

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DEL SUMINISTRO DE PARTÍCULAS  
QUITINOSAS DE ORIGEN FÚNGICO SOBRE LA  
ACTIVIDAD QUITINASA EN RATONES BALB/C

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Ingeniero en Biotecnología**

PRESENTA:

OSIRIS LIZBETH GARCÍA MALDONADO

Director:

DRA. LAURA PATRICIA RAMÍREZ COUTIÑO

Co-director:

M. EN C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ

Dedicada a:

*Mis padres: Gregorio García Vásquez y Graciela Maldonado por todo el cariño brindado a lo largo de mi vida y el apoyo incondicional que me ha llevado a concluir con éxito esta etapa importante en nuestras vidas.*

*A mi hermana Mercedes por su amor incondicional y por procurar siempre mi bienestar.*

*A mi hermano Iván por su carisma y sus palabras de aliento que motivan mi superación.*

*A mi hermana Dulce por el entusiasmo demostrado en los momentos difíciles.*

*A Walter por ser un pilar fundamental en mi vida, por su motivación, apoyo incondicional y enseñanzas.*

*A Ivonne y Polo por enseñarme sobre la confianza y amistad verdaderas.*

*A Jarim por su cariño, palabras y dulces en momentos difíciles.*

*A Gaby y Uriel por llenar de alegría mi hogar.*

*Con todo mi amor*

*Osiris Lizbeth García Maldonado.*

# AGRADECIMIENTOS

---

A los integrantes del comité tutorial que evaluaron esta tesis: Dr. Julián Mario Peña Castro, Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dra. Alma Xochitl Avila Alejandre, Dr. Edgar García López de la Universidad del Papaloapan y al Dr. Sergio Huerta Ochoa de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

A los encargados y miembros del Laboratorio de Bioprocesos en la Universidad del Papaloapan por facilitarme el uso de reactivos y equipos para este proyecto: Dra. Ana Karín Navarro Martínez, Dra. María de Jesús Gómez García y Dr. Oscar Nuñez Gaona.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por invaluable apoyo y facilitarme el acceso a su laboratorio en el departamento de de Medicina molecular y Bioprocesos adscrito al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Oscar Nuñez Gaona de la Universidad del Papaloapan por facilitarme el uso de la cepa Bb885.2 de *Beauveria bassiana* empleada en este proyecto y por los conocimientos brindados durante la estancia de verano realizada bajo su asesoría en 2013.

A la Ing. Ventura Moreno Días directora del Centro Reprodutor de Hongos Entomopatógenos en 2014 por los conocimientos brindados durante la estancia realizada bajo su cargo.

A el Dr. Andres Aguirre Cruz, Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo, Dr. Edgar García López, Dra. Jacqueline Capataz Tafur y Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia por su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana Karín Navarro Martínez y a la Lic. Yesenia Barrientos Arenal por el apoyo otorgado en el proceso administrativo de esta tesis.

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez por fungir como Co-Director en este proyecto, por su invaluable apoyo, consejos y atenciones.

Finalmente a la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño por fungir como directora de este proyecto, por compartirme sus conocimientos y por su confianza en el cumplimiento de las metas propuestas.

---

El presente trabajo se desarrolló el laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec bajo la asesoría de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CB-2011-169477-Z con número de becario 22687 y en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano bajo la Co-dirección del M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez del departamento de Medicina molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

# ÍNDICE GENERAL

---

<b>1. Resumen</b>	<b>XI</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>2</b>
3.1. Hongos como agentes de control biológico . . . . .	2
3.1.1. Características de los hongos entomopatógenos . . . . .	3
3.1.2. Producción de entomopatógenos en México . . . . .	3
3.2. <i>Beauveria bassiana</i> como entomopatógeno . . . . .	4
3.2.1. Productos para el control de plagas . . . . .	5
3.3. Normatividad sobre el uso de entomopatógenos en México . . . . .	5
3.3.1. Bioseguridad de un hongo entomopatógeno . . . . .	6
3.4. Quitina . . . . .	7
3.4.1. Fuentes de quitina . . . . .	8
3.5. Quitina como alérgeno . . . . .	8
3.6. Quitinasas . . . . .	9
3.6.1. Quitinasa ácida de mamífero (CHIA) . . . . .	12
3.6.2. Quitotriosidasa (CHIT1) . . . . .	13
3.6.2.1. Enfermedades relacionadas con la CHIT1 . . . . .	15
3.7. Antecedentes . . . . .	17
<b>4. Justificación</b>	<b>20</b>
<b>5. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>22</b>
5.1. Hipótesis: . . . . .	22
5.2. Objetivo General: . . . . .	22
5.3. Objetivos específicos: . . . . .	22
<b>6. Metodología</b>	<b>23</b>
6.1. Etapa 1 . . . . .	23
6.1.1. Producción de partículas de <i>Beauveria bassiana</i> . . . . .	23
6.1.1.1. Inóculo . . . . .	23
6.1.1.2. Cultivo . . . . .	24
6.1.1.3. Extracción de biomasa . . . . .	24
6.1.1.4. Liofilización . . . . .	25

6.1.1.5.	Reducción del tamaño de partícula y tamizado . . . . .	25
6.1.1.6.	Determinación de la viabilidad de la biomasa . . . . .	25
6.2.	Segunda etapa: Inmunización . . . . .	26
6.2.1.	Ensayo preliminar de actividad quitinolítica en mamíferos . . . . .	26
6.2.2.	Inducción con partículas quitinosas . . . . .	28
6.3.	Tercera etapa: Cuantificación y análisis . . . . .	29
<b>7.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>31</b>
7.1.	Viabilidad de las partículas obtenidas . . . . .	31
7.2.	Ensayo preliminar de actividad quitinolítica en mamíferos . . . . .	35
7.3.	Efecto de la inducción sobre la actividad endoquitinasa en suero de ratones BALB/c . . . . .	37
7.3.1.	Lote A . . . . .	37
7.3.2.	Lote B . . . . .	39
7.4.	Efecto de la inducción la actividad exoquitinasa en suero de ratones BALB/c . . . . .	42
7.4.1.	Lote A . . . . .	42
7.4.2.	Lote B . . . . .	44
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>50</b>
<b>A.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>A1</b>
A.1.	Bioinsecticidas comerciales . . . . .	A1
A.2.	Laboratorios productores de <i>Beauveria bassiana</i> en México . . . . .	A2
A.3.	Buffer de fosfatos salino (PBS) . . . . .	A3
A.4.	Curva estándar p-Nitrofenol . . . . .	A4
A.5.	Análisis estadístico correspondiente a la actividad endoquitinasa . . . . .	A6
A.6.	Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa . . . . .	A9
A.7.	Análisis comparativo de niveles de actividad quitinolítica . . . . .	A12
A.8.	Análisis estadístico correspondiente a la actividad Quitinasa total . . . . .	A14
A.9.	Pruebas T-Student . . . . .	A17
A.10.	Pruebas T-Student . . . . .	A18
A.11.	Pruebas T-Student . . . . .	A19

