones en microscopio SERS.

Espectroscopia Raman.

Se calibró con silicio y con soluciones de 50, 20, 15, 10 y 1 $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ de ácido siálico, utilizando el láser verde de 532 nm. Se colocaron las nanopartículas y cada solución de ácido siálico en los orificios de un portaobjetos de aluminio, en proporciones de 2:1.

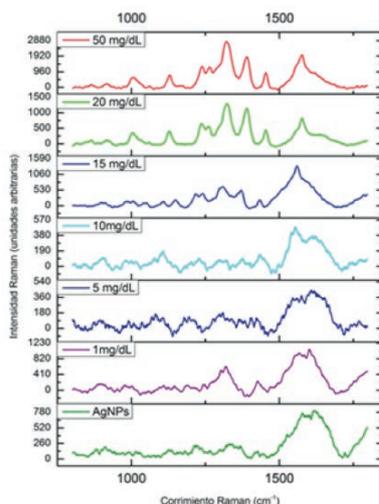
De igual manera, cada muestra de los pacientes fue colocada en el portaobjetos en las mismas proporciones en que se realizó la calibración para luego comparar las intensidades con respecto a las obtenidas de las concentraciones del ácido siálico.

RESULTADOS

Al finalizar la elaboración de las nanopartículas, el software Zetasizer indicó que existía una polidispersión muy pronunciada entre ellas, con un tamaño promedio de entre 5 y 10 nm. Poseían un potencial Z de 128 mV, resultado que sí era lo esperado, ya que el valor que indica una estabilidad muy aproximada a la adecuada de las partículas que es de 130 mV.

Una vez que se contó con los resultados de la espectroscopia Raman, se utilizó el programa VancouverRamanAlgorithm para dejarlos libres de fluorescencia y posteriormente, introducir los datos al software Origin 8.6. nes frente a varios factores (Tabla 1), por lo que se ha buscado implementar otro tipo de técnicas que optimicen la detección de ésta enfermedad y sean menos invasivos para los usuarios.

Fig. 1 Espectro Raman para calibración con ácido siálico.



Para ésta técnica, se toman en cuenta 3 picos importantes de intensidad Raman a 1001, 1237 y 1391 cm^{-1} , ya que son los que distinguen al ácido siálico de otros compuestos existentes dentro de las muestras. Al calibrar con las concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 50 $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ se elaboraron los espectros Raman (Fig. 1) y se tomaron los valores mayores a dichas intensidades para ajustarlas (Figs. 2, 3, 4).

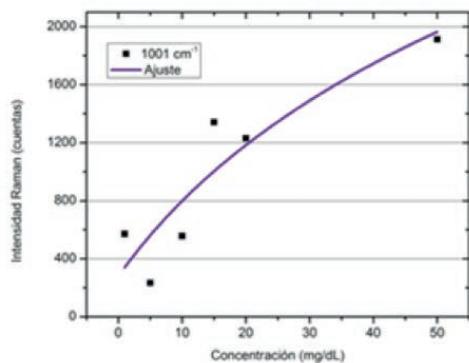


Fig. 2. Ajuste de intensidad Raman en el pico 1001 cm^{-1}

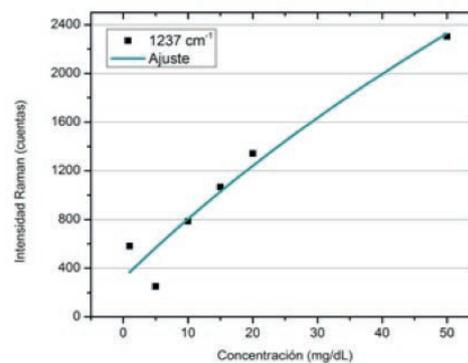


Fig. 3. Ajuste de intensidad Raman en el pico 1237 cm^{-1}

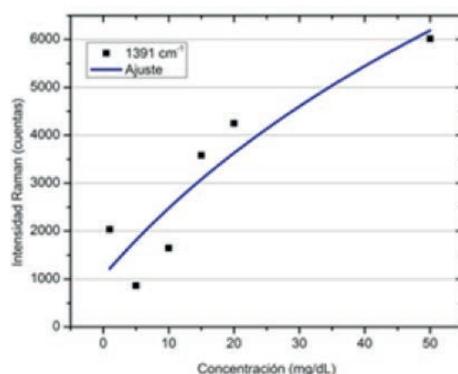


Fig. 4. Ajuste de intensidad Raman en el pico 1391 cm^{-1}

Se compararon los resultados de intensidad Raman de los pacientes con los datos de ajuste, para luego calcular el promedio de concentración de ácido siálico en cada una de las muestras (Tabla 2) y determinar si poseen una cantidad normal o anormal de dicho compuesto en su organismo. De acuerdo con Hernández y sus colaboradores (2016) concentraciones mayores a 7 mg/dL se consideran resultados positivos al cáncer.

Tabla 2. Promedio de concentración de ácido siálico en muestras de saliva.

| Paciente | Promedio de concentración de ácido siálico (mg/dL) |
|----------|--|
| 1 | 5.46 |
| 2 | 1.16 |
| 3 | 1 |
| 4 | 44.42 |
| 5 | 23.59 |
| 6 | 44.73 |
| 7 | 50 |
| 8 | 50 |
| 9 | 50 |
| 10 | 35.28 |

De acuerdo con los resultados, 7 de las 10 pacientes podrían presentar cáncer de mama (resaltados en color verde en la Tabla 2). Es necesario aclarar que las elevadas concentraciones de ácido siálico también están asociadas a otro tipo de enfermedades, por lo que aún es necesario contar con más información acerca de los antecedentes médicos de cada persona para tener mayor confiabilidad en los resultados y el porcentaje de falsos positivos sea menor.

CONCLUSIONES

La medición de la concentración de ácido siálico en los fluidos corporales de las personas, puede ser un indicador importante de que hay alguna alteración en su organismo, como el cáncer. Al ser posible medirlo en fluidos fáciles de muestrear, como la saliva, resulta un método efectivo de diagnóstico no invasivo. A largo plazo, podría perfeccionarse la técnica para que sea más específica y no se necesite del apoyo de otro método para confirmar los resultados.

REFERENCIAS

Marie-Knaul F, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pub Mex.* 51(2):S355-S344 <https://pdfs.semanticscholar.org/9b0d/5e07d649ecddf35f86b663a96497a3337ae0.pdf>

Perfèzou, M., Turner, A., & Merkoçi, A. (2012). Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2606-2622. <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=00d2f329-ce03-4525-b1d5-a9f32a4789f5%40sessionmgr101>

Pájaro Cab stro, Nerlis; Olivero Verbel, Jesús; Redondo Padilla, Juan; (2013). Nanotecnología aplicada a la medicina. *Revista Científica Guillermo de Ockham*, Enero-Junio, 125-133. <http://www.redalyc.org/html/1053/105327548010/>

Ortiz, DLC. (2014). Identificación no inavisva de sustancias biológicas por medio de espectroscopía Raman. https://www.researchgate.net/profile/Luis_Carlos_Ortiz-Dosal/publication/268576949_Identificacion_no-invasiva_de_sustancias_biologicas_por_medio_de_espectroscopia_Raman/links/5470dad80cf216f8cfad0a00/Identificacion-no-invasiva-de-sustancias-biologicas-por-medio-de-espectroscopia-Raman.pdf

García-Ramos, J. V., & Sánchez-Cortés, S. (2005). Espectroscopía vibracional sobre nanoestructuras metálicas (SERS y SEIR): nuevos sustratos y aplicaciones. *Langmuir*, 21, 8546. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/2678/1/SERS.pdf>

Hernández, A, Navarro, C, Zermeño, C, Kolosovas, M, José, Y, Velázquez, S, Vinogradova, E. (2016) Diagnosis of Breast Cancer Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy to detect Sialic Acid Concentrations in Human Saliva. México

*Para tabla de ventajas y desventajas

Maita Quispe, F, Fernandez, L., Luis, J., Panozo Borda, S. V., Muñoz Galind, L., Gutiérrez Flores, C., & Zegarra Santiesteban, W. (2012). Valor diagnóstico de la ecografía y la mamografía en pacientes con neoplasias de mama del Hospital Obrero N° 2 de la Caja Nacional de Salud. *Gaceta Médica Boliviana*, 35(2), 59-61.

del Pilar, L. (2007). Cáncer de mama. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 45(2), 157-166. <http://bvs.insp.mx/articulos/5/35/Deteccioncancer-Feb10.pdf>

GENERACIÓN DE MUTANTES EN EL HONGO PATÓGENO *Sporothrix schenckii*

Daniela Itzel Sandoval Amézquita¹ y Héctor Manuel Mora Montes²

RESUMEN

La esporotricosis es una enfermedad crónica infecciosa de tipo micótica que afecta a humanos y a animales. Por muchos años, ésta micosis subcutánea ha sido atribuida a un único agente etiológico; sin embargo, se conoce ahora un complejo de al menos cuatro especies patógenas, incluida *Sporothrix schenckii*; por lo cual ha sido de importancia estudiar la composición de la pared celular para determinar y mejorar el diagnóstico clínico y su tratamiento. En el siguiente reporte se describe el trabajo experimental realizado en el hongo *S. schenckii* para implementar la modificación de un gen que codifica para la Gp70, glicoproteína de la pared celular importante en la virulencia del hongo, mediante el sistema CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

The sporotrichosis is chronic fungal infectious disease that affects humans and animals. For many years, this subcutaneous mycosis had been attributed to a single etiological agent; however, it is now known a complex of at least four pathogenic species, including *Sporothrix schenckii* by which has been important to study the composition of the cell wall to determine and improve the diagnosis clinically and its treatment. The following report describes the experimental work carried out in the fungus *S. schenckii* to implement the modification of a gene that encodes for the Gp70, glycoprotein of the important cell wall in the virulence of the fungus, by CRISPR/Cas9 system.

Palabras Clave: *Sporothrix schenckii*, glicoproteína, pared celular, CRISPR/Cas9.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Sporothrix schenckii* es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea endémica en América Latina, cuya prevalencia ha aumentado significativamente durante los últimos años principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Este hongo es dimorfo con una fase micelial y una fase de levadura. In vitro, sus fases pueden obtenerse dependiendo de la temperatura y pH que se emplee en su cultivo, a 25°C y pH ácido se manifiesta su forma micelial; mientras que a 37°C y pH básico se transforma en su forma patógena, como levadura.

La capacidad de un microorganismo para adherirse a los tejidos y las células del huésped es fundamental para la colonización y la difusión. La adhesina importante descrita en la pared celular de *S. schenckii*, glicoproteína 70, se ha demostrado para mediar la unión de las células de levadura para la matriz dérmica y fibronectina. Gp70 también juega un papel fundamental como un antígeno, que puede modular la respuesta inmune de huésped.

Agrobacterium tumefaciens y sus especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero. Desde años atrás se ha venido estudiando en detalle el mecanismo por el cual *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en plantas y el conocimiento adquirido ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Así mismo, esta interacción ha dado pie a formular modelos de señalización celular, transporte célula a célula, importe nuclear de proteínas y ADN y mecanismos de integración genómica.

En un trabajo previo fue realizada la extracción de ADN de *S. schenckii* y la región de interés fue flanqueada por iniciadores diseñados específicamente para el gen a analizar. El fragmento amplificado se insertó en pSilent. Después el inserto se ligó al vector de mantenimiento pJet, para posteriormente ser ligado en pBgGHg y así transformar a *Agrobacterium* y desde ahí indujo la mutación en el hongo. Sin embargo, nuestro trabajo se encargó de implementar el sistema CRISPR/Cas9, para llevar a cabo un mutación del hongo que involucraba a la glicoproteína 70, la cual forma parte de la pared celular de *S. schenckii*.

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés), junto con la endonucleasa Cas, forman el complejo CRISPR/Cas. Debido a su actividad como endonucleasa y capacidad de reconocimiento en secuencias específicas, el sistema CRISPR/Cas se ha aprovechado en la ingeniería genética para activar genes, reprimirlos, inducir mutaciones puntuales y cambiar secuencias mediante recombinación homóloga.

MARCO TEORICO

El hongo *Sporothrix schenckii* es el agente etiológico de la esporotricosis, que por muchos años, ésta micosis subcutánea ha sido atribuida a un único agente etiológico; sin embargo, se conoce ahora un complejo de al menos cuatro especies patogénicas, incluidas *Sporothrix schenckii sensu stricto* y *Sporothrix brasiliensis*.

Algunos informes indican que las diferencias en las formas clínicas de la esporotricosis son debidas a trastornos inmunológicos de hospedador, ya que estos determinan el grado de invasión fúngica. Las proteínas presentes en la pared celular de *S. schenckii* así como de otros hongos similares, se involucran con la patogenicidad del hongo debido a que inducen respuestas inmunes anómalas; por lo cual ha sido de importancia estudiar la composición de la pared celular para determinar y mejorar el diagnóstico clínico y su tratamiento. La pared celular es la envoltura superficial de la célula fúngica y desempeña un papel central en la interacción huésped-patógeno, mediando así diversos procesos asociados con la patogénesis de estos microorganismos. La pared celular de *S. schenckii* consta de glucanos alcali-solubles y alcali-insolubles en ambas fases morfológicas. Otros factores de virulencia conocidos de *S. schenckii* son enzimas extracelulares, adhesinas y melanina. La adhesina importante descrita en la pared celular de *S. schenckii*, es la glicoproteína Gp 70.

El sistema CRISPR/Cas se descubrió en las bacterias como un mecanismo de defensa inmune, ya que al infectarse éstas añaden ADN de patógenos entre secuencias palindrómicas repetidas, generando al transcribirse un ARN llamado ARNcr. Al llevarse a cabo una segunda infección, el ARNcr acoplado con Cas reconoce el transcrito del patógeno y Cas degrada al ARNm de manera análoga al ARN de silenciamiento (ARNsi). Gracias a su capacidad de reconocimiento en secuencias específicas y a su actividad como nucleasa, este sistema ha revolucionado la ingeniería genética.

MÉTODOS Y MATERIALES

Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

S. schenckii.- Para obtener fase micelial se llevaron a cabo cultivos en placas con medio YPD ajustado a pH 4.5 a una temperatura de 28°C. Para su fase de levadura, se utilizó medio líquido YPD pH 7.8.

A. tumefaciens.- Se realizaron cultivos en medio LB, adicionando antibióticos a los que se presentaban resistencia (ampicilina, ampicilina+kanamicina), esto dependiendo de la cepa utilizada.

Ligación de oligos sgRNA en CRISPR/Cas U6-1 y U6-2

En un trabajo previo se realizó la preparación y alineación de los tres oligos sgRNA con los que se contaban, luego se procedió a la ligación con las siguientes condiciones y se incubaron a 37°C por 3 horas: buffer 1 µl, enzima ligasa 1 µl, oligos 1 µl (1, 2, 3), vector 2 µl U6-1 y 3 µl U6-2 según sea el caso, aforando con H₂O hasta un volumen final de 10 µl.

Extracción de DNA genómico

Se siguió el protocolo utilizando perlas de extracción, centrifugando e incubando en hielo según lo descrito en la metodología, en lo cual se obtuvieron unas pastillas que se procedieron a amplificar por medio de PCR.

Transformación de células competentes de *E. coli* con los productos de ligación

Se colectan alícuotas de 6 µl cada una de células competentes de *E. coli* DH5α. Una se utiliza para incorporar el producto de la ligación (1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2 y 2.3) y las otras dos como controles. Se le añaden 200µl de medio LB para finalmente sembrar el contenido de cada tubo en placas de LB+ampicilina.

Electroforesis del producto de PCR

Cada muestra fue cargada con 1 µl de regulador amortiguador de Naranja en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con BrEt y colocado en una cámara electroforética. Después de que el colorante indicó que la muestra había migrado lo conveniente se examinó con luz ultravioleta en el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad.

Extracción de DNA plasmídico

Se siguió el protocolo Mini Prep después de cosechar las células transformantes de *E. coli*, resuspendiendo en soluciones, centrifugando e incubando en hielo según lo descrito en la metodología, en lo cual se obtuvieron unas pastillas que se procedieron a clonar por medio de PCR.

PCR de DNA plasmídico

La clonación de nuestros oligos (1, 2, 3) se corroboró por amplificación, se llevó a cabo a partir de DNA plasmídico extraído de células transformadas de *E. coli* DH5α. La reacción fue preparada con 2.5 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 0.2 µl de Taq polimerasa, 1.0 µl de cada oligo (directo y reverso), 1.0 µl DNA y se aforó con H₂O hasta 25 µl. Las condiciones del termociclador se programaron en: 94°C/3min. 94°C/30s. 55°C/30s. 72°C/40s. 72°C/5min * 30 ciclos. Duración aproximada 1hr 26min.

Purificación del gel de agarosa

Se corta del gel de agarosa la banda de interés y se pone en un tubo eppendorf. Se añaden los reactivos del UltraClean® 15 DNA Purification Kit siguiendo el protocolo de centrifugación para finalmente obtener los eluidos.

Digestión de plásmidos

- Enzima BsmBI

Se realizó la prueba con 4 µl de cada plásmido (U6-1 y U6-2), 2 µl de enzima, 5 µl de buffer y se aforó con H₂O a un volumen final de 50 µl, dejando incubarse a 37°C por 3 hrs.

- Enzima Sac I y Xba I

Se realizó la prueba con 5 µl de cada clona positiva, 1 µl de cada enzima, 2 µl de buffer y se aforó con H₂O a un volumen final de 20 µl, dejando incubarse a 37°C por 3 hrs.