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

3-1. Estructura química de la Quitina . . . . .	8
3-2. Efecto de la quitina en el sistema inmune innato . . . . .	10
3-3. Propuesta del efecto de CHIA en la expresión de quimiocinas y la inflamación en la enfermedad del asma . . . . .	14
7-1. Evolución de la germinación de las partículas de <i>B. bassiana</i> cultivadas en medio Sabouraud sólido . . . . .	31
7-2. Evolución de la germinación de las partículas de <i>B. bassiana</i> cultivadas en medio Sabouraud líquido . . . . .	32
7-3. Viabilidad de <i>B. bassiana</i> en medio sabouraud sólido en agar . . . . .	33
7-4. Viabilidad de <i>B. bassiana</i> en medio sabouraud líquido . . . . .	34
7-5. Prueba preliminar de actividad quitinolítica (endoquitinasas) . . . . .	36
7-6. Actividad endoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote A	38
7-7. Actividad endoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote B	40
7-8. Actividad exoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote A	43
7-9. Actividad exoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote B	44
A-1. Curva de estándar de p-Nitrofenol . . . . .	A5
A-2. Análisis estadístico correspondiente a la actividad endoquitinasa (Diseño factorial de 2 factores) . . . . .	A6
A-3. Dispersión entre los datos obtenidos de actividad endoquitinasa . . . . .	A7
A-4. Comparación de los datos obtenidos de actividad endoquitinasa con respecto al tamaño y día . . . . .	A7

A-5. Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales . . . .	A8
A-6. Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición	A8
A-7. Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa (Diseño factorial de 2 factores) . . . . .	A9
A-8. Dispersión entre los datos obtenidos de actividad exoquitinasa . . . . .	A10
A-9. Comparación de los datos obtenidos de actividad exoquitinasa con respecto al tamaño y día . . . . .	A10
A-10.Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales sobre la actividad exoquitinasa . . . . .	A11
A-11.Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición sobre la actividad exoquitinasa . . . . .	A11
A-12.Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa y endoquitinasa en el día 6. Donde tamaño 1 corresponde a partículas de lote A, tamaño 2 a partículas del lote B, actividad 1 significa endoquitinasas y actividad 2 corresponde a exoquitinasas. . . . .	A12
A-13.Niveles de expresión exoquitinasa . . . . .	A13
A-14.Análisis estadístico correspondiente a la actividad Quitinasa total(Diseño factorial de 2 factores) . . . . .	A14
A-15.Dispersión entre los datos obtenidos de actividad Endo-quitinasa . . . . .	A15
A-16.Comparación de los datos obtenidos de actividad Endo-quitinasa con respecto al tamaño y día . . . . .	A15
A-17.Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales . . . .	A16
A-18.Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición	A16

# ÍNDICE DE TABLAS

---

3-1. Contenido de quitina en hongos y crustáceos . . . . .	9
3-2. Quitinasas en mamíferos . . . . .	12
3-3. Características de la CHIT1 . . . . .	16
6-1. Esquema de inducción empleado en el ensayo preliminar . . . . .	27
6-2. Condiciones empleadas en la determinación de la actividad endoquitinasa . .	28
6-3. Esquema de inmunización . . . . .	29
7-1. Porcentaje de actividad endoquitinasa en ambos lotes . . . . .	46
A-1. Preparación de PBS . . . . .	A4
A-2. Preparación de concentraciones diferentes de p-Nitrofenol . . . . .	A4

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

---

## Abreviaturas

---

NAG	N-Acetil-Glucosamina
C	Quitinasa
CLPs	Quitolectinas
CHIT1	Quitotriosidasa
CHIA	Quitinasa ácida de mamífero
CHI3L1	Quitinasa 3 tipo 1
CHI3L2	Quitinasa 3 tipo 2
CHID	Proteína tipo quitinasa que interactúa con estabilina 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- $\beta$	Factor de necrosis tumoral beta
NK	Linfocito citolítico natural
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Dominios de inmunoglobulina
IL	Interleucina
Th1	Linfocitos Th que inducen respuesta inmune celular
Th2	Linfocitos Th que favorecen las respuestas humorales
TLR-2	Receptor tipo toll 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
WAO	World Allergy Organization
IgE	Inmunoglobulina E
DM	Diabetes Mellitus
kDa	Kilo Daltons
COFEPRIS	Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios
CL50	Concentración letal media
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
PBS	Phosphate Buffered Saline

---

# 1. RESUMEN

---

Con la finalidad de abundar en los estudios de inocuidad del entomopatógeno *Beauveria bassiana* en mamíferos, el presente trabajo muestra el efecto de este hongo como inductor sobre la actividad quitinolítica en ratones de la cepa BALB/c. En primer termino, se cultivó y procesó a la cepa Bb885.2 de *Beauveria bassiana*, con la finalidad de obtener 2 grupos con tamaños de partícula diferentes, con tamaños inferiores a los 38  $\mu\text{m}$  (grupo A) y otro en el intervalo de 38-149  $\mu\text{m}$  (grupo B). Posteriormente, se expuso a ratones de la cepa BALB/c al contacto con las partículas generadas durante 14 días.

La determinación de la actividad endoquitinasa y exoquitinasa en suero de los ratones expuestos se realizó de manera cuantitativa, empleando los sustratos artificiales 4-Nitrofenil-N-N-Diacetil- $\beta$ -D-Quitobiósido y 4-Nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida respectivamente. Los resultados de la determinación de actividad quitinolítica mostraron que en ratones expuestos a partículas de *B. bassiana* se incrementan los niveles de actividad quitinolítica comparados con los valores obtenidos para el ratón CD1 empleado como estado basal de un mamífero no expuesto a partículas de *B. bassiana*. En particular la actividad endoquitinasa se incremento en 3.38 veces al suministrar partículas con tamaños menores a 38  $\mu\text{m}$ , mientras que al suministrar partículas de 38-149  $\mu\text{m}$  esta actividad se incremento 3.56 veces. Por otra parte se monitoreo la actividad exoquitinasa la cual se incremnto en 1.67 veces sin importar el tamaño de partícula.

Se demostró estadísticamente que el tamaño de partícula no tubo un efecto significativo sobre la actividad quitinolítica total sin embargo el tiempo de exposición a las partículas de *Beauveria bassiana* resultó ser el factor con mayor influencia.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

La quitina es un polisacárido abundante en la naturaleza, por su estructura química cumple la función de soporte y defensa en los organismos que la contienen como artrópodos, moluscos, microalgas y hongos. El hongo filamentoso *Beauveria bassiana* contiene en su pared celular quitina y se encuentra clasificado como un entomopatógeno, motivo por el cual es ampliamente empleado para combatir plagas en sustitución de insecticidas de origen químico, su uso se basa en el amplio número de especies que ataca además de ser considerado inocuo para mamíferos. (Argüelles y cols., 2004; Lelito y cols., 2013).

Por otra parte estudios recientes han demostrado experimentalmente que la quitina tiene un efecto sobre la inflamación en las vías respiratorias, desencadenando una respuesta del sistema inmune, éste tiene la capacidad de reclutar células y secretar moléculas para eliminar a la quitina. El efecto de la respuesta del sistema inmune ante la presencia de la quitina está relacionado con el tamaño de partícula, ya que partículas mayores a  $70\ \mu\text{m}$  activan moléculas distintas a las activadas por partículas menores a  $40\ \mu\text{m}$  (Lee y cols., 2008a). Dentro de las moléculas que participan en la degradación de la quitina se encuentran enzimas pertenecientes a la familia glucosil hidrolasas 18, algunos de los miembros de esta familia están asociados a enfermedades crónico-degenerativas (Lee, 2009).

Este trabajo busca probar la hipótesis de que la quitina contenida en la pared celular del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, es capaz de incrementar los niveles de actividad quitinolítica en mamíferos expuestos a tamaños de partículas diferentes, con el objetivo de contribuir a los estudios de inocuidad que se realizan en el camino a la regulación del uso y manejo de bioplaguicidas en México.

## 3. MARCO TEÓRICO

---

### 3.1. Hongos como agentes de control biológico

El uso de los organismos antagonistas, competidores, patógenos, parásitos o depredadores de insectos, para controlar a las poblaciones de insectos plagas, se denomina control biológico o biocontrol, y se basa en el hecho de que los insectos se vuelven plaga cuando su población aumenta más allá del umbral ecológico, debido a la desaparición de sus enemigos naturales, por lo que al restaurar la población de éstos, los insectos plaga serán atacados y su población disminuirá. Los organismos utilizados en biocontrol se seleccionan de tal manera que no afecten a la raza humana ni a otros animales, incluyendo al ganado, a los animales domésticos, a los peces, y a los insectos benéficos ([Zapata, 2004a](#)).

Algunos microorganismos que se emplean en el área de control biológico son los hongos entomopatógenos debido a que las micosis (enfermedades causadas por los hongos) son comunes y ampliamente distribuidas en poblaciones de insectos plaga y pueden regular o causar una alta mortalidad en éstos. Los hongos se encuentran asociados con insectos en diversos hábitat, como el agua, suelo y partes aéreas, por su particular manera de infección los hongos son los principales microorganismos que infectan insectos chupadores como áfidos, mosquita blanca, escamas, chicharritas y chinches ([del Bosque y cols., 2007](#)).

Los hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Paecilomyces* son solo algunos géneros de hongos que se sabe son patogénicos contra un gran número de insectos, por lo que se han utilizado en el manejo de insectos plaga en la agricultura, como el escarabajo de la papa, el barrenador del maíz, mosquitas blancas, saltamontes, langostas, barrenadores, áfidos y picudos ([Lelito y cols., 2013](#); [Instituto Nacional de Biodiversidad \(INBio\), 2016](#)).

### 3.1.1. Características de los hongos entomopatógenos

Los microorganismos considerados como agentes de control microbiano cumplen con una serie de atributos que sirven como fundamento para su selección. Estos atributos son:

1. Rango de huéspedes: un entomopatógeno con un amplio rango de huéspedes es mejor comparado con uno específico
2. Virulencia: capacidad de producir enfermedad en términos de grado o velocidad de daño en el insecto
3. Eficiencia en la transmisión: característica importante cuando se trata de que el entomopatógeno se establezca, persista y colonice el hábitat del insecto plaga
4. Diseminación: esta permite al entomopatógeno distribuirse en el hábitat del huésped, la persistencia de los conidios es baja ya que estas son susceptibles a la radiación, particularmente a los rayos ultravioleta (UV). Sin embargo, pueden persistir en el ambiente ya sea en el cuerpo de los insectos infectados o bien gracias a la presencia de estructuras de resistencia.

La característica mas importante que debe poseer un hongo entomopatógeno es ser inocuo para seres vivos, seres humanos, plantas, animales, etc. (del Bosque y cols., 2007)

### 3.1.2. Producción de entomopatógenos en México

La producción comercial productos bioinsecticidas y otros agentes de control biológico en México se realiza en 68 empresas, en ellas se reproducen masivamente 14 hongos entomopatógenos, de los cuales *Beauveria bassiana* (Vuill.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) son los que más se comercializan, además de seis bacterias entomopatógenas, donde la principal es *B. thuringiensis*. Estos microorganismos son utilizados como ingrediente activo en la formulación de bioinsecticidas; en general se les adiciona un acarreador, un material inerte como soporte y adyuvantes, así como, compuestos que promueven y mantienen la viabilidad

del ingrediente activo protegiéndolo de la radiación UV, la lluvia, humedad y desecación, facilitando su manejo, aplicación y efectividad (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013).

Actualmente en México, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en conjunto con el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria y el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) han aprobado la reproducción y comercialización de agentes de control biológico en 56 laboratorios distribuidos en el país, de los cuales 27 son productores de *Beauveria bassiana* en el anexo A.2 se muestra la distribución de los laboratorios productores de este entomopatógeno (Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, 2016).

En México se emplean los hongos entomopatógenos en las campañas fitosanitarias de plagas de importancia económica, en 2008 se trataron 327,347 Ha con bioinsecticidas mientras que en 2009 se trataron 230,277 Ha. El 31.7% del volumen usado se aplicó en estados del Norte del país, 51.3% en entidades de la Región Centro, 5.6% en entidades de la Región Golfo y el 11.3% restante en estados de la Región Pacífico Sur (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013).

### 3.2. *Beauveria bassiana* como entomopatógeno

Desde su descubrimiento se le han atribuido diversas características ventajosas, que lo han posicionado como uno de los principales organismos utilizados en el área de control biológico de insectos. Debido a su distribución cosmopolita, su fácil reconocimiento y frecuente aparición en la naturaleza *Beauveria* es uno de los hongos entomopatógenos con mayor reconocimiento, esto basado en el amplio número de especies que puede infectar (aproximadamente 700 especies) y sus niveles elevados de virulencia como entomopatógeno (Urtubia y France, 2007; Vega y Blackwell, 2005).

*B.bassiana* pertenece al grupo de los hongos mitospóricos o anamórficos. En cultivo el hongo se observa como un micelio blanco a ligeramente coloreado, de apariencia lanosa, pulverulenta o de racimos, raramente forma un sinema blanco o amarillento, ocasionalmente

rosáceo. Presenta hifas aéreas hialinas, hifas lisas y de pared delgada, algunas veces sueltas y fasciculadas. *B. bassiana* se utiliza para el control biológico principalmente de plagas foliares (Vega y Blackwell, 2005; Peteira y cols., 2011).

La efectividad de *B. bassiana* depende de la capacidad de sus unidades infectivas (conidios) de crecer y esparcirse sobre insectos plaga, como consecuencia del empleo de entomopatógenos en la agricultura podemos encontrar grandes cantidades de conidios y fragmentos fúngicos aerolizados, por lo que es inevitable que sean parte del aire que respiran los seres vivos, incluyendo al ser humano (Galán Franco, 2012; Vega y Blackwell, 2005).