Transformación en *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación, se adicionó el plásmido a la bacteria, congelando con nitrógeno líquido e incubando, para después incubar las células en placas y posteriormente seleccionar las células transformantes.

Transformación de *S. schenkii* mediada por *A. tumefaciens*

Se prepararon las células transformantes Agl 1 y Agro 8 con medio de inducción, el antibiótico correspondiente y acetosiringona; luego se realizó la preparación de cajas Petri con medio YPD (+AS y -AS) con celofán estéril y se añadió 100 µl de *Agrobacterium* y 100 µl de conidias de hongo, se dejaron incubando a 28°C por aproximadamente 2 o 3 días, para así obtener los mutantes.

RESULTADOS

Clonación de las construcciones U6-1 y U6-2 en el vector pBGgHg

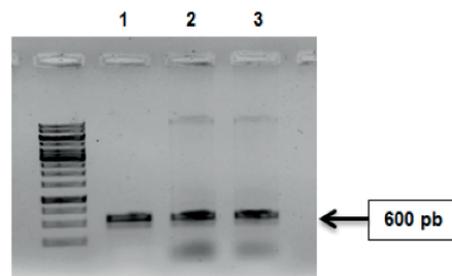


Figura 2. Electroforesis del producto de la extracción de plásmido de las transformantes de *E.coli*. Se presentan las clonas que fueron seleccionadas y purificadas para llevar a cabo la transformación de *Agrobacterium*, en el carril 1 y 2 tenemos construcciones de U6-1, mientras que el carril 3 corresponde a construcción en U6-2.

Transformación de *Agrobacterium* con las construcciones en pBGgHg



Figura 3. Cultivo de las cepas transformantes de *Agrobacterium* en medio LB.

Transformación mediada por *Agrobacterium* de *S. schenkii*

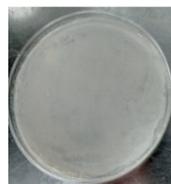


Figura 4. Cultivo de la cepa transformante Agl1 en medio YPD pH 4.5.



Figura 5. Cultivo de la cepa transformante Agl1 en medio YPD pH 4.5 + acetosiringona.



Figura 6. Cultivo de la cepa transformante #8 en medio YPD pH 4.5.



Figura 7. Cultivo de la cepa transformante #8 en medio YPD pH 4.5 + acetosiringona.

CONCLUSIONES

Se logró llevar a cabo el protocolo de transformación de una manera exitosa, sin embargo hay que seguir realizando estudios para corroborar si el sistema empleado ha funcionado satisfactoriamente, así como también, verificar cuál es la modificación ha tenido nuestro hongo respecto a su patogenicidad.

Debido a la virulencia antes mencionada, es necesario y benéfico seguir realizando investigaciones sobre los componentes de la pared celular de *S. schenckii*, principalmente de las proteínas de las cuales está mayormente formada; ya que de mano de la ingeniería genética, se pueden llegar a realizar grandes aportaciones que nos ayuden a combatir la alta incidencia de la esporotricosis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Héctor M. Mora Montes por permitirme participar en este proyecto; a mis familiares, en especial a Francisco Sandoval, Claudia Amézquita, Fabiola Sandoval y Jahaziel Velázquez, por su gran apoyo durante mi investigación. A Alma Tamez Castrellón y a Adriana Pérez por su tiempo, asesoría, correcciones y su apoyo brindado. A mi compañera Ana Requeses por su ayuda proporcionada, así como también al personal del Laboratorio de Glicobiología de Hongos, del Departamento de Ciencias Naturales y Exactas (DCNE) de la UG, que contribuyó en la realización de este proyecto. Este trabajo fue apoyado por CONACyT, Universidad de Guanajuato y Universidad Autónoma de Coahuila.

BIBLIOGRAFIA

Ruiz-Baca, Estela, et al. (2011). “2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall” en *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(2): 248-250.

Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. (2006). “*Sporothrix schenckii* y esporotricosis.” *Anales de Academia Brasileira de Ciencias*, 78(2), 293-308.

Messias, Anderson, et al. (2014). “Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex” en *ELSEVIER, Journal of Proteomics* 115 (2015) 8 – 22.

Castelo Teixeira, Pedro, et al. (2009). “Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*” en *Microbiology*, 155, 3730–3738.

Arazoe, Takayuki, et al. (2015). “Tailor-Made CRISPR/Cas System for Highly Efficient Targeted Gene Replacement in the Rice Blast Fungus” en *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 112, No. 12, 2543-2549.

Castro, Rafaela, et al. (2013). “Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates” en *Plos One*, Vol. 8, No. 10.

Ruiz Baca, Estela, et al. (2009). “Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix” en *Medical Mycology* March 2009, 47, 185196.

Lammoglia-Cobo, María Fernanda, et al. (2016). “La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas” en *Investigación con discapacidad*, Vol. 5, Núm. 2 Mayo-Agosto 2016, pp 116-128.

Valderrama Fonseca, Ana M., et al. (2005). “Transformación de plantas mediada por agrobacterium: Ingeniería genética natural aplicada” en *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*.Vol.58, No.1, p. 2569-2585.

TRANSFORMACION DE E.COLI (DH5 α) PARA LA PRODUCCION DE LAS PROTEINAS: α -LACTOALBUMINA Y LACTOFERRINA HUMANA

Lorena Valeria Carmona Martínez y Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

RESUMEN

Varias especies de mamíferos producen lactoferrina y α -Lactoalbumina, siendo la primera una glicoproteína no hémica de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas y la segunda una proteína del suero de la leche que puede sintetizar o producir lactosa. La lactoferrina y α -Lactoalbumina están presentes en una variedad de fluidos exocritos y es particularmente abundante en leche y calostro. Este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de la transformación de cepas de E.Coli para la producción industrial de las proteínas α -Lactoalbumina y Lactoferrina humana. Principalmente se hizo una transformación y comparación de las cepas DH5 α y unas químicamente competentes, siendo previo la identificación de las últimas. Después mediante un miniprep se consiguió la purificación de los plásmidos para posterior hacer una verificación una verificación de la transformación de E.Coli.

Palabras clave: Ecoli, Digestion enzimática, electroforesis α -Lactoalbumina y Lactoferrina.

INTRODUCCIÓN

La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de un replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga. Muchas bacterias pueden activamente incorporar ADN exógeno mediante una capacidad genéticamente programada denominada competencia natural. El estado de competencia natural nunca ha sido demostrado directamente en Escherichia coli y en la mayoría de los casos, se emplea el término de transformación genética en lugar de permeabilización artificial del ADN (Rivero et al, 2008).

El procedimiento de lisis alcalina se refiere al miniprep más comúnmente utilizado. El ADN de plásmido se prepara a partir de pequeñas cantidades de muchos cultivos diferentes (1 a 24) de bacterias que contienen plásmidos. Las bacterias se lisan por tratamiento con una solución que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) y NaOH (SDS desnaturaliza proteínas bacterianas, y NaOH desnaturaliza cromosómico y ADN plasmídico). La mezcla se neutraliza con acetato de potasio, haciendo que el DNA del plásmido cerrado covalentemente se recupere rápidamente. La mayor parte del ADN cromosómico y las proteínas bacterianas precipitan, al igual que el SDS, que forma un complejo con potasio y se eliminan por centrifugación. El ADN de plásmido reanudado del sobrenadante se concentra entonces por precipitación con etanol (Wiley, 2003).

METODOLOGÍA

1) Transformación de E.Coli DH5 α

Se mantuvo en un medio enriquecido de LB (caldo Luria) con la receta original utilizando la siguiente fórmula (referente a 1L):

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 5 g NaCl
- 1 ml de NaOH al 1N (ajustar pH a 7)
- 15 g agar

Esterilizándose todo a 121°C (15 lbs de presión) durante 25 min. Después se dejó en cajas Petri para su solidificación y a continuación se inoculó en estriado.



Posteriormente al ver el crecimiento se hizo un control negativo donde no hubo crecimiento para la comparación de las cepas químicamente competentes y las InvitroGen.

Se reportaron las colonias. Se tomó un control negativo donde no hubo crecimiento para la comparación de las cepas químicamente competentes y las InvitroGen.

Se dejó en columnas las células transformadas y con una varilla se estrió para dejar incubar a 37°C, se tomó con la asa 1 colonia para vaciar en 3 placas de las cepas transformadas con invitrogen. Para posterior hacer conservas.

2) Purificación de plásmidos

Se inoculó 5mL de medio LB esteril con una sola colonia bacteriana, se dejó crecer hasta la saturación. Se centrifugó 1.5 mL de células durante 20 segundos en una microcentrifuga a velocidad máxima para sedimentar. Se eliminó el sobrenadante con pipeta Pasteur.

Se re suspendió el sedimento en 100 µl de solución GTE y dejó reposar 5 min a temperatura ambiente.

Se añadió 200 µl de solución NaOH / SDS, mezclándolo al tubo con el dedo y colocándolo en hielo por 5 min.

Se añadió 150 µl de solución de acetato de potasio y agitar a velocidad máxima durante 2 segundos para mezclar.

Se colocó en hielo durante 5 min, asegurando que la mezcla estuvo completa.

Se volvió a centrifugar por 3 minutos en la microcentrifuga para sedimentar los restos celulares y el ADN cromosómico.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, mezclándolo con 0.8 mL de etanol al 95% y luego se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos.

Se centrifugó después por 1 min a temperatura ambiente para sedimentar el ADN plasmidico y ARN.

Se eliminó el sobrenadante, lavando el sedimento con 1 mL de etanol al 70% y se puso a secar la pastilla al vacío.

Se re suspendió el sedimento en 30 µl de tampón TE y se utilizó 5 µl del ADN resuspendido para los próximos procesos.

3) Verificación de la correcta transformación de E.Coli (Genotificación)

3.1) PCR

Se preparó el master mix con la siguiente formulación:

-Agua RNAsas (libre): 14.1 ml

-Buffer 5x: 6 µl

-dNTPs: 0.6 µl

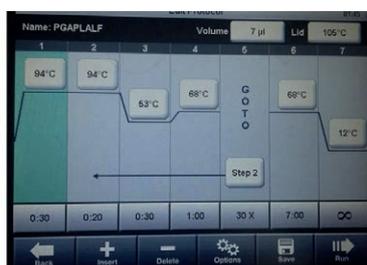
-Primer F: 0.6 µl

-Primer R: 0.6 µl

-TAG Polimerasa: 0.2 µl

Del master mix se tomó 5 µl y se agregó 2 µl del DNA (diluido) para cargar 7 µl en cada tubo eppendorf (5 en total).

Posterior se llevó al termociclador con una temperatura de alineamiento de 55°C.



A continuación se realizó una electroforesis preparando en 100mL de agua tridestilada, agregar 2mL de TAE 50x más 1g de agarosa en agitación. Después se tomó 25 mL para agregarle 0.8 µl de Bromuro de Etidio.

3.2) Digestión con enzimas de restricción

Se utilizó el protocolo de Invitro Gen de Anza Buffer 10x, siendo una digestión doble con las enzimas XbaI y XhoI, el cual estipula la preparación de una mezcla de reacción añadiendo reactivos en el orden indicado: comenzando por agua libre de nucleasa cuanto se requiera para completar el volumen final de 50 µL, Anza™ 10X Buffer or Anza 10X Red Buffer 2 µL, DNA 1 µg, Anza™ restriction enzyme 1 1 µL, todo esto para la primera reacción en cuanto a la segunda; es igual solo que se le añade 1 µL de Anza™ restriction enzyme 2. Se incubó a 37 ° C durante 15 minutos. Para posterior elaborar otra electroforesis tal y cual como en el PCR.

RESULTADOS

CONTEO DE COLONIAS

Tabla 1. Conteo de colonias de cepas

| | Cepas InvitroGen | Cepas químicamente competentes | |
|---------------|------------------|--------------------------------|------|
| α - LA | 1 UFC | α -LA | 2UFC |
| LF | 8 UFC | LF | 2UFC |

Cuantificación en Nanodrop

| # | Sample ID | User name | Date and Time | Nucleic Acid Conc. | Unit | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Sample Type | Factor |
|---|-----------|-----------|--------------------------|--------------------|-------|-------|-------|---------|---------|-------------|--------|
| 1 | | DIPA | 28/06/2017 10:55:38 a.m. | 48.2 | ng/μl | 0.965 | 0.612 | 1.58 | 2.07 | DNA | 50.00 |

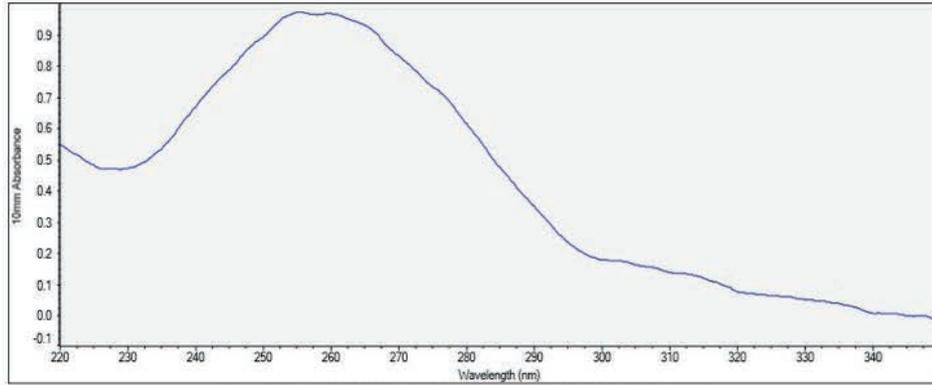


Fig 1. Cuantificación de DNA de la Lactoferrina

| # | Sample ID | User name | Date and Time | Nucleic Acid Conc. | Unit | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Sample Type | Factor |
|----|-----------|-----------|--------------------------|--------------------|-------|-------|-------|---------|---------|-------------|--------|
| 27 | | DIPA | 28/06/2017 11:00:46 a.m. | 35.4 | ng/μl | 0.708 | 0.372 | 1.90 | 3.48 | DNA | 50.00 |

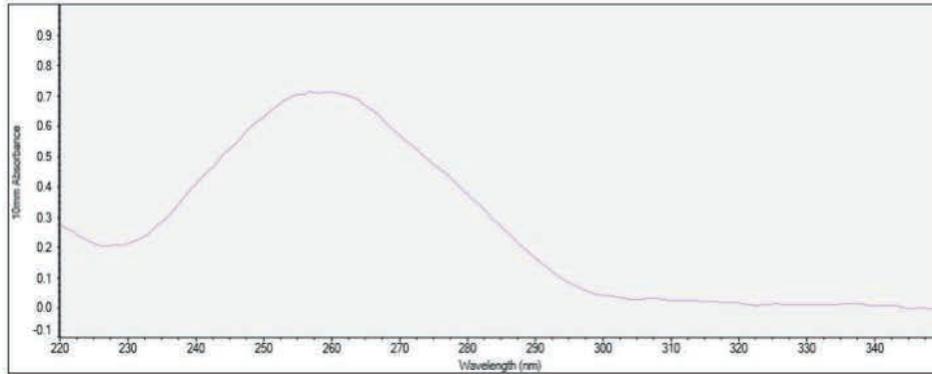


Fig 2. Cuantificación de DNA de la α- Lactoalbumina

PCR y Electroforesis

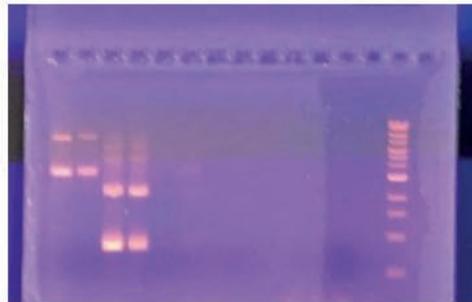


Fig 3. Resultados del PCR y electroforesis de Lactoferrina y α- Lactoalbumina

Digestión enzimática



Fig 4. Resultados nativos de digestión enzimática con positivo y electroforesis

DISCUSIÓN

Se utilizaron cepas comerciales de Invitro Gen para probarlas con cepas de E.Coli DH5 α químicamente competentes por el método de Cloruro de Calcio, esto con la finalidad de saber si las cepas eran competentes y escoger las mejores. Esto se vio reflejado en la cuantificación con el Nanodrop teniendo los resultados nativos y cerciorarse de que cantidad del DNA en cuanto a las dos cepas se obtuvo como se puede observar en la Fig 1 y la Fig 2. En cuanto a la purificación, se llevó a cabo un PCR y electroforesis para cerciorarse de que la E.Coli se encuentra transformada. Por lo que pudimos observar en la Fig 3, que existen algunos subproductos en cuanto a las bandas mostrando un PM elevado por lo que se sugiere una optimización en cuanto al PCR para poder encontrar la temperatura de alineamiento más adecuada. Ya que el primer dimer se unió al segundo primer demostrando así que esta no es la temperatura óptima, el DNA no está completamente integrado provocando así que los plásmidos se unan entre sí; marcando un PM elevado. Por ultimo debido a que este trabajo será patentado, en las indicaciones del proceso se requiere una reafirmación de la transformación; por lo tanto se llevó a cabo una digestión con enzimas de restricción, notándose así en la imagen Fig 4 se puede reafirmar que en efecto la E.Coli se encuentra transformada pero al igual que en el proceso anterior unas bandas marcadas, lo que nos lleva a sugerir que en el proceso de incubación se deje por 45 min, en vez de los 15 min con los que se había realizado la digestión enzimática.