### 3.2.1. Productos para el control de plagas

Algunos de los productos para el control de plagas formulados con hongos entomopatógenos se listan en el anexo A.1. Estos productos están elaborados con esporas, las cuales germinan cuando están en contacto con los insectos blanco, lo penetran y en el interior del insecto se reproduce el hongo usándolo como fuente de nutrientes. Si la humedad es adecuada, el hongo emerge del insecto. El rango de insectos blanco es limitado para cada hongo ya que existe una alta especificidad. (Zapata, 2004a)

## 3.3. Normatividad sobre el uso de entomopatógenos en México

En México, para el registro comercial de un nuevo bioinsecticida se requiere de su información ecotoxicológica y registro ante la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), para realizar el registro se requieren estudios de efectos del plaguicida en flora y fauna terrestre y acuática, datos de concentración letal media (CL50) aguda a 96 horas de exposición para una especie determinada de pez; CL50 de una especie vegetal acuática o estudio de la CL50 de una especie animal de la cual se alimente alguna especie de pez, y estudio sobre impacto en poblaciones de insectos benéficos y polinizadores (del

Bosque y cols., 2007; García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013).

De acuerdo con la Ley General de Salud y del Reglamento en materia de registros sobre autorizaciones de importación, exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales, sustancias y materiales tóxicos o peligrosos, donde están considerados los bioinsecticidas (insecticidas microbiales) es necesario conocer, además de su identidad y composición, sus propiedades fisicoquímicas, métodos analíticos, características físicas relacionadas con su uso, propiedades biológicas del agente e información toxicológica y ecotoxicológica (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013; Tamez Guerra y cols., 2001).

La Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009 Plaguicidas, establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico. En materia de registro de plaguicidas participan tres dependencias gubernamentales, estas son las siguientes: Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS); Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013; del Bosque y cols., 2007).

### 3.3.1. Bioseguridad de un hongo entomopatógeno

Los lineamientos propuestos para la evaluación del riesgo para mamíferos de un bioinsecticida parten de la propuesta formulada por la Organización Mundial de la Salud en 1981, donde se tiene un enfoque razonable en la evaluación del riesgo que representa la utilización de bioinsecticidas, y en el cual si se obtienen resultados negativos, éstos permiten presuponer un alto nivel de confianza en la bioseguridad de los agentes microbianos probados.

Entre las pruebas de toxicología aplicadas al producto sin formular, se encuentran: (1) exposición aguda oral; (2) exposición aguda por inhalación (pulmonar); (3) exposición aguda intraperitoneal; (4) exposición aguda dérmica; (5) irritación primaria oftalmológica; e (6) hipersensibilidad. Estas consisten en pruebas cortas de cuatro semanas o menos y se evalúan la infectividad, toxicidad, irritabilidad y alergenicidad de los agentes microbianos, con una

sola dosis para exposición oral e inhalación, e inoculación intraperitoneal, dérmica y ocular.

En México se han llevado a cabo algunos estudios de bioseguridad en hongos empleados como agentes de control biológico algunos de estos son: estudios de infectividad con *Coniobolus major* y *Erynia neoaphidis*, *Hirsutella thompsonii* y *Verticillium lecanii*; estudios de patogenicidad y toxicidad aguda oral con *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* y *Paecilomyces fumosoroseus*; estudios para determinar la DL 50 en ratones expuestos a *M. anisopliae* y toxicidad dérmica aguda con la inducción de dermatitis por contacto en suspensiones de conidios y extractos solubles de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. anisopliae* var. *acridum* (del Bosque y cols., 2007).

### 3.4. Quitina

La quitina fue aislada, identificada y nombrada por Bracconnot, Odier, Children y otros investigadores a principios del siglo XIX. El nombre quitina proviene de la palabra en griego  $\chiιτων$  (kithon) que significa túnica, cubierta o envoltura, y se nombró así al ser identificada como un componente principal de los caparazones de insectos (Sociedad Iberoamericana de quitina, 2016).

La quitina (poli [ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosal]) es un polisacárido formado por unidades de N-acetil-glucosamina (NAG) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos (Figura 3-1), su estructura química y función biológica en la naturaleza son similares a las de la celulosa, ambos son biopolímeros sumamente abundantes y actúan como materiales de soporte y defensa en los organismos que los contienen (Argüelles y cols., 2004; Aguilar, 2012). Existe una gran variedad de derivados de quitina (quitin-oligosacaridos, quito-oligosacaridos y cadenas de quitina y quitosano con grados de polimerización mayores a 20) en función de la longitud de la cadena, el porcentaje de acetilación y la organización de los grupos amino-acetilo. El quitosano (poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosal]) es una molécula derivada de quitina y está compuesta por unidades de N-acetil-glucosamina y Glucosamina (Argüelles y cols., 2004).

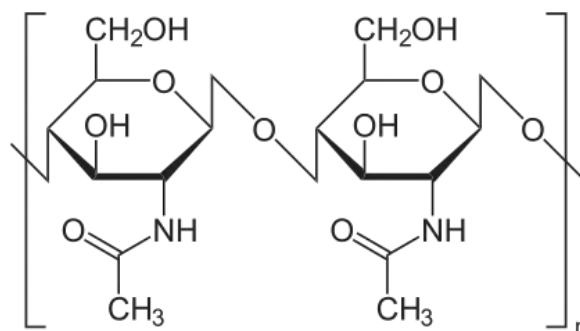


Figura 3-1: Estructura química de la Quitina

### 3.4.1. Fuentes de quitina

La quitina y sus derivados pueden encontrarse en el exoesqueleto de artrópodos y en el tejido estructural de moluscos, microalgas (diatomeas) y en hongos (Aguilar, 2012). El contenido de quitina en los hongos varía de acuerdo a la fase de crecimiento en la que se encuentren, en general representa del 1-2 % del peso seco de la pared celular en las levaduras, mientras que para los hongos filamentosos puede variar de 10 a un 20 %, en la Tabla 3-1 se muestran valores de contenido de quitina en algunos hongos y crustáceos (Argüelles y cols., 2004).

## 3.5. Quitina como alergeno

La quitina es un compuesto que a pesar de ser considerado no tóxico, puede desencadenar respuestas alérgicas en mamíferos, se ha demostrado que tiene efectos complejos dependientes del tamaño de partícula en la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo en mamíferos (Brinchmann y cols., 2011), estas respuestas incluyen la capacidad de reclutar y activar células del sistema inmune innato e inducir citocinas y quimiocinas a través de una gran variedad de receptores de la superficie celular, incluyendo macrófagos, receptores de manosa, receptor tipo Toll 2 (TLR-2) y Dectina-1 como se muestra en la Figura 3-2 (Burton y Zaccane, 2007; Lee, 2009).

Tabla 3-1: Contenido de quitina en hongos y crustáceos

Organismo	Porcentaje de quitina	Fuente
<i>Aspergillus niger</i>	42.00	Peso seco de la pared celular
	24.01	Peso de micelio seco
<i>Penicillium notatum</i>	18.50	Peso seco de la pared celular
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20.10	Peso seco de la pared celular
<i>Agaricus bisporus</i> (champiñon blanco)	27.00	Peso del cuerpo seco
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.90	Peso seco de la pared celular
<i>Mucor rouxii</i>	44.50	Peso seco de la pared celular
	13.25	Peso micelio seco
Cangrejo (Cancer)	72.1	Peso de cutícula orgánica
Cangrejo (Carnicus)	64.2	Peso cuerpo del seco
Cangrejo rey (Paralithodes)	35.0	Peso del cuerpo seco
Cangrejo azul (Callinectes)	14.0	Peso del cuerpo húmedo
Cangrejo ( <i>Sylla cerrata</i> )	23.0	Peso del cuerpo seco
Camarón (Crangon)	69.1	Peso de la cutícula orgánica
Camarón de Alaska	28.0	Peso total de cutícula húmeda
Camarón ( <i>Penaeus spp</i> )	13.1-23.2	Peso del cuerpo seco
Langosta ( <i>Nephrops</i> )	69.8	Peso de la cutícula orgánica
Langosta ( <i>Homarus</i> )	60-75	Peso de la cutícula orgánica
Langosta ( <i>Panilirus ornatus</i> )	15.71	Peso del cuerpo seco
Gamba	67.9-97.0	Peso de la cutícula orgánica
Gamba ( <i>Penaeus monodon</i> )	22.18	Peso del cuerpo seco
Gamba ( <i>Penaeus indicus</i> )	28.0	Peso del cuerpo seco

Tomado de [Aguilar \(2012\)](#)

La capacidad de la quitina de estimular la producción de citocinas tipo 1 las cuales pueden inhibir la inflamación tipo 2, llevan a la deducción de que la quitina puede tener un efecto inhibitorio sobre el sistema inmune adaptativo ([Lee y cols., 2008b](#)).

### 3.6. Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan al polímero de quitina y pueden ser clasificadas de acuerdo a su actividad catalítica en exoquitinasas (3.2.1.52) y endoquitinasas (3.2.1.14),

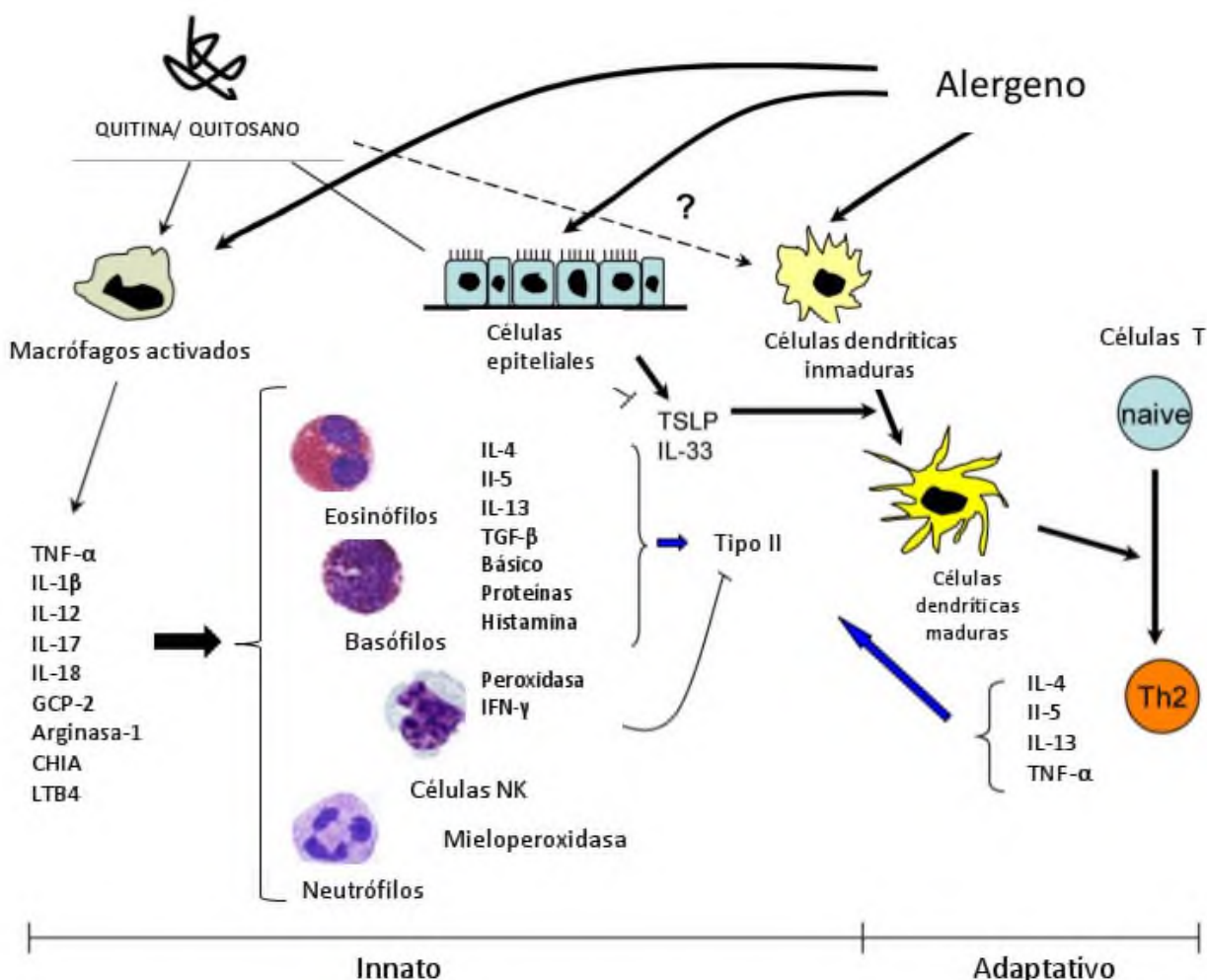


Figura 3-2: **Efecto de la quitina en el sistema inmune innato.** La quitina y sus derivados activan los macrófagos expresando una serie de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas (por ejemplo, GCP-2) y otros mediadores (LTB4) a través del receptor de manosa de macrófagos, TLR-2, y el receptor de lectina de tipo C. A continuación los eosinófilos, basófilos y neutrófilos son reclutados por estos mediadores inflamatorios, por lo que se considera que los eosinófilos y basófilos inducidos por quitina mejoran la respuesta inflamatoria Th2. Otros estudios apoyan el hecho de que la quitina activa los macrófagos, células NK y neutrófilos para producir citocinas de tipo I (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$  y IFN-gamma) con la finalidad suprimir el sistema inmune adaptativo. Tomado de [Lee \(2009\)](#).

donde las exoquitinasas liberan monosacáridos de glucosamina de los extremos del polímero de quitina, mientras que las endoquitinasas escinden al polímero en oligosacáridos de diferentes tamaños (Kanneganti y cols., 2012).