CONCLUSIONES

Se logró la optimización en el proceso de transformación de las cepas de E.Coli para la producción de las proteínas α -Lactoalbumina y Lactoferrina para producirse a nivel industrial basado en los sistemas de expresión E.Coli como hospedero para la propagación de los plásmidos y la utilización de Pichia Pastoris SMD1168 para su expresión.

BIBLIOGRAFIA

John Wiley & Sons Inc; ringbou (2003) Current Protocols in Molecular Biology; 59-208.

Rivero, Y. S., García, A. H., & Calzada, R. F. (2008) Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en Escherichia coli.

CONTRIBUCIÓN DE LAS FRUTAS Y LAS HORTALIZAS EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD HUMANA

(MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL FRUTO DEL MANGO ATAU LFO)

Anahi Gudiño Gudiño ¹ y Elhadi Yahia Kazuz ²

RESUMEN

El presente proyecto de investigación fue realizado en la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Juriquilla, facultad de ciencias naturales específicamente en el laboratorio de fitoquímicos y nutrición, donde se realizaron los experimentos necesarios para cumplir con parte de las primeras dos etapas del proyecto que se trabaja actualmente llamado, "Actividad enzimática en diferentes variedades de mango y su relación con el contenido de fitoquímicos durante su maduración poscosecha", todo esto con la finalidad de atacar la enzima que impide la coloración amarilla de la cáscara en el mango, aun cuando el interior de esta fruta se encuentra maduro, y por tal motivo se impide la comercialización de dicho producto en algunos lugares, provocando que los productores enfrenten pérdidas monetarias.

ABSTRACT

The present research project was carried out at the Autonomous University of Querétaro, Campus Juriquilla, faculty of natural sciences specifically in the phytochemical and nutrition laboratory, where the necessary experiments were carried out to comply with part of the first stages of the project that is currently working Called "Enzymatic activity in different mango varieties and their relation to the phytochemical content during post-harvest maturation", all with the aim of attacking the enzyme that prevents the yellow coloration of the shell in the mango, even when the interior of this fruit is ripe, and for this reason it prevents the commercialization of this product in some places, causing the producers to face monetary losses.

Palabras Clave: Enzimas, mango, coloración, actividad enzimática.

INTRODUCCIÓN

El mango es una fruta tropical que se consume en diferentes partes del mundo dado que es considerado como uno de los frutos preferidos a causa de su atractivo color y delicioso sabor. Además de que tiene propiedades que ayudan a mejorar la apariencia y salud de las personas. 5 de los beneficios que aporta el mango, son (SALUD180, 2017):

- Favorece la digestión
- Protege la vista
- Mejora la piel
- Previene la anemia
- Evita la retención de líquidos

Algunas de las propiedades que presenta dicho fruto son los siguientes nutrientes: Hierro, Calcio, Potasio, Yodo, Zinc, Magnesio, Sodio, vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B3, Vitamina B5, Vitamina B6, Vitamina B9, Vitamina C, Vitamina E, Vitamina K, y Fósforo, además de que es antioxidante y anticancerígeno. (DÍA, 2016)

Es por todo esto que el mango resulta ser importante y beneficioso para las personas, por lo tanto es producido en diferentes países y México no es la excepción.

En México el cultivo de este fruto tiene una gran importancia agrícola y económica, resultando ser uno de los principales frutos que se produce, puesto que se cosecha en 23 estados de la República Mexicana, fue por ello que en el año 2015 nuestro país ocupó el quinto lugar a nivel mundial en la producción de mango. (SAGARPA, 2017)

Entre las variedades de mango que se producen en el país se encuentran Kent, Keitt, Tommy Atkins, Haden, Ataulfo y Manila (México, 2014), los cuales son exportados a diferentes países y con el paso de los años tanto la producción como la exportación de mango han incrementado lo que beneficia al país y a los productores.

Sin embargo, existe un problema que se presenta en el mercado en cuanto a la comercialización de algunos mangos, puesto que cuando un mango no resulta ser lo suficientemente atractivo, es decir, cuando no es del todo, no se vende en determinadas zonas y esto se debe a que existen algunos mangos que aunque se encuentran maduros en su interior su cáscara no cambia de color verde a color amarillo.

Debido a esto en este proyecto de investigación se busca descubrir cuál enzima es la que impide que el mango pase de color verde a amarillo y bajo qué condiciones para poder así proponer una solución al problema que puedan enfrentar los agricultores de este tipo de mango.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los materiales utilizados para realizar las primeras etapas del proyecto fueron: colorímetro, pentrómetro, espectrofotómetro, liofilizadora, centrifuga, homogeneizador, rotavapor, vortex, matraz, agitadores magnéticos, tubos falcon, entre muchos otros materiales generales que se encuentran en un laboratorio de química.

SELECCIÓN, MUESTREO Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Se colectaron 30 frutos recién cosechados que a simple vista presentaron cierta homogeneidad en tamaño, color y madurez. Cada uno de ellos se lavó adecuadamente con agua y se secó, después de esto se identificó cada uno de ellos de manera individual, pues cada uno debía representar una muestra significativa de su estado de madurez.

Se pesaron y fueron almacenados. La temperatura y humedad fueron monitoreadas durante el periodo de almacenamiento, anotando la temperatura dos veces al día (por la mañana y por la tarde).

En un inicio se tomaron de 2 a 3 mangos, eligiendo los que representaron la menor madurez. Esto se hizo cada día, (algunas veces solo se tomaba 1 mango), hasta terminar con la totalidad de mangos colectada.

ANÁLISIS EN FRESCO

+COLOR

Utilizando un colorímetro se determinó los espacios de color externo CIELAB de tres secciones de cada mango. Una vez obtenido el color de la cáscara se procedió a determinar la firmeza para luego medir rápidamente, el color de la fruta, anotando cada dato en la hoja de registro.

+FIRMEZA

Se determinó la firmeza de cada mango utilizando un penetrómetro con punta de ocho milímetros.

Es importante resaltar que para este paso se destinó a 1 persona para medir la firmeza y fue siempre la misma persona quien midió la firmeza hasta terminar con la variedad de mango que se trabajaba.

Una vez realizados los pasos anteriores se destinaba la cantidad de pulpa y cáscara de mango necesaria para realizar los análisis en fresco y el resto se destinaba para ser liofilizado, por lo que se congelaba con N₂ líquido y se colocaban las muestras en frascos, los cuales eran almacenados en REVCO.

*Todos los análisis que a continuación se detallan (tanto en fresco como en liofilizado) se realizaron en pulpa y cáscara por separado.

ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los procedimientos que a continuación se describen, fueron los que se siguieron para realizar cada una de las pruebas para evaluar la actividad enzimática de clorofilasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa.

+Clorofilasa

- 1.Preparar buffer de fosfatos 5 mM (pH=7) que contenga KCl 50 mM y Triton-X100 al 0.24%
- 2.Suspender 0.6 g de acetone powder en 18 mL del buffer preparado.
- 3.Agitar en plato magnético por 1 hora a 30 °C.
- 4.Filtrar con gasa.
- 5.Centrifugar a 12000 G durante 15 minutos (10351 RPM)
- 6.Colectar el sobrenadante (enzima extraída).
- 7.Preparar una solución con 0.1 µmol/mL de clorofilas disueltas en acetona.
- 8.Preparar una solución al 0.24% de Triton-X 100 de buffer Tris 100 mM (pH=8.5)
- 9.Mezclar sobrenadante, buffer y clorofilas en una proporción 5:5:1 en un tubo Eppendorf.
- 10.Reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad.
- 11.Detener el avance de la reacción agregando una mezcla fría de 2 mL de acetona y 4 mL de hexano y mezclando vigorosamente.
- 12.Centrifugar la mezcla a 12000 gravedades por 10 minutos a 4 °C.
- 13.Separar la fase inferior.
- 14.Analizar en espectrofotómetro UV-Vis a 665 nm de longitud de onda (NOTA: el coeficiente de extinción molar del clorofilido a es 54.1 mM⁻¹cm⁻¹).

+Fenilalanina amonio liasa

- 1.Preparar buffer de boratos (pH=8.8) añadiendo mercaptoetanol (5 mM) y cisteína (10 mM) y enfriar.
2. Suspender 0.2 g de acetone powder en 20 mL de buffer de boratos.
- 3.Agitar en plato magnético por 30 minutos a 4 °C.
- 4.Centrifugar a 14000 G por 30 minutos.
- 5.Colectar el sobrenadante (enzima extraída).
- 6.Preparar una solución de 10 mg/mL de fenilalanina.
- 7.Mezclar 1 mL de solución de fenilalanina, 2.5 mL de agua destilada, 1.5 mL de buffer de boratos y 0.5 mL del sobrenadante.
- 8.Reposar la mezcla a temperatura ambiente por una hora en la oscuridad.
- 9.Detener el avance de la reacción agregando 0.5 mL de ácido clorhídrico 5 N a la mezcla.
- 10.Analizar en espectrofotómetro UV-Vis a 280 nm de longitud de onda (NOTA: el coeficiente de extinción

molar del ácido cinámico a es 167 mM-1cm-1).

+Polifenol oxidasa

- 1.Preparar buffer de ácido cítrico-fosfato (pH=6.2).
- 2.Preparar 100 mL de una solución de 2 mg/mL de acetone powder en buffer de ácido cítrico-fosfatos.
- 3.Agitar en plato magnético por 10 minutos.
- 4.Filtrar con papel Whatman.
- 5.Preparar solución 0.1 M de catecol o 0.01 M de ácido caféico.
- 6.Tomar 10 mL del filtrado y mezclar con 5 mL de solución del polifenol elegido.
- 7.Agitar vigorosamente durante 30 segundos.
- 8.Analizar en espectrofotómetro UV-Vis a 420 nm de longitud de onda.

ANÁLISIS EN LIOFILIZADO

En esta parte solo se estuvo trabajando en lo siguiente:

- +Se tomó cada una de las muestras que se encontraban en el REVCO y fueron colocadas en tubos falcón, para después ser llevadas a la liofilizadora y ahí permanecieron por 48 horas.
- +Después del tiempo indicado se retiraron las muestras de la liofilizadora y fueron trituradas manualmente utilizando morteros.
- +Una vez molidas las muestras se colocaban en frascos y eran llevadas al refrigerador de -20° con el que se cuenta en el laboratorio.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

- En esta parte se tomó muestra de los mangos, tanto de pulpa como de cascara y se agregaban inicialmente 20 ml de acetona y utilizando el homogeneizador se mezclaron por 1 minuto.
- Después de esto se decantaba la acetona a un matraz y se agregaban 10 ml de acetona nuevamente mezclándose en el homogeneizador por 30 segundos.
- Se realizó este procedimiento por 20 veces o en dado caso hasta lograr que la acetona quedara incolora.
- Después de los 20 lavados (o en algunas veces más lavados) se filtraba la proteína (polvo) resultante y se colocaba en una caja Petri para ser llevada al refrigerador de -20°.



Figura 1. Extracción de pulpa y cáscara y medición de firmeza.



Figura 2. Recolección de datos



Figura 3. Congelamiento de mango con N2 líquido.



Figura 4. Extracción de proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se esperan obtener son los siguientes:

Clorofilasa

Se espera encontrar un comportamiento similar al que se muestra en las figuras 5, en donde la actividad de la Clorofilasa se expresa en micromoles de clorofilo producido por minuto por gramo de precipitado enzimático, dicha actividad se grafica en función del tiempo transcurrido desde la cosecha del fruto. Se espera encontrar que el mango Ataulfo siempre tenga diferencia significativa en la actividad de la clorofilasa comparándola en cáscara y en pulpa (figura 5), y además, que con el paso del tiempo esta actividad sea

constante, a pesar de que a simple vista esta actividad ya no es perceptible debido a la degradación de la clorofila.

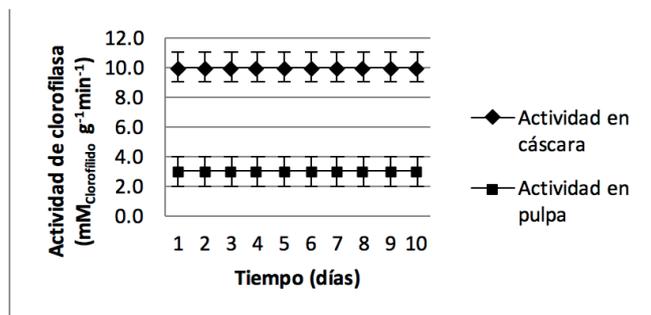


Figura 5. Actividad de la clorofilasa en mango Ataulfo

En cambio, en mango petacón (variedad Kent) se esperan resultados similares al Ataulfo en pulpa pero distintos en cáscara, esto debido a su poco o nulo cambio de coloración, dicho comportamiento se representa en la figura 6. Se observan dos casos distintos, el primero se podría deber a que las propiedades fisicoquímicas de esta variedad no son las adecuadas para activar la enzima clorofilasa en cuyo caso la actividad de esta sería similar a la del Ataulfo. El segundo caso implica la ausencia de la enzima donde la actividad sería nula y el poco cambio de color se debería en su mayoría a la síntesis de nuevos fitoquímicos, en su mayoría carotenoides. (Vilchis, 2017)

Fenilalanina amonio liasa

Se ha demostrado la presencia de compuestos polifenólicos en el mango, por tanto debe encontrarse actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés). Se espera que la actividad de la enzima sea siempre similar en pulpa y en cáscara (esto puede cambiar hasta hacer una revisión bibliográfica acerca de la concentración de polifenoles en ambas partes de mango). En este caso se esperan tres posibilidades en cuanto a la actividad de la PAL en función del tiempo, un aumento o un decremento graduales o que ésta sea constante en todo momento. La presencia de esta enzima también puede ser corroborada mediante biología molecular, aunque, de no encontrar actividad de esta, sería claro que es debido a su ausencia. Un resultado adicional en cuanto a la PAL sería que, de no encontrar actividad enzimática, se sabría que la ruta por la cual se sintetizan los polifenoles en el mango es por la vía del ácido malónico y no por la del ácido shikímico pues uno de los productos de esta última vía es la fenilalanina, la cuál es el sustrato de la enzima estudiada. No se espera diferencia tampoco en la actividad determinada para cada variedad de mango estudiada (Ataulfo o Kent), pues la coloración de ambos está más en función de la concentración de otros fitoquímicos como son las clorofilas y los carotenoides. (Vilchis, 2017)

Polifenol oxidasa

En cuanto a la actividad de la Polifenol oxidasa (PPO) se espera que para ambas variedades exista un incremento en su actividad en la pulpa y en la cáscara se mantenga constante a lo largo del tiempo. Un caso eventual sería el de encontrar que ni en pulpa ni en cáscara exista actividad de la PPO o ésta es muy baja. (Vilchis, 2017)

CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron durante este tiempo en las pruebas realizadas fueron los siguientes:

+En cuanto a la prueba de Clorofilasa fue en esta en la que se presentó la mayor actividad enzimática a diferencia de las otras pruebas.

+En PPO se presentó actividad enzimática sobre todo en la cáscara, esto fue mientras los mangos estaban verdes, puesto que conforme maduraban los mangos la actividad de PPO se fue perdiendo y por el contrario en la pulpa se empezó a presentar un pequeño incremento de actividad.

+En la prueba de PAL no se mostró actividad enzimática cuando se trabajó con pulpa y cáscara que se obtenía de los procesos antes descritos, mientras que al realizar la prueba con proteína de cáscara y pulpa se reflejó un poco de actividad.

Cabe mencionar que estos son los resultados que se han presentado en parte de las dos primeras etapas del proyecto que se continúa desarrollando por lo que es difícil presentar conclusiones concretas.

BIBLIOGRAFÍA

DÍA, E. (8 de Junio de 2016).

México, F. (27 de AGOSTO de 2014). Forbes. Obtenido de <https://www.forbes.com.mx/mango-un-negocio-jugoso-para-mexico/>

SAGARPA. (1 de ENERO de 2017). SAGARPA . Obtenido de http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0001-1.aspx

SALUD180. (10 de Agosto de 2017). Obtenido de <http://www.salud180.com/nutricion-y-ejercicio/5-propiedades-del-mango>

Vela Gutiérrez Gilbert, L. G. (s.f.). smbb.

Vilchis, A. (Junio de 2017). Actividad enzimática de diferentes variedades de mango. Comunicación personal, A. Gudiño, Entrevistador.

TITULO: ESTADO NUTRICIONAL, Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES SOCIALES, DEPRESIÓN, IMAGEN CORPORAL, AL ESTILO DE VIDA, ACTIVIDAD FÍSICA Y CALIDAD DEL SUEÑO DEL ADULTO MAYOR DE LA COMARCA LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO.

ESTUDIANTE: LLUVIA CRISTINA SAUZA NIÑO Y RESPONSABLE DEL PROYECTO: D.E. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ RINCÓN.

RESUMEN

Este es un estudio descriptivo, observacional y de corte transversal, cuyo objetivo es describir el nivel del estilo de vida del adulto mayor, siendo estos residentes de la Comarca Laguna de Coahuila. Se analizaron las variables como el estado civil, sexo, y el instrumento Fantastic que nos determina estilo de vida del participante, asociado a la salud. Se seleccionaron 24 individuos de manera aleatoria y tomando como referencia los criterios de exclusión, para la obtención de datos. El 62.5% fueron mujeres y 37.5% restante fueron hombres.

ABSTRACT

This is a descriptive, observational and cross-sectional study, whose objective is to describe the level of lifestyle of the elderly, being these residents of Comarca Laguna de Coahuila. We analyzed variables such as marital status, sex, and the Fantastic instrument that determines the participant's lifestyle. Twenty-four individuals were randomly selected and using exclusion criteria for data collection. 62.5% were women and 37.5% were men.

INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas publicó que existen 6,929,7265,043 de personas en el mundo (Programa Mundial sobre Censos y Población 2010). Parte de esta población el 925,281,038 millones son Adultos Mayores, es más que evidente que se ha tenido un incremento en la pirámide poblacional, muy acentuado, ya que para el 2010 solo existían 650 millones de personas (Organización Mundial para la Salud 2011) con una edad de más de 60 años.

Hoy en día la esperanza de vida al nacer representa un indicador positivo que conlleva retos por atender ya que estos resultados que se ven en la composición mundial de la población infantil está decreciendo y la población de Adultos Mayores se ha incrementado a nivel mundial, esto advierte de la necesidad de investigar e indagar en las situaciones en las que está inmerso el Adulto Mayor en su vida diaria, para establecer nuevas políticas, metas y objetivos para atender este universo.

El país Mexicano, está presentando un grave y latente problema, que es la obesidad en la población, esto atenúa la problemática de salud, por ende las enfermedades crónicas degenerativas que reflejaron un incremento en las estadísticas.

El estilo de vida en los adultos mayores, hoy en día causa una incertidumbre ya que varios autores este es una decisión de pensamiento y razón (Luz S. Álvarez C. 2012) menciona que este compete exclusivamente al ámbito personal, para dar paso a una perspectiva que se indaga por las condiciones materiales, sociales y culturales que favorecen la adopción de los comportamientos.

En esta prueba piloto que se realizó con 24 adultos mayores, la finalidad es describir algunos elementos que se encuentran alrededor del estado nutricional del adulto mayor, la depresión y planteando evidencia el Índice de Masa Corporal (IMC), centrándonos en este reporte en el el estilo de vida del Adulto Mayor, con la validez y fiabilidad del instrumento Fantastic.

Marco teórico.

El estado de Coahuila se localiza en el noreste de México y comparte una frontera de 512 kilómetros con Texas. Tiene 38 municipios. Su capital es Saltillo. Se limita en el norte por Texas, (EE.UU.), en el este por Nuevo León, en el sur por San Luis Potosí y Zacatecas, en el oeste por Durango y Chihuahua. (Avila Curiel A., 2005)

Actualmente, la población del estado de Coahuila representa 2.4% de la nacional, con 2.75 millones de habitantes (Coahuila, 2015) así mismo en y de acuerdo con las cifras que proporciona el apartado de salud en el estado tiene un poco más de 234 mil personas adultos mayores que equivale al 8.6 % de la población total del estado. Se estima que para el año 2030 el 17.5% de la población tendrá 60 años o más y que para el 2050 aumentara a un 28%, es decir, se tendrá una población con un mayor grado de envejecimiento y una consecuente disminución en sus capacidades (Salud, 2011). Ante el aumento previsto en la esperanza de vida, el envejecimiento y la disminución paulatina de capacidades que ello implica, se convierte en un problema social de magnitud cada vez mayor.

Uno de los problemas más graves que se enfrenta en el país es la obesidad de la población lo cual incrementa la problemática de salud acentuando las enfermedades crónicas degenerativas; en 2006 se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que ubicó a México

como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global. En esta investigación realizada muestra que si bien es cierto la obesidad es considerada como una epidemia mundial; en México hay regiones donde el problema es más evidente la región norte del país tanto en hombres como en mujeres es donde se observan los valores más altos de IMC y circunferencia de cintura en comparación con las demás regiones del país. (Vaquera S, 2013)

De acuerdo a lo que publica ENSANUT 2012 en el Estado la tendencia en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los últimos seis años se observa un incremento de 17.9% en la prevalencia de obesidad en el caso de los hombres y un incremento de 11.8% en el caso de las mujeres en adulto mayores de 20 años comparado con la edición de 2006. Dejando manifiesto que en Coahuila el sobrepeso y la obesidad fueron un problema de salud pública que afectó a 7 de cada 10 hombres y mujeres mayores de 20 años. (Pública, 2013)

La depresión en el adulto mayor es muy frecuente, en publicaciones recientes se detalla que en el adulto mayor en promedio el 10% sufre depresión siendo esta asociada a factores de riesgo como fragilidad, deterioro cognitivo entre otros. (OMS 2015)

La imagen que cada individuo tiene apariencia física es muy subjetiva y en muchos casos difiere de lo que los demás observan con claridad, en ese proceso de autopercepción intervienen diferentes factores en ocasiones asociados al estado depresivo que a su vez depende del estado nutricional. (Marrodán 2007)

Pregunta de investigación.

¿Cual es el grado de asociación entre el estado nutricional del Adulto Mayor, la autopercepción de la imagen corporal, la depresión y la calidad del sueño y las variables sociodemográficas?.

Objetivo general.

Determinar el grado de asociación entre el estado nutricional del adulto mayor la autopercepción de la imagen corporal, la depresión y la calidad del sueño y las variables sociodemográficas.

MÉTODOS Y MATERIALES.

La presente investigación corresponde a un estudio de tipo cuantitativo, descriptivo, de corte transversal.

Muestra:

Esta fue una prueba piloto conformada por 24 adultos mayores de la comarca lagunera de Coahuila y Durango, o a quienes previa firma del consentimiento informado, se aplicará los instrumentos. El tipo de muestreo que se utilizará será No probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión:

Para hacer parte de la población objeto de estudio de esta investigación, serán tenidos en cuenta los siguientes requisitos indispensables:

- Ser mayor de 60 años de edad.
- Ambos sexos
- Que acepten participar en el estudio

Criterios de exclusión:

- Quien decida abandonar el estudio.
- Que no firmen el consentimiento informado.

Estrategias de Análisis:

Los datos se capturaron en el programa SPSS V22 para obtener frecuencias con IC 95%, y análisis de asociación mediante análisis bivariado de Chicuadrada O ji y significancia con $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Se realizó un estudio descriptivo observacional con 24 participantes de los cuales 9 eran del sexo masculino a lo que equivale a un 37.5 % y 15 del sexo femenino obteniendo un 62.5 % de los entrevistados.

Respecto al estado civil, 11 son casados lo cual representa un 45.8 %, 6 de ellos son viudos con un 25%, 4 divorciados es el equivalente al 16.7%, 2 participantes con un estatus de separados con un 8.3% y 1 soltero el cual ocupa el 4.2%.

En cuestión de los hijos, los datos que se obtuvieron fue que en promedio los participantes tuvieron 3 hijos, obteniendo un resultado de 3.29% como promedio de los datos obtenidos.

El rango de edad de los participantes oscila entre los 60 y 88 años, con una mediana de 71 años.

A lo que se refiere del peso corporal, los resultados arrojaron que hay un rango entre 50 y 90 kg, el promedio del peso es de 69 kg en relación a su talla que es 1.48 y 1.8, siendo el 1.63 el promedio de esta.

Se pudo observar en los datos estadísticos que se analizaron que Índice de Masa Corporal se encuentra entre 17 y 37, con una mediana de 26.

El 75 % de los entrevistados profesan la religión católica, el 12.5% la religión Cristiana y el 12.55 ninguna.

El estado emocional 14 de los participantes se encuentra en un estado normal con un 41.7% y 10 entrevistados con depresión lo que abarca un 41.7 %, de acuerdo al instrumento aplicado y tomando en cuenta los criterios de Yesavage.

Se realizó una correlación entre el estado civil y la depresión, a lo cual no se obtuvo una significativa estadística.

En relación con el sexo y la depresión no se encontraron relación estadística alguna.

En base a los resultados obtenidos en la prueba Fantastic, el cual está integrado por 25 ítems y nueve

dominios que es el instrumento que mide el estilo de vida, se encontró que el 20.8% de la poblacional estudiada, se encuentra en Zona de Peligro y el 75% en un estilo de vida bajo y solo el 4% en Adecuado. Se concluye que los ítems que conforman el Cuestionario de Estilos de Vida Saludables tienen validez y confiabilidad.

CONCLUSIONES.

En el presente estudio de piloto, se encontraron cifras de importancia ya 5 personas de las 24 encuestadas se encuentran en un estilo de vida, en relación con su salud en zona de peligro, 18 participantes en un nivel bajo y una sola persona, con un nivel adecuado.

Esto nos da un rumbo para ampliar el estudio a más participantes y así poder contrastar con datos más numerosos el estudio de investigación, para una evidencia definitiva.

En relación con otros estudios realizados en el país, empleando el instrumento Fantastic, se ha encontrado, que el GBS estuvo asociado a los estilos de vida y a los factores socioeconómicos. Se determinó que hombres y mujeres que presentaron estilos de vida malos, tienen un promedio más alto de GBS y un nivel socioeconómico bajo. Por lo contrario, un segundo grupo tuvieron estilos de vida buenos, un promedio de GBS menor y un nivel socioeconómico regular, estos resultados son la evidencia de Patricia Pavón León (2015), que realizó un estudio transversal, de más de 60 años, en diferentes clínicas en Xalapa, Veracruz, en el periodo de agosto de 2013 a junio de 2014, en el cual el objetivo era analizar si el gasto de bolsillo, depende de los estilos de vida y el factor socioeconómico en los adultos mayores de 60 años.

Para la OMS (2012) estilo de vida determina un ciclo vital, con el fin de preservar la vida, manteniéndose sano y llegar a paliar la discapacidad y el dolor en la vejez, por lo tanto es de importancia ampliar el estudio de investigación, para obtener datos mas definitivos.

BIBLIOGRAFÍA.

- Luz S. Álvarez C. Enero 2012. Los estilos de vida en salud: del individuo al contexto.
- Patricia Pavón León (2015), estilos de vida, factor socioeconómico y el gasto de bolsillo en salud de los adultos mayores.
- María Graciela Carrillo Toledo (2010), U niverSalud, Revista del Instituto de Salud Publica de la Universidad Veracruzana. Volumen 6, Sept 2010.
- Organización Mundial de las Naciones Unidas. (2010).

COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN NEONATOS CON Y SIN LACTANCIA MATERNA EXCLUSIVA.

Sánchez-Aguilar Cindy Aleyois ; Delabra-Salinas, María Magdalena ; Rios-Willars, Ernesto

RESUMEN

La microbiota gastrointestinal es un ecosistema complejo y dinámico formado por varios cientos de microbios precisa de los estímulos inmunogénicos de la microbiota en desarrollo para su maduración. Uno de los determinantes más significativos de la microbiota intestinal es el tipo de alimentación. El presente trabajo muestra una revisión bibliográfica con la cual se realizó una comparación entre la microbiota intestinal de los neonatos lactados con leche materna y los lactados con fórmula, esto con la intención de resaltar el rol de enfermería en el fomento de la LME en la Atención Primaria, y cómo influye en la salud del infante a corto y largo plazo.

ABSTRACT

The gastrointestinal microbiota is a complex and dynamic ecosystem made up of several hundred different microbes, mainly bacteria. At birth, the infant has an immature immune system, which requires the immunogenic stimulus of the developing microbiota for its maturation. One of the most significant determinants of the intestinal microbiota is the type of feed. The present work shows a bibliographical review with which a comparison was made between the intestinal microbiota of breastfed and formula-fed infants, with the intention of highlighting the role of nursing in the promotion of LME in Primary Health Care, and how it influences the health of the infant at short and long term.

Palabras clave: Neonato, enfermería, LME, microbiota, fórmula.

INTRODUCCIÓN

Se entiende por microbiota al conjunto de microorganismos que cohabitan en diferentes regiones anatómicas de individuos sanos, en un nicho ecológico determinado. Su composición es diversa y especializada, dependiente de la región o tracto donde se localice. Estos microorganismos conviven en contacto directo con el hombre, y mantienen una relación simbiótica con beneficios bidireccionales. (La Rosa, Gómez & Sánchez, 2014)

La microbiota gastrointestinal es un ecosistema complejo y dinámico formado por varios cientos de microbios diferentes, principalmente bacterias (10¹¹-12 bacterias/g de contenido colónico, formando el 60% de la masa fecal total). El número total de bacterias excede 10 veces el número de células humanas, y la colección de genoma microbiológico (microbioma) contiene 100 veces más genes que el genoma humano. Su composición y concentración fisiológica varía en todo el tracto gastrointestinal y en los diferentes estadios de la vida, progresando desde la esterilidad en el recién nacido hasta la extremadamente variable y densa colonización del intestino adulto. (Guaraldi & Salvatori, 2012)

En el ser humano, la microbiota gastrointestinal juega un papel activo en la digestión y fermentación de carbohidratos, en la producción de vitaminas, en el desarrollo y maduración del sistema inmunitario mucosal gastrointestinal (GALT) y en la defensa frente a patógenos intestinales. (La Rosa et al., 2014)

Al nacimiento, el neonato cuenta con un sistema inmunitario inmaduro, que precisa de los estímulos inmunogénicos de la microbiota en desarrollo para su maduración. El papel de la microbiota humana en el proceso salud-enfermedad se ha redefinido durante los recientes años, y su rol fisiológico se ha enriquecido. (La Rosa et al., 2014)

El intestino fetal es estéril y se encuentra lleno de líquido amniótico. El establecimiento de la población microbiana intestinal es un proceso continuo y complejo que inicia en el parto y continúa por varios años bajo la influencia de factores internos y externos (Guaraldi & Salvatori, 2012) como lo son el entorno, la dieta, la edad gestacional, la hospitalización, el uso de antibióticos, el tipo de parto y el tipo de alimentación. Actualmente, uno de los determinantes más significativos y estudiados es el tipo de alimentación en el periodo neonatal, ya que este periodo es crucial para la colonización intestinal y, por ende, para la formación de la microbiota intestinal. (Sang A Lee, et. al., 2015)

Un extenso número de microbios son conocidos por colonizar el intestino neonatal en las primeras semanas de vida, (Jost, Lacroix, Braegger & Chassard, 2015) debido a la abundancia de oxígeno en el intestino neonatal, los microorganismos anaerobios facultativos (principalmente enterobacterias, enterococos y especies de estreptococos) representan los primeros colonizadores: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *faecium* son los más representativos, seguidos por *Klebsiella* y *Enterobacter*, y, más raro y transitorio, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, estreptococos alfa hemolíticos y estafilococos coagulasa-negativos. (Guaraldi & Salvatori, 2012) Durante el crecimiento, estas bacterias consumen O₂ y cambian el medio intestinal,

permitiendo la proliferación de bacterias anaeróbicas. (Le Huërou-Luron, Blas & Boudry, 2010)

Las bacterias – bifidobacterias, lactobacilos, enterobacterias, estafilococos – han sido detectadas en las heces fecales de los neonatos, en la leche materna y eventualmente en heces fecales de la madre, por lo cual se asume que son transferidas verticalmente de la madre al neonato a través de la lactancia directa.

Este mecanismo pudiera explicar, en parte, las diferencias en el establecimiento de la microbiota intestinal entre los niños lactados con leche humana y lactados con fórmula. Los neonatos lactados exclusivamente con leche materna han mostrado una microbiota relativamente simple y estable durante las primeras semanas de vida. (Jost, Lacroix et al., 2015) Este hecho se atribuye generalmente a los oligosacáridos únicos encontrados en la leche materna, que sirven como sustratos metabólicos selectivos para un número limitado de microbios en el intestino. (Azad, et al., 2013) En contraste, la microbiota de los neonatos lactados con fórmula ha sido reportada como más diversa pero menos estable, es decir, que se encuentra en un estado cambiante. (Jost, Lacroix et al., 2015)

El establecimiento inicial de la microbiota representa un estado crítico para la maduración intestinal y para la programación metabólica e inmunológica, y tiene importantes repercusiones en la salud, las cuales son benéficamente influenciadas por la lactancia materna exclusiva. (Jost, Lacroix et al., 2015)

El periodo de LME constituye una oportunidad única de manipular la microbiota intestinal en favor de la salud de los neonatos. (Goldsmith, O'Sullivan, Smilowitz & Freeman, 2015) La leche materna presenta una composición compleja y dinámica, influenciada por la edad gestacional al momento del parto, el periodo de lactancia y la dieta de la madre; difiere mucho con la composición de la fórmula en cuanto a concentración de nutrientes, y aún más importante, por la presencia de factores de crecimiento, citocinas, inmunoglobulinas y enzimas encargadas de la digestión. (Guaraldi & Salvatori, 2012)

Los beneficios a largo plazo han ganado atención en las últimas décadas, pues es bien conocido que la lactancia materna puede brindar protección contra enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis necrotizante, leucemia, sepsis en RN prematuros y diabetes, así como obesidad y otros síndromes metabólicos. (Le Huërou-Luron et al., 2010)

La alimentación del lactante debería considerarse un tema de salud pública y no solo una elección según el estilo de vida de cada familia, puesto que tiene un gran impacto nutricional, económico y psicológico que resulta beneficioso tanto para la madre como para el hijo.

Para el desarrollo de la estancia en el Verano de la Ciencia, se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de hacer una búsqueda y selección de instrumentos que servirían para cuantificar los componentes de la microbiota intestinal en neonatos. Esta revisión sirvió de base para realizar la comparación de la microbiota intestinal entre neonatos con y sin lactancia materna exclusiva, esto será un parteaguas en el desarrollo futuro de un protocolo de investigación el cual pretende describir la microbiota intestinal de los neonatos del Centro Integral de Maternidad, programa instaurado en un Hospital privado de la ciudad de Saltillo, Coahuila. Esto con el propósito de incrementar, en mayor medida, la alimentación por lactancia materna exclusiva y fomentar el apego a la misma hasta la edad recomendada por la OMS, sin dejar de resaltar el rol de enfermería y su labor como promotora de la LME.

Metodología utilizada por los autores para la toma de muestras

La metodología empleada por los diversos autores es muy similar. La mayoría de los autores revisados utilizaron diseños descriptivos, de cohorte prospectivo, longitudinales y observacionales no aleatorios donde sólo los estudios realizados en infantes pretérmino (Cong et al., 2016, 2017) tuvieron cierta intervención por parte de los investigadores. En la mayoría de los estudios, se incluyeron madres que cursaron un embarazo sano - independientemente del tipo de parto - y bebés que nacieron sin complicaciones; aun así, se contrastaron los resultados de dichos estudios con los realizados por Cong et al. en los años 2016 y 2017, en los cuales estudia la microbiota intestinal de infantes pretérmino y destaca la importancia de la lactancia materna exclusiva como un factor clave en la disminución del riesgo de sepsis neonatal o enterocolitis necrotizante.

En cuanto a la toma de muestras se encontraron diferencias no significativas en los tiempos. Mastromarino et al. (2014) colectaron muestras de meconio y la evacuación de un mes después. Por su parte, Martin et al. (2016) utilizó tiempos más cortos de toma entre cada muestra (al considerar las evacuaciones de 2 días, 1 semana, 3 y 6 meses de vida, y 1 semana después del destete) pero coincide con Mastromarino et al. (2014) al recabar muestras del meconio y de la evacuación al mes de vida. En sus dos estudios realizados en 2016 y 2017 en infantes pretérmino, Cong et al. recolectaron muestras diariamente, desde el nacimiento y hasta los 30 días de vida. Stearns et al. (2017), por su parte, estudiaron la microbiota intestinal a lo largo de 1 año, poniendo en evidencia la importancia de ciertos factores étnicos o culturales en la formación y maduración de la microbiota intestinal.

Es importante resaltar la importancia de considerar la microbiota del meconio, pues esto ayudará a contrastar las tomas posteriores, cuando la lactancia (ya sea con fórmula o materna) ya se encuentra establecida, aproximadamente a los 6 meses de vida, o a los 12 meses, edad en la que la microbiota intestinal se encuentra ya bien establecida, cerca de lo que podría ser la microbiota intestinal adulta. (Palmer, Bik, DiGiulio, Relman & Brown, 2007).

Los instrumentos utilizados para la toma de muestras en los distintos artículos revisados no difieren mucho unos de otros pues, como es el caso de Cong et al. y Martin et al., utilizaron espátulas estériles desechables para el manejo de las muestras fecales, y Stearns et al., que optaron por una espátula de acero inoxidable. Los contenedores más utilizados para el almacenamiento de las muestras fueron tubos y bolsas estériles. Todas las tomas se realizaban durante el cambio del pañal y, en los estudios donde se requería la toma de muestras en periodos cortos de tiempo, las madres eran instruidas para el manejo de la misma.

Los estudios sugieren almacenar las muestras a -80°C en caso de que su procesamiento no sea inmediato, para evitar alteraciones en la microbiota presente. En el caso de Martin et al. (2016) las muestras fecales fueron colocadas en tubos estériles que contenían RNAlater, una solución estabilizadora que permite almacenar tejidos sin necesidad de congelar las muestras y, por ende, no pone en peligro la calidad o cantidad de ARN celular.

Resultados de la comparación de la microbiota intestinal

La leche materna es una fuente temprana de bacterias y de nutrimentos introducidos al intestino del bebé dentro de las primeras semanas después del nacimiento. (Pannaraj et al., 2017)

En el estudio realizado por Sang A Lee et al. (2015) se encontraron 3 filos – o troncos – predominantes en la microbiota de los neonatos: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. La Actinobacteria fue el filo predominante con un promedio de 70.55% del total de lecturas. Estos resultados parecen tener similitud con el análisis realizado por Cong et al. (2016) en infantes prematuros, el cual arrojó secuencias pertenecientes a 5 filos, 11 clases, 42 familias y 64 géneros. El filo Proteobacteria fue el más abundante, sumando el 54.3% del total de lecturas, seguido por el filo Firmicute con 39.2%, Bacteroides con 3.9%, Actinobacteria con 2.4% y Fusobacteria con un 0.2%, un filo que, hasta el momento, no se había detectado en estudios realizados en infantes a término.

Palmer, Bik, DiGiulio, Relman & Brown (2007) también coinciden en este aspecto, pues en su estudio destacan las Proteobacterias, Bacteroides, Firmicutes, Actinobacterias y Verrumicrobia como las colonias predominantes en la microbiota colónica.

La colonización con lactobacilos y bifidobacterias en el intestino inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, tales como Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium, Yersina enterocolitica, y Clostridium perfringens. (Sang A Lee et al., 2015)

Dentro de los infantes lactados exclusivamente con leche materna, Sang A Lee et al. (2015) exponen a la familia Bifidobacteriaceae como la más predominante, abarcando el 70.12% de sus muestras, comparado con el 36.61% encontrado en los bebés lactados con fórmula, los cuales tuvieron una proporción de Enterobacteriaceae mayor que los amamantados, con un 12.64% y 3.17% respectivamente, resultado que casualmente coincide con el realizado por Cong et al. en 2016 donde encontraron que los infantes pretérmino lactados con leche donada y/o fórmula presentaron una microbiota menos compleja en las primeras muestras, dominada por Enterobacteriales durante los primeros 30 días de vida. En este caso, el incremento de la diversidad microbiana intestinal fue lento conforme pasaba el tiempo. La familia Actinomycetaceae fue la segunda más predominante en el grupo con LME con un 3.73%. (Sang A Lee et al., 2015) Esto coincide con el resultado obtenido por Stearns et al. (2017) quienes encontraron una mayor abundancia del género Bifidobacterium en los bebés lactados con leche materna, pues las madres asiáticas del sur se encontraban amamantando durante el periodo de desarrollo del estudio, encontrándose de igual forma otros géneros como Lactococcus, Streptococcus y Enterococcus.

El único estudio que difiere de estos resultados fue el realizado por Cong et al. (2017), pues en este, destacó la baja concentración de Bifidobacterias en el grupo de infantes pretérmino lactado exclusivamente con leche materna, pero esto reafirma lo mencionado anteriormente: que la composición de la leche depende mucho de la edad gestacional al momento del parto, pues en niños a término, estas bacterias son el principal grupo encontrado. Esto también se puede deber a que la leche materna de las madres que dieron a luz a infantes pretérmino tiene una mayor cantidad de proteínas, grasas, carbohidratos y componentes inmunológicos, pero una menor diversidad de oligosacáridos, componente clave para el crecimiento de bifidobacterias. La carencia de los oligosacáridos puede ser la razón de que microorganismos patógenos como E. coli, Helicobacter jejuni, Shigella, V. cholerae y especies de Salmonella se adhieran en la superficie epitelial intestinal de los neonatos. Este riesgo aumenta si no se implementa la alimentación con leche propia de la madre, pues como se menciona anteriormente, las bifidobacterias y los lactobacilos inhiben el crecimiento de estos microorganismos patógenos. (Sang A Lee et al., 2015)

Sang A Lee et al. (2015) destaca la presencia de Staphylococcus epidermis en la microbiota de los lactantes amamantados, sugiriendo que su presencia se asocia al contacto con la piel de la madre durante el amamantamiento. Esta hipótesis podría confirmarse con el resultado obtenido por Pannaraj et al. (2017) pues en su estudio menciona la presencia de Firmicutes (Staphylococcaceae y Streptococcaceae) como filo dominante en la piel areolar de las madres. De este filo, Sang A Lee et al. (2015) muestra la presencia consistente de la familia Streptococcaceae con un 17.31% y Lactobacillaceae con un 8.02% en los infantes amamantados. En los infantes lactados con fórmula, en cambio, destacan las familias Streptococcaceae (28.86%), Veillonellaceae (6.12%), Enterococcaceae (4.96%), Lactobacillaceae (2.56%) y Coprobacillus (1.94%). Azad et al. (2013) identifican 2 familias bacterianas pertenecientes al filo Firmicutes y que estaban significativamente sobrerepresentadas en los lactantes que no recibían leche materna: Peptostreptococcaceae

y Verrucomicrobiaceae. La familia Peptostreptococcaceae incluye *C. difficile*, un patógeno asociado con la enfermedad entérica y atópica. Este patógeno es más comúnmente detectado en los niños formulados que en los lactantes amamantados.

Un estudio realizado en 2005 (Ley, Bäckhed, Turnbaugh, Lozupone, Knight & Gordon) menciona que la presencia del filo Firmicute en cantidades abundantes en la microbiota intestinal, se encuentra relacionado con el desarrollo de obesidad. La lactancia materna continua como la fuente primaria de ingesta de leche después de la introducción de sólidos, pareció suprimir los aumentos en múltiples familias dentro del filo Firmicutes. (Pannaraj et al., 2017)

Un dato importante fue el encontrado por Martin et al. (2016); en su estudio detectaron una mayor cantidad de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* en el meconio de infantes nacidos por cesárea, lo cual sugiere que la colonización de ciertas bacterias podría iniciar antes del nacimiento, lo cual deja abierta la interrogante sobre si el feto es realmente estéril.

Pannaj et al. (2017) expone en su estudio que las bacterias de la leche materna influyen el establecimiento y desarrollo de la microbiota de los bebés con un impacto continuo. Así mismo, menciona que el cese de la lactancia materna, más que la introducción de alimentos sólidos es el mayor factor que influye en el desarrollo de la microbiota adulta. Esta idea concuerda con la establecida en el estudio realizado por Koenig et al. en 2011 que resalta el “destete” como el siguiente paso para la maduración de la microbiota intestinal de los infantes.

Es importante mencionar los resultados obtenidos por Azad et al. en su estudio realizado en 2015, donde muestran que, a los 3 meses de edad, los bebés que fueron expuestos a una profilaxis con antibióticos antes del parto presentaron una deficiencia de Bacteroidetes, pero se encontró mayor abundancia de *Enterococcus* y Firmicutes. Lo más destacado de este estudio es que, a los 3 y 12 meses de edad, y con la ayuda de la lactancia materna exclusiva (mínimo por 3 meses) cambió la composición de la microbiota intestinal, enriqueciéndose la población de Proteobacteria y Actinobacteria. Estos cambios no se observaron en infantes de 12 meses que no fueron amamantados.

El estudio realizado por Sang A Lee et al. (2015) fue el único de los estudios revisados que contrastó los probióticos entre los dos grupos de infantes (lactados con leche materna y lactados con fórmula). En su comparación realizada de probióticos entre ambos grupos, se demostró que los probióticos en las muestras de los lactados con leche materna fueron más abundantes que en las muestras de los lactados con fórmula, con un 93.8% y un 65.6% respectivamente. La proporción de *B. longum* fue más alta en los lactados con leche materna, con un 70.0%, que en los lactados con fórmula, con un 34.2%, y la proporción de *L. gasseri* fue también más alta en los lactados con leche materna con un 7.9%. Por otro lado, la proporción de *S. salivarius* de los lactados con fórmula fue mayor que en los lactados con leche materna, con un porcentaje de 27.2%.

INTRODUCCIÓN

Durante la estancia del 19° Verano de la Ciencia, se realizó una revisión bibliográfica tomando en cuenta 35 artículos de fechas recientes, de los cuales 8 fueron ensayos y 27 fueron artículos de investigación. De esta cantidad, se descartaron 15 artículos, pues, a pesar de tener un enfoque en la microbiota intestinal de los infantes, no guardaban relación alguna con la lactancia materna exclusiva y no exclusiva, por lo tanto, no cumplían con los requerimientos de selección.

En los 12 estudios restantes utilizados para realizar la comparación, uno abarca múltiples factores (entorno, dieta, uso de antibióticos, cultura), 2 de ellos hacen comparación de acuerdo a la etnia o raza, uno aborda el tema de la profilaxis con antibióticos intrapartum y cómo la lactancia materna minimiza sus efectos sobre la microbiota intestinal de los neonatos en comparación con la fórmula, y 2 son estudios realizados en infantes pretérmino y de los cuales, uno considera el género como variable.

Como parte de las actividades de esta estancia, se estuvo trabajando en una base de datos de mujeres embarazadas atendidas en el Centro Integral de Maternidad (CIM) del Hospital Universitario de Saltillo, las cuales se considerarán como posibles sujetos de estudio para el desarrollo del protocolo de investigación, considerado ambicioso por algunos investigadores, el cual se pretende realizar en un futuro cercano y tiene como propósito el describir la microbiota intestinal de los neonatos bajo distintos regímenes alimenticios al nacimiento, a los 30 días de vida y al año de edad. De este modo, será posible destacar la importancia de la lactancia materna en la protección y buen desarrollo de la salud de los niños.

CONCLUSIÓN

Con esta revisión de la literatura queda un poco más claro cuál es el rol de este “órgano” tan complejo denominado microbiota intestinal en la salud del ser humano y, a pesar de las numerosas similitudes encontradas, debemos tener en cuenta que la microbiota intestinal es variable de individuo a individuo. (Palmer et al., 2007) Esto deja una interrogante que muchos estudios se han esforzado en responder: ¿Hasta que grado una microbiota es normal?

Este tema es relativamente nuevo y ha propiciado el resurgimiento de la LME en los países desarrollados y en desarrollo, destacando aquí las fallas del personal de salud que se encuentra en constante contacto con madre-hijo. La práctica diaria demuestra que el fracaso de la lactancia materna es responsabilidad del personal de salud, puesto que debe ser este el que se encuentre correctamente capacitado en técnica y conocimientos para poder ayudar a la madre a realizar una lactancia materna informada y eficaz. También es responsabilidad de las instituciones de salud implementar programas como el Apego Inmediato y los Bancos de Leche, así como vigilar que se cumplan los lineamientos internacionales que apoyan la LME.

Desde un punto de vista personal, la promoción de la lactancia materna debe hacerse desde el ámbito de la atención primaria y se debe realizar en dos etapas: 1) prenatalmente: clases de preparación al parto, visitas prenatales, y 2) posnatalmente: fomento del apego a la LME, realizado principalmente por el personal de enfermería y de pediatría, informando a la madre sobre los beneficios de la misma.

Enfermería es quien se encuentra en un contacto directo y constante con las madres, por lo tanto, conllevan una gran responsabilidad en el fomento de la LME, así como en la detección de necesidades y la aplicación del proceso enfermero para la resolución eficaz de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de antemano a la MCE Magdalena Delabra Salinas, por el apoyo brindado en cada asesoría.

Al Dr. Raúl Adrián Castillo Vargas, Director de la Facultad de Enfermería de la UAdeC y al Dr. Alfonso Carrillo González, Director del Hospital Universitario de Saltillo, por permitirnos trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. Atenas Rodríguez Valdez, Coordinadora del Centro Integral de Maternidad del Hospital Universitario de Saltillo, por sus atenciones y por permitirnos trabajar con las pacientes atendidas en dicho centro.

Al Dr. José Ignacio García de la Torre, Jefe del Dpto. de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Saltillo, por facilitarnos el acceso al departamento.

Y por último al comité organizador del 19° Verano de la Ciencia, por la oportunidad brindada para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guaraldi, F. & Salvatori, G. (2012) "Effects of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns" en *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 2, Art. 94, Octubre, [pp. 1-4].
- Le Huërou-Luron, I., Blat, S. & Boudry, G. (2010) "Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects" en *Nutrition Research Reviews*, Núm. 23, Mayo, [pp. 23-26].
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2015) "Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health" en *Nutrition Reviews*, Núm. 7, Vol. 73, [pp. 426-437].
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, J. & Sánchez Castañeda, N. (2014) "La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido" en *Revista Cubana de Pediatría*, Núm. 4, Vol. 86, [pp. 502-513].
- Goldsmith, F., O'Sullivan, A., Smilowitz, J. T. & Freeman, S. L. (2015) "Lactation and Intestinal Microbiota: How early diet shapes the infant gut" en *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, doi: 10.1007/s10911-015-9335-2 PMID: 26227402.
- Pannaraj, PS. et al. (2017). "Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome." en *JAMA Pediatrics*, Núm. 7, Vol. 171, Mayo, [pp. 647-654]. doi:10.1001/jamapediatrics.2017.0378
- Sang A Lee et al. (2015). "Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing" en *Nutrition Research and Practice*, Núm. 3, Vol. 9, [pp. 242-248].
- Azad, M. B. et al. (2013). "Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months" en *Canadian Medical Association Journal*, Núm. 185, Vol. 5, Marzo, [pp. 385-394].
- Koenig, J. E., et al. (2011). "Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome" en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Núm. 1, Vol. 108, Marzo, [pp. 4578-4585] www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000081107
- Azad, M.B. et al. (2015). "Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study" en *BJOG*, Septiembre, [pp. 1-11] doi: 10.1111/1471-0528.13601.
- Mastromarino, P. et al. (2014). "Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces" en *BioMetals*, Núm. 3, Vol. 27, Junio, doi: 10.1007/s10534-014-9762-3.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A. & Brown, P.O. (2007). "Development of the human



infant intestinal microbiota” en PLoS Biology, Núm. 5, Vol. 7, Junio, [pp. 1556-1573]. doi:10.1371/journal.pbio.0050177

Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., et al. (2016) "Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota" en PLoS ONE, Núm. 11, Vol. 6, Junio, [pp. 1-30] doi:10.1371/journal.pone.0158498

Stearns, J., et al. (2017). "Ethnic and diet-related differences in the healthy infant microbiome" en Genome Medicine, Núm. 9, Vol. 32, Marzo [pp. 1-12].