Los mamíferos carecen de quitina y de enzimas que formen a este polímero como la quitin sintetasa (E.C 2.4.1.16) pero se ha demostrado experimentalmente la presencia de moléculas que participan en la degradación de este biopolímero. Estas moléculas pueden ser enzimas como las quitinasas (C) y proteínas que reconocen moléculas de N-acetil-glucosamina (NAG) pero sin actividad catalítica conocidas como quitolectinas (CLPs) (Funkhouser y Aronson, 2007). Ambas C y CLPs, contienen un dominio glico-18, rasgo característico de la región conservada de la familia glucosil hidrolasas 18 (Kzhyshkowska y cols., 2007). Esta familia se expresa en una amplia gama de microorganismos, desde procariontes a eucariotes, incluyendo mamíferos en los cuales se ha propuesto al sulfato de heparán y ácido hialurónico como sustratos para éstas quitinasas (Lee y cols., 2008b). Algunos de los mamíferos en los cuales se ha comprobado la existencia de quitinasas son los roedores y los seres humanos (Lee y cols., 2008b).

En humanos se han detectado quitotriosidasa (CHIT1), quitinasa ácida de mamíferos (CHIA), quitinasa 3 tipo 1 (CHI3L1), quitinasa 3 tipo 2 (CHI3L2), glucoproteína de oviducto (oviductina ó mucina 9) y proteína tipo quitinasa que interactúa con estabilina 1 (CHID1). Donde CHIA y CHIT1 son las únicas quitinasas verdaderas el resto son CLPs, las CLPs carecen de actividad quitinasa debido a mutaciones en las regiones altamente conservadas (Lee y cols., 2011; Aminuddin y cols., 2012; Di Rosa y cols., 2016; Kzhyshkowska y cols., 2007). En ratones se han detectado: CHIT1, CHIA, CHI3L1, CHI3L3 y Chi3I3/14 esta última es producida por macrófagos después de la infección fúngica o parasitaria y es específica de ratón (Lee y cols., 2011; Kanneganti y cols., 2012; Kzhyshkowska y cols., 2007). En la tabla 3-2 se muestran las enzimas expresadas en ratones y seres humanos, así como su localización celular.

Tabla 3-2: Quitinasas en mamíferos

Quitinasas	PM (kDa)	Células en las que se expresan
HUMANOS		
CHIT1	51	Monocitos, células epiteliales
CHIA	50	Monocitos/Macrófagos, células epiteliales de pulmon, células NK
CHI3L1	42	Macrófagos, CECs, neutrófilos, fibroblastos, condrositos articulares
CHI3L2	43	Condrositos articulares
Oviductina	75	Células NK
TSA 1902L	40	Células NK
CHID	45	Macrófagos, Células endoteliales sinusoidales
RATÓN		
CHIT1	51	Monocitos
CHIA	50	Monocitos/Macrófagos, Células epiteliales de pulmon, células NK
CHI3L1	40	Macrófagos, CECs, neutrófilos, condrositos articulares
CHI3L3	44	Neutrófilos, Células epiteliales gástricas
CHI3L4	44	Monocitos/ Macrófagos
Oviductina	78	Células NK
CHID	44	Macrófagos, Células endoteliales sinusoidales

Tomado de [Kanneganti y cols. \(2012\)](#)

### 3.6.1. Quitinasa ácida de mamífero (CHIA)

CHIA es una endoquitinasa de 50 kDa que contiene un dominio de unión a quitina C-terminal y un dominio catalítico N-terminal de 39 kDa que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídico a enlaces de carbono. ([Chou y cols., 2006](#)). Aunque no hay sustrato endógeno para esta quitinasa en mamíferos, se ha identificado que tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria y la patogénesis en seres humanos. CHIA se produce en células epiteliales pulmonares, macrófagos y eosinófilos en los sitios de inflamación tipo 2 (Th2), se expresa principalmente en células distales no mucosas productoras de epitelio, se ha asociado específicamente la producción de IL-13 con la expresión de CHIA, como se muestra en la Figura 3-3 ([Lee y cols., 2011](#); [Kzhyshkowska y cols., 2007](#)). Actualmente se ha asociado al asma atópica con actividad elevada del sistema inmune y se sabe que los linfocitos producen una gran variedad de citocinas en los sitios Th2, que están implicadas en la iniciación y la perpetuación de inflamación en las vías respiratorias ([Shuhui y cols., 2009](#)).

El papel de CHIA en la mediación de la respuesta inflamatoria en la enfermedad del asma no está clara. Se han empleado mamíferos modelo para inducir asma bronquial a partir de ovoalbumina, demostrando CHIA está implicada en la fisiopatología del asma y actúa en conjunto con IL-13. La administración de anticuerpos anti-CHIA conducen a la disminución de la inflamación tipo 2, la eosinofilia tisular y la acumulación de linfocitos (Donnelly y Barnes, 2004; Shuhui y cols., 2009). Se tiene un efecto similar al inhibir la actividad CHIA con alosamidina en mamíferos modelo la cual disminuye el número de células inflamatorias, el mecanismo por el cual CHIA ejerce sus efectos en Th2 aún no se ha dilucidado, pero se sugiere una relación entre la expresión de esta enzima y el incremento de diversas quimiocinas (Donnelly y Barnes, 2004).

La CHIA de ratón tiene un pH óptimo de 2, mientras que la CHIA humana presenta un pH óptimo entre 4 y 5, el nivel de identidad entre éstas es del 82% en su secuencia aminoacídica y su característica ácida, puede atribuirse a su abundancia en el tracto gastrointestinal (Elias y cols., 2005; Braunschweig, 2016; Chou y cols., 2006).

### 3.6.2. Quitotriosidasa (CHIT1)

La quitotriosidasa (CHIT1) fue la primer quitinasa humana en ser descubierta y caracterizada, posee alta homología a nivel de secuencia con quitinasas provenientes de virus, plantas bacterias, hongos, nemátodos, insectos, parásitos protozoarios y en el revestimiento de algunos insectos. Es una quitinasa con actividad de transglucosilación hacia quitina (Di Rosa y cols., 2016).

La CHIT1 es empleada como biomarcador en la enfermedad de Gaucher, debido a que los niveles elevados de CHIT1 en pacientes con esta enfermedad puede reflejar un estado particular de activación de macrófagos (Di Rosa y cols., 2013; Bargagli y cols., 2013). La CHIT1 es una enzima que regula la susceptibilidad a la infección en organismos que contienen quitina como componente estructural. Se ha demostrado que la quitina actúa como un adyuvante inmunológico, mediante la estimulación de la producción de diversas citocinas y quimiocinas, debido a lo anterior se sugiere que la CHIT1 desempeña un papel importante

en la modulación de la concentración de quitina circulante en el mamífero y la regulación de la respuesta inmune en la presencia de quitina (Di Rosa y cols., 2013; Wiesner y cols., 2015).