Cong, X. et al. (2017). "Influence of Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants" en Nursing Research, Núm. 2, Vol. 66, Marzo-Abril, [pp. 29-34].

Cong, X. et al. (2016). "Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender" en PLoS ONE, Núm. 11, Vol. 4, Abril, [pp. 1-19] doi:10.1371/journal.pone.0152751

Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D. & Gordon, J.I. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology" en Proceedings of the National Academy of Sciences, Núm. 31, Vol. 102, Agosto, [pp. 11070-11075] www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0504978102

ESTADO NUTRICIONAL, Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES SOCIALES, DEPRESIÓN, IMAGEN CORPORAL, AL ESTILO DE VIDA, ACTIVIDAD FÍSICA Y CALIDAD DEL SUEÑO DEL ADULTO MAYOR DE LA COMARCA LAGUNERA DE COAHUILA Y DURANGO.

ESTUDIANTE: ANA MARIA GARCIA CAREAGA Y RESPONSABLE DEL PROYECTO: D.E. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ RINCÓN.

RESUMEN

El presente reporte habla sobre los resultados de la prueba piloto relacionada con el estado nutricional y su asociación con factores sociales, depresión, imagen corporal, estilo de vida, actividad física y calidad del sueño del adulto mayor de la comarca lagunera de Coahuila y Durango, en un grupo poblacional de diferentes clases sociales, se aplicaron diferentes pruebas para analizar la percepción que tiene el adulto mayor de sí mismo, la capacidad que tiene para sentir satisfacción en su vida actual, así como la actividad física y la calidad en su alimentación. De igual manera se evalúa la capacidad de verla realidad, según sus patologías y su estado de ánimo ante lo vivido.

ABSTRACT

The present report discusses the results of the pilot test related to nutritional status and its association with social factors, depression, body image, lifestyle, physical activity and sleep quality of the older adult of the Coahuila and Durango Lagunera region, In a population group of different social classes, different tests were applied to analyze the elderly's perception of himself, his ability to feel satisfaction in his current life, as well as physical activity and quality in his diet. Likewise the ability to see reality is evaluated, according to their pathologies and their state of mind before the lived.

INTRODUCCIÓN

La leche humana es una mezcla compleja de grasa, proteínas, enzimas, citocinas, anticuerpos y nutrientes A nivel mundial se vive una realidad ineludible y es que la composición poblacional se está modificando aceleradamente; expresado de manera sintetizada se observa como cada vez la población infantil disminuye y la población de adultos mayores crece creando lo que se ha denominado “la transición demográfica” misma que plantea retos a los cuales los países y sus gobiernos tendrán que enfrentarlos con acciones muy específicas. Los adultos mayores representan pues un desafío a las políticas públicas de salud siendo un problema a abordar con mucha seriedad el estado nutricional.

Uno de los problemas más graves que se enfrenta en el país es la obesidad de la población lo cual incrementa la problemática de salud acentuando las enfermedades crónico degenerativas; en 2006 se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que ubicó a México como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global. En esta investigación realizada muestra que si bien es cierto la obesidad es considerada como una epidemia mundial; en México hay regiones donde el problema es más evidente la región norte del país tanto en hombres como en mujeres es donde se observan los valores más altos de IMC y circunferencia de cintura en comparación con las demás regiones del país. (Vaquera S, 2013)

En esta prueba piloto en 24 adultos mayores se pretende describir algunos elementos que se encuentran alrededor del estado nutricional del adulto mayor como el estilo de vida, la depresión y planteando evidencia el Índice de Masa Corporal (IMC).

MARCO TEÓRICO

El estado de Coahuila se localiza en el noreste de México y comparte una frontera de 512 kilómetros con Texas. Tiene 38 municipios. Su capital es Saltillo. Se limita en el norte por Texas, (EE.UU.), en el este por Nuevo León, en el sur por San Luis Potosí y Zacatecas, en el oeste por Durango y Chihuahua. (Avila Curiel A., 2005)

Actualmente, la población del estado de Coahuila representa 2.4% de la nacional, con 2.75 millones de habitantes (Coahuila, 2015) así mismo en y de acuerdo con las cifras que proporciona el apartado de salud en el estado tiene un poco más de 234 mil personas adultos mayores que equivale al 8.6 % de la población total del estado. Se estima que para el año 2030 el 17.5% de la población tendrá 60 años o más y que para el 2050 aumentara a un 28%, es decir, se tendrá una población con un mayor grado de envejecimiento y una consecuente disminución en sus capacidades (Salud, 2011). Ante el aumento previsto en la esperanza de vida, el envejecimiento y la disminución paulatina de capacidades que ello implica, se convierte en un problema social de magnitud cada vez mayor.

Uno de los problemas más graves que se enfrenta en el país es la obesidad de la población lo cual incrementa la problemática de salud acentuando las enfermedades crónicas degenerativas; en 2006 se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que ubicó a México como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global. En esta investigación realizada muestra que si bien es cierto la obesidad es considerada como una epidemia mundial; en México hay regiones donde el problema es más evidente la región norte del país tanto en hombres como en mujeres es donde se observan los valores más altos de IMC y circunferencia de cintura en comparación con las demás regiones del país. (Vaquera S, 2013)

De acuerdo a lo que publica ENSANUT 2012 en el Estado la tendencia en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los últimos seis años se observa un incremento de 17.9% en la prevalencia de obesidad en el caso de los hombres y un incremento de 11.8% en el caso de las mujeres en adultos mayores de 20 años comparado con la edición de 2006. Dejando manifiesto que en Coahuila el sobrepeso y la obesidad fueron un problema de salud pública que afectó a 7 de cada 10 hombres y mujeres mayores de 20 años. (Pública, 2013)

La depresión en el adulto mayor es muy frecuente, en publicaciones recientes se detalla que en el adulto mayor en promedio el 10% sufre depresión siendo esta asociada a factores de riesgo como fragilidad, deterioro cognitivo entre otros. (OMS 2015)

La imagen que cada individuo tiene apariencia física es muy subjetiva y en muchos casos difiere de lo que los demás observan con claridad, en ese proceso de autopercepción intervienen diferentes factores en ocasiones asociados al estado depresivo que a su vez depende del estado nutricional. (Marrodán 2007)

Pregunta de investigación

¿Cuál es el grado de asociación entre el estado nutricional del Adulto Mayor, la autopercepción de la imagen corporal, la depresión y la calidad del sueño y las variables sociodemográficas?.

Objetivo general:

Determinar el grado de asociación entre el estado nutricional del adulto mayor la autopercepción de la imagen corporal, la depresión y la calidad del sueño y las variables sociodemográficas?.

MÉTODOS Y MATERIALES.

La presente investigación corresponde a un estudio de tipo cuantitativo, descriptivo, de corte transversal. Muestra:

La muestra de estará conformada por 150 adultos mayores de la comarca lagunera de Coahuila y Durango, o a quienes previa firma del consentimiento informado, se aplicará los instrumentos. El tipo de muestreo que se utilizará será No probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión:

Para hacer parte de la población objeto de estudio de esta investigación, serán tenidos en cuenta los siguientes requisitos indispensables:

- Ser mayor de 60 años de edad.
- Ambos sexos
- Que acepten participar en el estudio

Criterios de exclusión:

- Quien decida abandonar el estudio.
- Que no firmen el consentimiento informado.

RESULTADOS

Se realizó un estudio descriptivo observacional con 24 participantes de los cuales 9 eran del sexo masculino a lo que equivale a un 37.5 % y 15 del sexo femenino obteniendo un 62.15 %.

Respecto al estado civil, 11 son casados lo cual representa un 45.8 %, 6 de ellos son viudos con un 25%, 4 divorciados es el equivalente al 16.7%, 2 participantes con un estatus de separados con un 8.3% y 1 soltero el cual ocupa el 4.2%.

En cuestión de los hijos, los datos que se obtuvieron fue que en promedio los participantes tuvieron 3 hijos, obteniendo un resultado de 3.29% de promedio.

El rango de edad oscila entre los 60 y 88 años, con una mediana de 71 años.

El promedio del peso corporal, es un rango entre 50 y 90 kg, el promedio del peso es de 69 kg en relación a su talla que es 1.48 y 1.8, siendo el 1.63 el promedio de esta.

Con respecto al Índice de Masa Corporal se encuentra entre 17 y 37, con una mediana de 26.

El 75 % de los entrevistados profesan la religión católica, el 12.5% la religión Cristiana y el 12.55 ninguna. El estado emocional 14 de los participantes se encuentra en un estado normal con un 41.7% y 10 entrevistados con depresión lo que abarca un 41.7 %, de acuerdo al instrumento aplicado y tomando en cuenta los criterios

de Yesavage.

Se realizó una correlación entre el estado civil y la depresión, a lo cual no se obtuvo una significativa estadística.

En relación con el sexo y la depresión no se encontraron relación estadística alguna.

En base a los resultados obtenidos en la prueba Fantastic, que es el instrumento que mide el estilo de vida, se encontró que el 20% de la poblacional estudiada, se encuentra en Zona de Peligro y el 18% en Zona de Riesgo, y solo el 4% en Adecuado.

CONCLUSIONES.

Al realizar la prueba piloto enfocada en el estado nutricional del paciente, después de la aplicación de las pruebas y la medición de los participantes, uno de los resultados tiene enfoque en el IMC.

De un total de 24 participantes, se obtuvo como resultado que 8 de ellos se encuentran dentro de su peso normal, en un rango de 17 a 25 puntos de IMC. 13 de los participantes se encuentran con sobrepeso, en un rango de 25.46 a 29.04 puntos de IMC. 2 de los participantes se encuentran en obesidad tipo I, en un rango de 31 a 34 puntos de IMC. 1 de los participantes se encuentra en obesidad tipo II, en un rango de 36 puntos de IMC.

Podemos concluir que el mayor porcentaje de participantes se encuentran fuera de su peso y su estado nutricional no fue el correcto a lo largo de su vida o a causa de alguna enfermedad, que en la actualidad se ve reflejado.

BIBLIOGRAFÍA.

- J, D. I.-B. (2010). FUNCIONALIDAD PARA LAS ACTIVIDADES DE LA VIDA DIARIA EN EL ADULTO MAYOR DE ZONAS. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica, 1-4.
- Coahuila, G. d. (2015). Plan Estatal de Desarrollo. Estado de Coahuila. Saltillo Coahuila: Gobierno del Estado de Coahuila.
- Geriatría y Gerontología para el médico internista. Eduardo Penny Montenegro y Felipe Melgar Cuellar. La Hoguera Investigaciones, 2012, 1ra edición.
- Nutrición en el Adulto Mayor. Revista Médica Herediana ISSN: 1018-130X, Universidad Peruana Cayetano Heredia, San Martín de Porres, Perú.

EFECTO DEL ACEITE DE KRILL SOBRE LA CONDUCTA ALIMENTICIA DE RATAS MACHO ADULTAS SOMETIDAS A RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO DURANTE SU DESARROLLO INTRAUTERINO

Ureño Segura Magali Irais. Flores Mancilla Leopoldo Eduardo

RESUMEN

La obesidad es un problema que puede originarse por deficiencias nutricionales durante la vida intrauterina, provocar nacimientos prematuros y modificar en la vida adulta la conducta alimenticia (CA). Poco se conoce de tratamientos como el aceite de krill que pudieran contrarrestar alteraciones de la CA en ratas que padecieron restricción de crecimiento intrauterino (RIU). Tres grupos (N=5 X grupo) de ratas adultas con RIU, el grupo Krill suplementado diariamente con 300 mg/kg de peso de aceite de Krill, el grupo Palma con 300 mg/kg de peso de aceite de Palma y el grupo Control con 300 ul de vehículo, a cada animal se implantan electrodos en el núcleo Arcuato del hipotálamo y 24 hs 30 min después de privación de alimento son evaluadas conductual y electroencefalográficamente.

ABSTRACT

Obesity could be origin by intrauterine deficiencies, early delivery and altered alimentary induced behavior (AB) in adulthood, little know of preventive treatments they could be counteract abnormal AB in adults rats that they suffered intrauterine growth restriction (RIU), groups (N = 5 X group) of adult rats with RIU, the Krill group supplemented daily with 300 mg / kg of Krill oil, Palm group supplemented with 300 mg / kg of palm oil and Control group supplemented with 300 ul of vehicle, they were implanted electrodes in the nucleus Arcuatus of the hypothalamus, 24 hs 30 min after food restriction were evaluated on AB and electroencephalographic activity.

INTRODUCCIÓN

El análisis conceptual de la obesidad puede ser tan diverso dependiendo del enfoque con que se aborde. Su definición varía desde el concepto más claro y simple (alteración de la composición corporal caracterizada por un exceso de grasa), hasta la más compleja como el “desequilibrio entre el aporte y el gasto energético que es producido por una serie de alteraciones genéticas, bioquímicas, dietéticas y conductuales” (Hernández, 2004). En la actualidad la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México es aproximadamente del 71.4% con sobrepeso 38.8% y obesidad un 32.4%. (Barquera et. al., 2016).

Retomando el concepto de obesidad, en cuanto a las alteraciones genéticas en la década pasada se ha reportado la existencia de más de 600 genes y regiones cromosómicas implicadas en la obesidad (González, 2011). En donde mutaciones de MC4R (Receptor de melanocortina 4) representan aproximadamente el 6% de obesidad severa (Simpson, Martin & Bloom, 2009), mientras que los factores nutricionales conllevan a alteraciones bioquímicas. Se sabe que los ácidos grasos omega-3 pueden ser obtenidos de diversas fuentes y deben ser agregados a la dieta diaria. El consumo de peces marinos y mariscos en general siempre ha sido recomendado por varias autoridades médicas como una intervención nutricional a largo plazo para preservar la salud y prevenir enfermedades. La mayor parte de los beneficios proporcionados por el consumo de pescados y mariscos proviene de la absorción adecuada de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6, y antioxidantes (Barros, Poppe, & Bondan, 2014; Tur et al, 2012). El krill es una rica fuente de proteína de alta calidad que contiene todos los aminoácidos esenciales, con la ventaja sobre otras proteínas animales de ser baja en grasa y una rica fuente de eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). Los niveles de antioxidantes en el krill son más altos que en los peces, lo que sugiere beneficios contra el daño oxidativo. Una hipótesis reciente concerniente no sólo a la obesidad, sino a muchos aspectos de salud en la etapa adulta, es que la susceptibilidad a enfermedades puede ser programada desde la vida fetal, se cree que la carencia alimenticia desde esta etapa tiene repercusiones cuando el sujeto crece, haciendo una programación cerebral creando así una predisposición a la obesidad, por esto se les puso a los animales en un proceso de restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) antes de ser estudiados. El método de ligadura bilateral uterina fue descrito por primera vez por Wigglesworth, este modelo utilizó ratas a las que se les hizo una o más ligaduras (en el día 17mo. de gestación) colocadas alrededor de los vasos uterinos cerca del extremo inferior del cuerno, asegurando con esto que el único suministro de sangre al cuerno es el derivado de la arteria ovárica. La reducción de peso puede ser tanto como 60%, generando así que los fetos tengan deficiencia de nutrientes durante y al finalizar el tiempo de gestación.

Se han considerado dos aspectos de importancia que anteceden a la obesidad y que suelen también presentarse desde la etapa fetal: el apetito y la saciedad, son mecanismos importantes de inicio temprano cuyo origen se encuentra en algunas estructuras neurales como el hipotálamo que interviene fundamentalmente en la regulación de la energía proveniente de los nutrientes (Palou et al., 2004). En el cerebro, el hipotálamo es una estructura en la que converge la integración de múltiples señales. El núcleo arqueado (Arcuatus), situado en el hipotálamo mediobasal (MBH), integra la regulación de las señales hormonales (tales como la insulina, la leptina, y la grelina) y combustibles metabólicos (tales como la glucosa y los lípidos) para modular la ingesta de

alimentos y equilibrio de energía. La alteración de la regulación de neuronas del núcleo Arcuatus (ARC), no sólo conduce a la obesidad, sino también altera la homeostasis de glucosa normal, aunque los mecanismos que subyacen a la disfunción neuronal aún no están claramente resueltas (Yang & Hotamisligil, 2008). Existiendo así una regulación a corto plazo (dada por señales mecánicas como la distensión gástrica producida por la entrada de alimento y señales químicas generadas por osmosensores y quimiorreceptores situados en el tracto gastrointestinal que responden a los productos de la digestión, así como la glucemia) y a largo plazo (dada por hormonas como la leptina, la insulina y la grelina, cuyo efecto está influenciado de manera substancial por las grasas ya sea saturadas o polinsaturadas como los ácidos grasos de cadena larga llamados omega-3, como el ácido docosahexanoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA). (Hernández & Sánchez, 2010). Los beneficios para la salud asociados con el consumo de omega-3 se explica por su capacidad para reducir triglicéridos en plasma, reducir la agregación plaquetaria y la presión arterial, y reducir el proceso de inflamación (Ramsvik et al., 2015). Los productos marinos como los aceites de pescado y de krill, son altos en contenido de omega.3, particularmente DHA y EPA, sin embargo el aceite de krill ofrece más ventajas que el aceite de pescado ya que tiene una molécula natural llamada astaxantina que es un carotenoide con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Los omega-3 han sido valorados específicamente en modelos de obesidad, por ejemplo, en ratones alimentados con dietas ricas en ácidos grasos insaturados se encontró una reducción en la expresión hipotalámica de marcadores de inflamación, en particular pI κ B- α , pJNK, TNF- α , SOCS3 e iNOS, mientras que aumentó la expresión de la citocina antiinflamatoria, IL-10; asimismo se redujo la expresión de proteínas apoptóticas, mientras que aumentó la expresión hipotalámica de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Estos efectos fueron acompañados por reducciones en las expresiones de ARNm de neuropeptido Y (NPY) y melancortina (MCH) por el aumento de POMC (inhibidor de la ingesta al expresarse la proopiomelanocortina) y CART (transcrito regulado por anfetamina y cocaína). (Cintra et al, 2012).