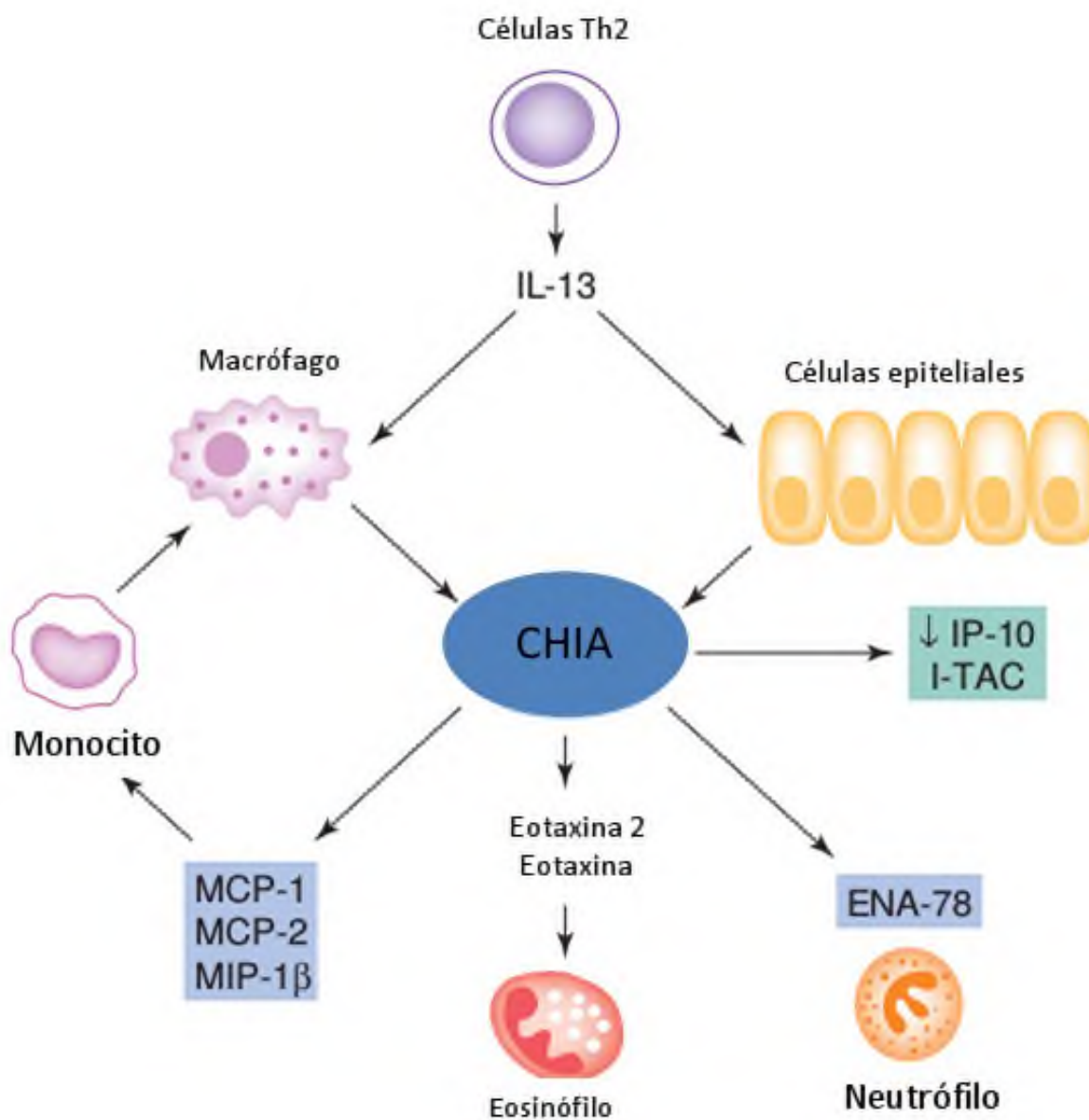


Figura 3-3: Propuesta del efecto de CHIA en la expresión de quimiocinas y la inflamación en la enfermedad del asma. Th2 produce IL-13 y esta a su vez aumenta la expresión de CHIA en los macrófagos alveolares y en células epiteliales de las vías respiratorias. Se requiere la a CHIA activa para favorecer el incremento de la expresión de quimiocinas implicadas en el reclutamiento de monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Tomado de [Elias y cols. \(2005\)](#).

Cuando la quitina exógena proveniente de hongos o ácaros está presente en los pulmones, la CHIT1 actúa hidrolizando a este polímero y posteriormente previene la estimulación de la respuesta inmune a partir de quitina. Es posible que en ausencia de la CHIT1 se presente una acumulación de quitina en los pulmones, lo que podría iniciar una respuesta pro-inflamatoria. En un organismo sano, la actividad de la CHIT1 es relativamente baja y se origina en células polimorfonucleares circulantes. Por el contrario durante el desarrollo agudo/crónico de trastornos inflamatorios existe un incremento en la actividad enzimática de CHIT1 (Di Rosa y cols., 2016).

La quitotriosidasa es sintetizada en como una proteína de 50 kDa que contiene, un dominio N-terminal fosfato isomerasa con estructura de barril (TIM) de 39 kDa en el que se aloja el sitio catalítico y un dominio C-terminal de unión a quitina, ambos dominios están unidos por una región bisagra. CHIT1 es secretada en 2 isoformas, una de 50 kDa y otra de 39 kDa siendo la forma predominante la primera. Cabe destacar la forma de 39 kDa también posee actividad quitinolítica y se acumula en los lisosomas de las células secretoras (macrófagos y neutrófilos). CHIT1 de 39 kDa se encuentra predominantemente en los tejidos mientras que CHIT1 de 50 kDa se encuentra secretada en el torrente sanguíneo (Kanneganti y cols., 2012).

### 3.6.2.1. Enfermedades relacionadas con la CHIT1

La sobreexpresión de quitotriosidasa en mamíferos se ha relacionado con diversas enfermedades como las que se muestran en la Tabla 3-3, algunas de las cuales se describen a continuación.

La malaria es un ejemplo de enfermedad infecciosa en la que se elevan los niveles de la CHIT1, una característica clínica de los pacientes infectados por *Plasmodium falciparum* es la anemia, que está relacionada con la destrucción de glóbulos rojos, la fagocitosis e hiperesplenismo. La destrucción de glóbulos rojos en sangre desencadena la sobre-producción de la CHIT1 en los macrófagos, esto se debe a la acumulación de productos de degradación de la membrana como son hierro y eritrocitos. Los mecanismos de activación de la CHIT1 en

Tabla 3-3: Características de la CHIT1

Sitio de expresión	Monocitos maduros Macrófagos de pulmón Células de Gaucher Neutrófilos Células epiteliales alveolares de pulmón Células epiteliales de intestino
Actividad biológica	Actividad enzimática quitinolítica: actividad hidrolítica y de trans-glucosilación
Asociación a enfermedades infecciosas	Hongos Bacteria Malaria
Asociación a enfermedades de almacenamiento lisosomal	Enfermedad de Gaucher Enfermdad de Niemann Pick Enfermedad de Fabry Talasemia Aterosclerosis
Asociación a enfermedades del pulmón	Tuberculosis Sarcoidosis Fibrosis pulmonar ideopática Enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerodermia Asma/ atopia asociada con infección fúngica
Asociación a enfermedad del hígado	Esteatohepatitis no alcohólica (NASH)
Asociación a enfermedades neurodegenerativas	Enfermedad de Alzheimer Demencia cerebrovascular isquémico

Tomado de [Cho y cols. \(2015\)](#)

malaria suelen ser los mismos que en los pacientes con la enfermedad de Gaucher ([Kanneganti y cols., 2012](#); [Sotgiu y cols., 2008](#)).