La lesión en estructuras que procesan los mecanismos de POMC y CART como el núcleo ventromedial, área clave en la ingesta para alimentos sólidos y líquidos produce hiperfagia y obesidad por predominio del centro del hambre y bajo el efecto de neuromoduladores orexígenos (NPY, noradrenalina, galanina, GABA, opiáceos, etc.) induce un aumento de la ingesta, en contraste con la acción de anorexígenos como la colecistoquinina 5-hidroxitriptamina, etc. que producen disminución de la ingesta (Sorlí, 2008; González, Ambrosio & Sánchez, 2006), particularmente el núcleo arcuato (ARC), clave en la regulación del apetito, contiene dos circuitos neuronales, POMC y CART, y el circuito orexigénico al expresarse el NPY y AGRP. En lesiones del ARC da lugar a la obesidad e hiperfagia (Sorlí, 2008; Simpson, Martin y Bloom, 2009). Sin embargo, poco se conoce de la actividad eléctrica cerebral en las estructuras cerebrales antes mencionadas durante el proceso de saciedad alimenticia y particularmente bajo el esquema de retraso de crecimiento intrauterino. Por lo tanto el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la suplementación a largo plazo del AK sobre la conducta de saciedad y actividad eléctrica (EEG) del núcleo ARC en ratas adultas que padecieron restricción de nutrientes durante la vida fetal.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales y dieta.- Se utilizaron 15 ratas Wistar adultas (400-500 gr) provenientes de grupos de madres a las que se les suplementó desde la pubertad, crecimiento, apareamiento y lactancia con aceite de palma, otro grupo con aceite de krill y otro con vehículo, a todas las madres se les sometió a retraso de crecimiento intrauterino mediante ligadura parcial de la arteria uterina media, posterior al destete los animales continuaron los tratamientos que se habían administrado a sus respectivas madres.

Grupo Krill: 5 ratas adultas las cuales se alojaron en jaulas de policarbonato (50 x 30 x 10 cm) con alimentación ad libitum con una dieta comercial (Chow-5001 Ralton-Purina®, USA) y suplementadas diariamente con 300 mg/kg por vía intragástrica (i.g.) de aceite de Krill (Omega krill/Neptune, CaN.)

Grupo Palma: 5 ratas adultas las cuales se alojaron en jaulas de policarbonato (50 x 30 x 10 cm) con alimentación ad libitum con una dieta comercial (Chow-5001 Ralton-Purina®, USA) y suplementadas diariamente con 300 mg/kg por vía intragástrica (i.g.) de aceite de Palma (SpectrumChem. MFG Corp, ® USA).

Grupo Control: 5 ratas adultas las cuales se alojaron en jaulas de policarbonato (50 x 30 x 10 cm) con alimentación ad libitum con una dieta comercial (Chow-5001 Ralton-Purina®, USA) y suplementadas diariamente con 300 mg/kg por vía intragástrica (i.g.) de agua.

Anestesia .- A cada uno de los animales se le indujo un periodo de anestesia mediante Pentobarbital Sódico (36mg/kg) vía i.p.

Una vez el animal anestesiado se procedió a colocar a la rata sobre el estereotáxico (KOF, instruments, USA), una vez fija la rata se procedió a hacer una incisión sobre la superficie dorsal de la cabeza, hasta el cráneo, se procede a limpiar perfectamente la zona para ubicar el punto medio, la línea Lambda y Bregma y poder así ubicar las coordenadas de la implantación. Para implantar en núcleo ARC, las coordenadas -3.6 anteroposterior, +3.4 tooth bar, -10 profundidad y -0.5 lateral. Una vez introducidos los electrodos, se procede a poner tornillos de tierra y de referencia, para así soldar ambos electrodos y los tornillos en un conector que se fija a la superficie del cráneo mediante acrílico dental.



Procedimiento de registro del electroencefalograma.- Las ratas se pusieron a restricción de alimento durante 23 hrs y media, después se procedió a registrarlas durante 5 min basales, 30 minutos con acceso a alimento y después 15min en estado post-ingesta de alimento. Se registró el tiempo de consumo de alimento, el número de eventos de contacto e ingestión de alimento.

RESULTADOS

Se evaluó por el análisis de varianza (ANOVA) para los resultados del alimento consumido correspondiente a los grupos, se encontró que el grupo Krill registró mayor consumo de este con una media de 26.056 gr por día y una desviación estándar de 37.363, mientras que el grupo palma cuenta con una media de 24.565gr consumidos al día, el grupo control arrojó una media de 23.574gr y una desviación estándar de 3.583 (Fig.1)

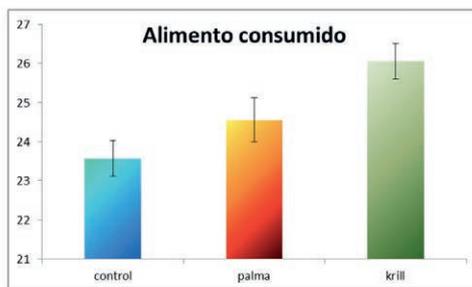


Figura 1.- Alimento consumido de las ratas sometidas a RIU.

Respecto al peso corporal de las ratas, el grupo palma tiene una media de 552.233gr con una desviación estándar de 66.808, mientras que el grupo krill cuenta con una media de 520.333gr con una desviación estándar de 37.363 y el grupo control cuenta con una media de 512.333gr y una desviación estándar de 41.494 (Fig. 2)

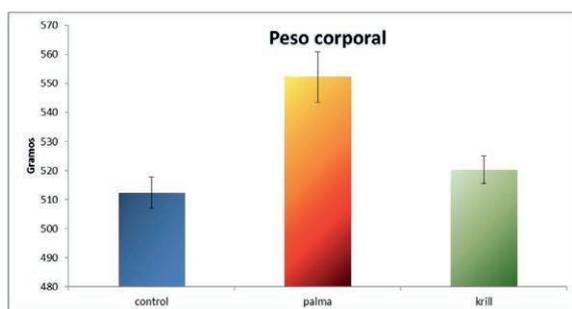


Figura 2.- Peso promedio de las ratas sometidas a RIU.

En cuanto al consumo posterior a restricción de alimento se encontró que el grupo krill consumió 6 gr, el grupo palma consumió en promedio 5.5gr y el grupo control 5 gr durante el tiempo de registro.

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación crónica de aceite de Krill sobre el peso y consumo de alimento en ratas sometidas a restricción de crecimiento en la vida intrauterina. Los resultados mostraron que el tratamiento crónico con aceite de Krill (un producto marino con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados del tipo ω -3 y astaxantina) se asoció en las ratas con RIU a un mayor consumo de alimento en comparación a las que fueron suplementadas con grasas saturadas (aceite de palma) y un grupo control. Por lo que respecta al peso corporal las ratas que fueron que recibieron suplementación con aceite de palma tuvieron un mayor peso corporal que el grupo control y el grupo krill, esto apesar de que este

último grupo consumió más alimento. Abordando el tema del consumo de alimento durante los registros es necesario continuar con estos para poder elaborar una estadística, también se obtuvo el electroencefalograma el cual posteriormente se analizará para ver su actividad eléctrica durante la alimentación.

CONCLUSIÓN

Con los datos obtenidos hasta el momento podemos decir que el grupo que se le daba aceite de krill, consumía más alimento, sin embargo el grupo alimentado con grasas saturadas como el aceite de palma tiene un mayor peso corporal, esto puede ser posiblemente al metabolismo que tiene cada grupo de grasas, generando mayor acumulación de grasa el aceite de palma. En cuanto a la saciedad, puede ser que el aceite de krill como ya se ha demostrado en algunas otras investigaciones, atenué el daño causado en el hipotálamo durante la restricción de crecimiento intrauterino, y por lo tanto no se vea reflejado en el consumo de la comida, sin embargo es importante evaluar la actividad eléctrica del NA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.Hernandez, G. A. & Sánchez, F. (2010). Tratado de nutrición. (Vol.1) Madrid: Médica-Panamericana.
- 2.Barquera, S., Campos, I., Hernández, L., Pedroza, A., & Rivera, J. (2013) Prevalence of obesity in Mexican adults 2015-2017. Salud Pública de México, 55(Suppl. 2), S151-S160.
- 3.González, E. (2011). Genes y obesidad: una relación de causa-consecuencia. *Endocrinología Y Nutrición*, 58(9), 492-496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2011.06.004>
- 4.Barros, M., Poppe, S. & Bondan, E. (2014). Neuroprotective properties of the marine carotenoid astaxanthin and omega-3 fatty acids, and perspectives for the natural combination of both in krill oil. *Nutrients*, 6(3),1293-1317.
- 5.Wigglesworth J. (1974). Animal model of growth retardation. *American Journal of Pathology*, 77(2), 347-350.
- 6.Palou, M., Bonet, M., Picó C. & Rodríguez A. (2004). Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra*, 48(2), 36-48.
- 7.Yang, Z. & Huffman, S. (2012). Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Maternal & Child Nutrition*, 9, 105-119. <http://dx.doi.org/10.1111/mcn.12010>
- 8.Ramsvik, M., Bjørndal, B., Bruheim, I., Bohov, P., & Berge, R. (2015). A Phospholipid-Protein Complex from Krill with Antioxidative and Immunomodulating Properties Reduced Plasma Triacylglycerol and Hepatic Lipogenesis in Rats. *Marine Drugs*, 13(7), 4375-4397. <http://dx.doi.org/10.3390/md13074375>
- 9.Cintra, D., Ropelle, E., Moraes, J., Pauli, J., Morari, J., & de Souza, C. et al. (2012). Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. *Plos ONE*, 7(1), e30571. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030571>
- 10.Sorlí, J. (2008). Obesidad y alteraciones metabólicas: factores genéticos y ambientales en población mediterránea española (Doctorado). Universitat de València.
- 11.Simpson, K., Martin, N., & Bloom, S. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 53(2), 120-128.
- 12.Hernández, M., Sanz, A., & Guevara, M. (2015). Circuitos cerebrales implicados en la cognición y la conducta (1ª ed.). Guadalajara, México.

ANTECEDENTES FAMILIARES DE DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER Y EL RIESGO DE CÁNCER DE MAMA

Ilse María Castro Loreda 1 y Carolina Ortega Olvera 2

RESUMEN

Los antecedentes familiares de cáncer se han descrito como factor de riesgo para la aparición de cáncer de mama. El objetivo del presente trabajo es identificar los antecedentes familiares de distintos tipos de cáncer en mujeres mexicanas en un estudio de casos y controles poblacionales, con 1000 casos incidentes de cáncer de mama y 1074 controles poblacionales. Se calcularon estadísticas descriptivas, para casos y controles tanto en las mujeres pre- como en las postmenopáusicas. Se estimaron las prevalencias de antecedentes familiares de cáncer en la población de estudio. En mujeres premenopáusicas, el antecedente de familiares en primer grado con cáncer fue de 20% en los casos y 16% en los controles. En las mujeres postmenopáusicas, los casos presentaron una prevalencia de 37.8% y los controles fue de 23.1%. Por lo que es importante indagar sobre los distintos tipos de cáncer y no solamente cáncer de mama al realizar historias clínicas.

ABSTRACT

Family history of cancer has been described as a risk factor for the onset of cancer. The objective of the present study is to identify the family history of different types of cancer in Mexican women. A population case-control study was conducted in Mexico. One thousand incident cases and 1074 matched control were included. The prevalence of a family history of cancer in the study population was estimated. In premenopausal women, the history of first-degree relatives with cancer was 20% in the cases and 16% in the controls. In postmenopausal women, the cases presented a prevalence of 37.8% and controls were 23.1%. We must investigate the different types of cancer when asses clinical evaluations.

Palabras Clave: Cáncer de mama, antecedentes familiares

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales (OMS; Weiderpass, Meo, & Vainio, 2011). Según datos de GLOBOCAN 2012, la tasa de incidencia de cáncer de mama fue de 35.4 por 100 000 mujeres. En cuanto a la mortalidad en 2012, las tasas ajustadas para cáncer de próstata fueron de 11.3 por 100 000 hab y la de cáncer de mama fue de 9.7 por 100 000 habitantes. Los tipos de cáncer que reportaron mayores tasas de mortalidad en México en 2012 fueron: cáncer de mama, próstata, cuello uterino, colorectal, pulmón, estomago, hígado, ovario, leucemia y cuerpo uterino (Ferlay et al., 2015).

Se han identificado diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama y se clasifican en cuatro grandes grupos: 1) biológicos, 2) iatrogénicos o ambientales, 3) de historia reproductiva, y 4) de estilos de vida (Norma Oficial Mexicana). Dentro de los biológicos, la genética juega un papel importante en la etiología del cáncer de mama. Se ha identificado mutaciones hereditarias en los genes BRCA1 o BRCA2, que están asociados con un mayor riesgo tanto de cáncer de mama y cáncer de ovario y se han asociado con un mayor riesgo de los cánceres de próstata y colorectal (Bethea et al., 2016). A su vez, se ha reportado que tener un familiar de primer grado con cáncer de mama duplica el riesgo de presentar cáncer (Pharoah, Day, Duffy, Easton, & Ponder, 1997). También se ha reportado que el antecedente familiar de cáncer de próstata, pulmón, ovario, colon o cáncer colorectal y sistema digestivo, se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama (Beebe-Dimmer et al., 2015; Bethea et al., 2016; Chen, Page, Chen, & Giovannucci, 2008; Foulkes et al., 1996; Negri, Braga, La Vecchia, Franceschi, & Parazzini, 1997; Palmer, Boggs, Adams-Campbell, & Rosenberg, 2009; Sellers et al., 1993; Sellers et al., 1994).

El objetivo del presente estudio es identificar los antecedentes familiares de distintos tipos de cáncer en mujeres mexicanas con cáncer de mama que participaron en un estudio de casos y controles poblacionales.

METODOLOGIA

El presente estudio es derivado de un estudio de casos y controles poblacionales "Factores de riesgo de cáncer de mama en México: patrones mamográficos, péptido C y factores de crecimiento, un estudio multicéntrico" (CAMA) Se incluyeron 1000 casos incidentes de mujeres de 35 a 69 años de edad, de la Ciudad de México, Veracruz y Monterrey, de 12 hospitales públicos (cinco del IMSS, dos del ISSSTE, y cinco de la Secretaria de Salud). Los criterios de inclusión para los casos fueron: a) Diagnóstico histopatológico de cáncer de mama; b) No haber recibido tratamiento previo (radioterapia, quimioterapia o antiestrogénicos) en los últimos 6 meses; y c) Ausencia de embarazo. El grupo control (n=1074) fue pareado a los casos de acuerdo a quinquenio de edad, afiliación a institución de salud y estado de residencia. Se realizaron entrevistas cara a cara en el hospital para los casos y en los hogares para los controles con la finalidad de obtener información sociodemográfica, de salud reproductiva, patologías mamarias, y el antecedente familiar de cáncer. Las tasas de respuesta

fueron de 94% para los casos y de 87% para los controles. Los detalles metodológicos de dicho estudio se han publicado previamente (Angeles-Llerenas et al., 2010).

Para construir la variable de antecedente familiar de cáncer de mama, se utilizó la pregunta: ¿A quién o a quienes de sus familiares les ha dado cáncer y de qué tipo? En las opciones de respuesta se incluyeron los siguientes tipos de cáncer: piel, pulmón, mama, colon, próstata, vejiga, huesos, cerebro, cuello uterino, matriz, esófago, riñón, leucemia, hígado, linfoma / enfermedad hodking, melanoma, mielomamúltiple, cavidad oral, labio o laringe, ovario, páncreas, estómago, testículo, garganta, tiroides y otros. Para agrupar las opciones de respuesta se utilizaron las tasas de mortalidad reportadas por GLOBOCAN en 2012 para México (Ferlay et al., 2015) y se consideraron aquellos tipos de cáncer en los cuales las prevalencia en la población de estudio fueron superiores al 5%. Finalmente los tipos de cáncer se agruparon en: 1) Colon 2) cuello uterino 3)estomago 4)leucemia 5) mama 6) matriz 7)próstata 8)pulmón 9)ovario 10) cavidad oral , garganta, labio o laringe y esófago 11) hígado, páncreas, riñón, vejiga 12) piel, melanoma, en la categoría de otros se incluyó a mielomamúltiple, cerebro, huesos, linfoma, testículo y tiroides, cuyas prevalencias fueron muy bajas (<4%). Para obtener el total de miembros de la familia con antecedente de cáncer de mama, se sumaron a todos los familiares de primer grado (papa, mama, hermanos e hijos) que las mujeres reportaron con cáncer.

Se calcularon estadísticas descriptivas (medianas, rangos intercuartiles y proporciones) en las mujeres estratificando por casos y controles tanto en las mujeres pre- como en las postmenopáusicas. Para analizar las diferencias entre casos y controles se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon para las variables continuas y la Ji-cuadrada para las categóricas. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa STATA v13 (StataCorp College Station, Texas, USA). El estudio fue aprobado por los comités de Instituto Nacional de Salud Pública (número CI-349).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a las características de las mujeres que participaron en el estudio, se observó que, en las mujeres premenopáusicas, la edad fue similar entre los casos y los controles, sin embargo en las mujeres posmenopáusicas, los casos fueron un poco mayores que los controles ($p=0.02$). En cuanto a la institución de salud, en las mujeres premenopáusicas, se observó que cerca de la mitad, tanto de los casos y los controles fueron derechohabientes del IMSS y a la SS ($p=0.86$) mientras que en las mujeres posmenopáusicas poco más de la mitad de los casos perteneció al IMSS y en los controles, las mujeres pertenecieron en porcentajes similares al IMSS y SSA ($p=0.02$). Respecto a la ciudad de residencia, se observó que tanto en las mujeres pre- como en las postmenopáusicas, más de la mitad fueron residentes de la Ciudad de México y esta diferencia sólo fue significativa en las mujeres postmenopáusicas ($p<0.01$). Respecto al índice de bienes en las mujeres premenopáusicas no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.36$), en las mujeres posmenopáusicas, los casos reportaron en un porcentaje mayor, pertenecer al índice alto, mientras que en los controles se encontró un porcentaje mayor en el índice bajo ($p<0.01$). En cuanto a la paridad se encontró que los controles, tanto de las mujeres pre- como postmenopáusicas tuvieron más hijos que los casos ($p=0.004$ vs $p<0.001$). El antecedente de enfermedad benigna de la mama, tanto en mujeres pre- como en postmenopáusicas, los casos presentaron una prevalencia mayor que los controles, siendo estas diferencias significativas para ambos grupos ($p=0.01$ vs $p<0.01$). Respecto al número de familiares con antecedentes de cáncer, se encontró que los controles en las mujeres premenopáusicas reportaron en un 20% el antecedente de un familiar con cáncer en comparación con los controles, donde este porcentaje fue de 16%, mientras que los casos presentaron porcentajes más altos de antecedentes de dos o más familiares con cáncer en comparación con los controles ($p=0.27$). Los casos en las mujeres postmenopáusicas presentaron porcentajes más elevados de familiares con cáncer (37.8%) en comparación con los controles (23.1%) ($p<0.001$). (Tabla 1)

Respecto al tipo de cáncer que presentaron los familiares de las mujeres que participaron en el estudio, se encontró que las mujeres premenopáusicas con un familiar con antecedente de algún tipo de cáncer reportaron principalmente cáncer de mama (20.9% en casos y 22.5% en controles) seguido de cáncer de matriz (14.9% en casos y 22.5% en controles), mientras que en las posmenopáusicas, los casos reportaron principalmente cáncer de mama (18.6%), seguido de próstata (10.3%) y pulmón (9.6%), en los controles el principal fue estómago (14.5%), seguido por el de mama (12.9%) ($p=0.04$). Respecto a las mujeres con 2 antecedentes familiares de cáncer, se obtuvo que tanto en las mujeres pre y posmenopáusicas reportaron una mayor prevalencia de antecedentes de cáncer de mama acompañado de otros tipos (cáncer de estómago, o pulmón o matriz o próstata), tanto en casos como en controles. En las mujeres premenopáusicas con 3 antecedentes familiares de cáncer, se encontró que predomina el cáncer de mama (acompañado de cáncer de estómago, colon, cuello uterino, hígado y leucemia) tanto en casos como en controles. Sin embargo más casos reportaron tres o más familiares con cáncer en comparación con los controles. De igual manera en las mujeres posmenopáusicas el principal antecedente de cáncer fue el de mama (acompañado con cáncer de estómago, colon, cuello uterino, hígado y leucemia), y en los controles fue el cáncer de estómago (acompañado de cáncer de pulmón, matriz y próstata) (Tabla 2).

Tabla. 1. Características de las mujeres que participaron en el estudio CAMA. México 2004-2007

| Características socio-demográficas | Premenopáusicas n= 891 | | | | p value ^a | Postmenopáusicas n= 1,183 | | | | p value ^a |
|---|------------------------|-----------|------------------|-----------|----------------------|---------------------------|-----------|------------------|-----------|----------------------|
| | Casos n= 415 | | Controles n= 476 | | | Casos n= 585 | | Controles n= 598 | | |
| | n | % | n | % | | n | % | n | % | |
| Edad ^a | 43.8 | 39.5-47.1 | 42.9 | 39.8-46.8 | 0.50 | 57.9 | 53.1-64.2 | 57.4 | 52.4-62.1 | 0.02 |
| Institución de salud | | | | | | | | | | |
| IMSS | 192 | (46.4) | 212 | (44.5) | 0.86 | 325 | (55.6) | 278 | (46.5) | 0.002 |
| ISSSTE | 31 | (7.5) | 37 | (7.8) | | 53 | (9.1) | 48 | (8.0) | |
| SSA | 191 | (46.1) | 227 | (47.7) | | 207 | (35.4) | 272 | (45.5) | |
| Ciudad de residencia | | | | | | | | | | |
| Ciudad de México | 272 | (65.7) | 280 | (58.8) | 0.10 | 393 | (67.2) | 325 | (54.4) | <0.001 |
| Monterrey | 87 | (21.0) | 115 | (24.2) | | 133 | (22.7) | 150 | (25.1) | |
| Veracruz | 55 | (13.3) | 81 | (17.0) | | 59 | (10.1) | 123 | (20.6) | |
| Índice de bienes | | | | | | | | | | |
| Bajo | 127 | (30.6) | 142 | (29.8) | 0.36 | 179 | (30.6) | 217 | (36.3) | <0.001 |
| Medio | 115 | (27.7) | 152 | (31.9) | | 146 | (25.0) | 205 | (34.3) | |
| Alto | 173 | (41.7) | 182 | (38.2) | | 260 | (44.4) | 176 | (29.4) | |
| Salud reproductiva | | | | | | | | | | |
| Paridad ^a | 2 | 1-3 | 3 | 2-4 | 0.004 | 3 | 2-5 | 4 | 2-6 | <0.001 |
| Patología mamaria | | | | | | | | | | |
| Enfermedad benigna de la mama | | | | | | | | | | |
| No | 341 | (83.0) | 420 | (89.2) | 0.01 | 495 | (86.1) | 560 | (94.6) | <0.001 |
| Sí | 70 | (17.0) | 51 | (10.8) | | 80 | (13.9) | 32 | (5.4) | |
| Número de familiares con antecedentes de cáncer | | | | | | | | | | |
| Sin familiares | 323 | (79.2) | 374 | (78.7) | 0.27 | 383 | (66.2) | 459 | (76.9) | <0.001 |
| Un familiar | 67 | (16.4) | 89 | (18.7) | | 157 | (27.1) | 124 | (20.8) | |
| Dos familiares | 14 | (3.4) | 11 | (2.3) | | 33 | (5.7) | 9 | (1.5) | |
| Tres o más familiares | 4 | (1.0) | 1 | (0.2) | | 6 | (1.0) | 5 | (0.8) | |

a El valor p corresponde a la prueba de ji-cuadrada en las variables categóricas y la prueba de Kruskal Wallis en las continuas
 *Los valores corresponden a mediana y rango intercuartil.

Tabla. 2. Antecedentes de las mujeres que reportaron familiares con distintos tipos de cáncer en el estudio CAMA. México 2004-2007

| Un familiar | Premenopáusicas n= 186 | | | | p value ^a | Postmenopáusicas n=895 | | | | p value ^a |
|---|------------------------|--------|-----------------|---------|----------------------|------------------------|--------|-----------------|--------|----------------------|
| | Casos n= 85 | | Controles n=101 | | | Casos n=422 | | Controles n=473 | | |
| | n | % | n | % | | n | % | n | % | |
| Un familiar | | | | | | | | | | |
| Tipo de cáncer* | | | | | | | | | | |
| Colon | 2 | (3.0) | 3 | (3.4) | 0.70 | 5 | (3.2) | 9 | (7.3) | 0.04 |
| Cuello uterino | 1 | (1.5) | 2 | (2.3) | | 9 | (5.8) | 5 | (4.0) | |
| Estómago | 5 | (7.5) | 7 | (7.9) | | 14 | (9.0) | 18 | (14.5) | |
| Leucemia | 6 | (9.0) | 3 | (3.4) | | 6 | (3.9) | 7 | (5.7) | |
| Mama | 14 | (20.9) | 20 | (22.5) | | 29 | (18.6) | 16 | (12.9) | |
| Matriz | 10 | (14.9) | 20 | (22.5) | | 13 | (8.3) | 11 | (8.9) | |
| Próstata | 1 | (1.5) | 1 | (1.1) | | 16 | (10.3) | 9 | (7.3) | |
| Pulmón | 4 | (6.0) | 8 | (9.0) | | 15 | (9.6) | 10 | (8.1) | |
| Ovario | - | - | - | - | | 1 | (0.6) | - | - | |
| Cavidad oral, garganta, labio o laringe y esófago | 4 | (6.0) | 2 | (2.3) | | 10 | (6.4) | 4 | (3.2) | |
| Hígado , páncreas, riñón, vejiga | 8 | (11.9) | 5 | (5.6) | | 11 | (7.1) | 14 | (11.3) | |
| Melanoma , piel | 2 | (3.0) | 1 | (1.1) | | 10 | (6.4) | - | - | |
| No sabe | 6 | (9.0) | 9 | (10.1) | | 11 | (7.1) | 10 | (8.1) | |
| Otros | 4 | (6.0) | 8 | (9.0) | | 6 | (3.9) | 11 | (8.9) | |
| Dos familiares | | | | | | | | | | |
| Tipo de cáncer* | | | | | | | | | | |
| Colon (pulmón , testículo) | - | - | 1 | (9.1) | | 1 | (3.0) | - | - | 0.20 |
| Cuello uterino (2) | 1 | (7.1) | - | - | | 1 | (3.0) | - | - | |
| Estómago (leucemia, matriz, ovario, próstata) | 1 | (7.1) | 1 | (9.1) | | 6 | (18.2) | 2 | (22.2) | |
| Leucemia (melanoma, piel) | - | - | - | - | | - | - | 2 | (22.2) | |
| Mama (mama, estómago, matriz, próstata, pulmón, otros) | 7 | (50) | 5 | (45.5) | | 11 | (33.3) | 1 | (11.1) | |
| Matriz (matriz, leucemia, próstata,) | 1 | (7.1) | 1 | (9.1) | | 6 | (18.2) | 2 | (22.2) | |
| Próstata (hígado, piel, otros) | 2 | (14.3) | 1 | (9.1) | | 1 | (3.0) | 1 | (11.1) | |
| Pulmón (pulmón, hígado, piel) | 1 | (7.1) | 1 | (9.1) | | 3 | (9.1) | - | - | |
| Ovario | - | - | 1 | (9.1) | | - | - | - | - | |
| No sabe | 1 | (7.1) | - | - | | - | - | - | - | |
| Otros | - | - | - | - | | 4 | (12.1) | 1.0 | (11.1) | |
| > Tres familiares | | | | | | | | | | |
| Tipo de cáncer* | | | | | 0.58 | | | | | 0.29 |
| Colon (matriz 2) | - | - | - | - | | - | - | - | - | |
| Cuello uterino (esófago, próstata) | 1 | (25.0) | - | - | | - | - | - | - | |
| Estómago (huesos, pulmón, matriz, próstata) | - | - | - | - | | 1 | (16.7) | 3 | (60.0) | |
| Mama (mama, estómago, colon, cuello uterino, leucemia, hígado) | 3 | (75.0) | 1 | (100.0) | | 3 | (50.0) | 1 | (20.0) | |
| Matriz (matriz, leucemia, próstata,) | - | - | - | - | | 1 | (16.7) | - | - | |
| Próstata (hígado, piel) | - | - | - | - | | 1 | (16.7) | - | - | |
| Melanoma, piel | - | - | - | - | | - | - | 1 | (20.0) | |

a El valor p corresponde a la prueba de ji-cuadrada

Otros: (Mielomamúltiple, cerebro, huesos, linfoma, testículo, tiroides)

Resultados de un estudio en Estados Unidos en mujeres que acuden a realizarse mastografía mostraron que cerca del 8% de las personas tienen un familiar en primer grado con antecedentes de cáncer de mama, seguido de cáncer de pulmón (7.1%), cáncer colorectal (5.0%), cáncer de próstata (4.7%) y cáncer de ovario (1.8%) (Townsend, Steele, Richardson, & Stewart, 2013). A su vez, se ha reportado prevalencias similares en mujeres afro-américas que viven en Estados Unidos, siendo el cáncer de mama, antecedente familiar con mayor prevalencia (Betha et al., 2016). En el presente estudio de mujeres mexicanas, la prevalencia de antecedente familiar de cáncer de mama fue menor al 5% y las prevalencias de cáncer de pulmón, próstata y colorectal fueron menores al 1% en esta población. Estas diferencias se pueden deber la transición epidemiológica en México, ya que estamos pasando de altas tasas de mortalidad por enfermedades infecciosas a altas tasas de mortalidad por enfermedades crónicas. (Kuri-Morales, et. al, 2011)

A su vez, se ha reportado que tener un familiar de primer grado con cáncer de mama o con cáncer colorectal aumenta al doble el riesgo de presentar cáncer de mama (Townsend et al., 2013). Se ha reportado, que comparando a las mujeres que no tienen antecedentes familiares de cáncer, las mujeres que tienen un familiar en primer grado de cáncer de mama, tienen 40% menos riesgo de morir y se ha reportado que tienen pronósticos más favorables que las mujeres sin antecedentes (Malone et al., 2011).

CONCLUSIONES

El principal tipo de antecedente familiar de cáncer reportado tanto por los casos y los controles fue el cáncer de mama, sin embargo, el antecedente de otros tipos, debe ser incluido en las historias clínicas. Las prevalencias de antecedentes familiares en mujeres premenopáusicas fueron elevadas para matriz y en las posmenopáusicas para próstata. Se debe seguir estudiando éstos antecedentes como factores de riesgo para el cáncer de mama.

BIBLIOGRAFIA

- Angeles-Llerenas, A., Ortega-Olvera, C., Perez-Rodriguez, E., Esparza-Cano, J. P., Lazcano-Ponce, E., Romieu, I., & Torres-Mejia, G. (2010). Moderate physical activity and breast cancer risk: the effect of menopausal status. *Cancer Causes Control*, 21(4), 577-586. doi:10.1007/s10552-009-9487-8
- Beebe-Dimmer, J. L., Yee, C., Cote, M. L., Petrucelli, N., Palmer, N., Bock, C., . . . Simon, M. S. (2015). Familial clustering of breast and prostate cancer and risk of postmenopausal breast cancer in the Women's Health Initiative Study. *Cancer*, 121(8), 1265-1272. doi:10.1002/cncr.29075
- Bethea, T. N., Rosenberg, L., Castro-Webb, N., Lunetta, K. L., Sucheston-Campbell, L. E., Ruiz-Narvaez, E. A., . . . Palmer, J. R. (2016). Family History of Cancer in Relation to Breast Cancer Subtypes in African American Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25(2), 366-373. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-1068
- Chen, Y. C., Page, J. H., Chen, R., & Giovannucci, E. (2008). Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate*, 68(14), 1582-1591. doi:10.1002/pros.20825
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Foulkes, W. D., Bolduc, N., Lambert, D., Ginsburg, O., Olien, L., Yandell, D. W., . . . Narod, S. A. (1996). Increased incidence of cancer in first degree relatives of women with double primary carcinomas of the breast and colon. *J Med Genet*, 33(7), 534-539.
- Kuri-Morales, P. A. (2011). La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios. *Gac Med Mex*, 147(6), 451-454.
- Malone, K. E., Daling, J. R., Doody, D. R., O'Brien, C., Resler, A., Ostrander, E. A., & Porter, P. L. (2011). Family history of breast cancer in relation to tumor characteristics and mortality in a population-based study of young women with invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(12), 2560-2571. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0781
- Negri, E., Braga, C., La Vecchia, C., Franceschi, S., & Parazzini, F. (1997). Family history of cancer and risk of breast cancer. *Int J Cancer*, 72(5), 735-738.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011.
- OMS. Cancer de mama: prevención y control Retrieved from <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- Palmer, J. R., Boggs, D. A., Adams-Campbell, L. L., & Rosenberg, L. (2009). Family history of cancer and risk of breast cancer in the Black Women's Health Study. *Cancer Causes Control*, 20(9), 1733-1737. doi:10.1007/s10552-009-9425-9
- Pharoah, P. D., Day, N. E., Duffy, S., Easton, D. F., & Ponder, B. A. (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 71(5), 800-809.
- Sellers, T. A., Gapstur, S. M., Potter, J. D., Kushi, L. H., Bostick, R. M., & Folsom, A. R. (1993). Association of body fat distribution and family histories of breast and ovarian cancer with risk of postmenopausal breast cancer. *American journal of epidemiology*, 138(10), 799-803.
- Sellers, T. A., Potter, J. D., Rich, S. S., Drinkard, C. R., Bostick, R. M., Kushi, L. H., . . . Folsom, A. R. (1994). Familial clustering of breast and prostate cancers and risk of postmenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 86(24), 1860-1865.
- Townsend, J. S., Steele, C. B., Richardson, L. C., & Stewart, S. L. (2013). Health behaviors and cancer screening among Californians with a family history of cancer. *Genet Med*, 15(3), 212-221. doi:10.1038/gim.2012.118
- Weiderpass, E., Meo, M., & Vainio, H. (2011). Risk factors for breast cancer, including occupational exposures. *Saf Health Work*, 2(1), 1-8. doi:10.5491/SHAW.2011.2.1.1