La diabetes mellitus (DM) tipo 2 ocupa el 90-95% de todos los casos de diabetes en todo el mundo, es la principal causa de morbilidad y mortalidad cardiovascular a nivel mundial, la DM se caracteriza por hiperglucemia debido a una combinación de resistencia a la insulina y inadecuada secreción de insulina compensatoria. La hiperglucemia crónica se asocia con daño estructural a largo plazo, disfunción y fracaso en varios órganos y tejidos. Existen factores genéticos que juegan un papel importante en el desarrollo de la DM tipo 2,

que en conjunto con factores ambientales (productos químicos, dieta, infecciones) aumentan la susceptibilidad del individuo. En pacientes con DM temprana los niveles de CHIT1 se incrementan (Kanneganti y cols., 2012; Żurawska-Płaksej y cols., 2015).

La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa multisistémica, de origen desconocido y caracterizada por la acumulación de células T en proliferación y fagocitos mononucleares. Esta enfermedad afecta los pulmones, incluyendo ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos, y en algunos casos las afecciones pueden extenderse a ojos, piel, hígado, ganglios linfáticos periféricos, los riñones, las articulaciones, los músculos y el sistema nervioso central. Se asocian las formaciones granulomatosas a la deficiencia del sistema inmune celular después de la exposición a un agente químico o infeccioso. Un número elevado de pacientes con sarcoidosis presenta un incremento de la actividad de la CHIT1 en suero y lavado broncoalveolar. La diseminación de la enfermedad a otros órganos además de los pulmones, está vinculada con el incremento de los niveles séricos de la CHIT1 (Kanneganti y cols., 2012; Cho y cols., 2015).

### 3.7. Antecedentes

En el trabajo de Bussink y cols. (2007) se presentó una visión general de todos los miembros de la familia 18 de las glucosil hidrolasas que abarca quitinasas y CLP's. Ambos tipos de proteínas se producen ampliamente en mamíferos, aunque estos organismos carecen de quitina endógena, su función fisiológica así como las relaciones de evolución son todavía desconocidas. Para lo cual se realizaron análisis filogenéticos moleculares que involucraron a las C y CLP's observándose eventos de duplicación génica temprana, seguido de mutaciones que conducen a la pérdida de la actividad quitinasa. A pesar de la localización cromosómica compartida y la alta homología entre C y CLP'S sus genes individuales tienden a evolucionar de forma independiente, lo que ha permitido la expresión específica de C y CLP'S en diversos tejidos a pH optimizado. Los autores concluyen que la expresión y evolución de esta familia de enzimas es específica para cada linaje de mamíferos.

Posteriormente Paoletti y cols. (2007) analizaron los jugos gástricos de 25 individuos italianos con problemas gastrointestinales. Los sustratos artificiales 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-N, N', diacetilquitobiosa y / o isotiocianato de fluoresceína (FITC) se emplearon para demostrar la presencia de la actividad quitinasa. La enzima CHIA de mamíferos se detectó en 20 pacientes de los 25 examinados, y se cuantificó en un intervalo de valores que osciló entre 0,21-36,27 nmol / ml / h.

Más tarde Vicencio y cols. (2008) demostraron que la infección pulmonar crónica con *Cryptococcus neoformans* resulta en la inflamación alérgica de las vías respiratorias. Debido a que la pared celular de *C. neoformans* consta de quitina y puesto que CHIA se ha implicado recientemente como un nuevo mediador de asma, los autores demostraron la posible relación existente entre infecciones en las vías respiratorias por hongos y la enfermedad del asma a través de la inducción de CHIA. Los resultados indicaron que la inoculación intratraqueal de *C. neoformans* induce actividad quitinasa en el pulmón y líquido de lavado broncoalveolar de las ratas infectadas. CHIA no fue cuantificada sólo detectada por análisis de Western blot.

Un estudio realizado por Dubey y cols. (2014) comprobó que fragmentos de *Aspergillus fumigatus* insolubles y alcalinos (AIF), compuestos principalmente de quitina unida covalentemente a  $\beta$ -Glucano, inducen una respuesta inmunológica más fuerte comparada con la inducción a partir de los polisacáridos de la pared celular de hongos de forma individual. Para este ensayo se prepararon 3 tipos de partículas a partir de *Aspergillus fumigatus* (AIF, Glucanos y quitina), muestras de AIF fueron tratadas con quitinasas y glucanasas para producir glucano y quitina respectivamente. Se empleó PBS como medio para la administración intranasal de las partículas obtenidas. Los ratones empleados recibieron 3 dosis intranasales de los polisacáridos (100  $\mu$ g/ 50  $\mu$ L) por 3 días consecutivos, y fueron sacrificados 24 horas después de la última dosis.

Se analizó la respuesta inflamatoria en tejido pulmonar como indicador del nivel de expresión de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, factores de necrosis tumoral y quitinasas, resultando en un incremento del 77 % en el índice de inflamación en los individuos expuestos a las partículas AIF, mientras que aquellos que se expusieron a glucano y quitina mostraron

incrementos del 15 y 64 % respectivamente.

Recientemente [Dubey y cols. \(2015\)](#) emplearon quitina como adyuvante en ratones modelo para inducir alergia por *Aspergillus fumigatus* y alumbre. Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con antígeno (filtrado de cultivo *A. fumigatus* con o sin quitina) posteriormente se inoculó a los mamíferos modelo con el antígeno por vía intranasal, se utilizó como control al adyuvante. En comparación con otros adyuvantes, la quitina induce una respuesta inflamatoria más débil en los pulmones. Sin embargo, la quitina incremento la IgE total y la producción específica de IgG1 tan eficientemente como alumbre. Estos resultados muestran que a pesar de una reducción de los niveles de citocinas en los pulmones, la quitina incrementa la producción total de IgE en la alergia inducida por filtrado del cultivo de *Aspergillus fumigatus*.

Reportes de [Kim y cols. \(2015\)](#) demostraron la responsabilidad de CHIA como un regulador importante de la respuesta inmune tipo 2, al analizar dicha respuesta en ratones transformados genéticamente que expresaban una versión de CHIA enzimáticamente deficiente, luego de ser expuestos a ácaros domésticos (HDM; House Dust Mites) y partículas de quitina de diferentes tamaños ( 40, 70 y 100  $\mu\text{m}$  ) obtenidas de conchas de cangrejo, los ratones transformados exhibieron un incremento en el número de eosinófilos presentes en lavados broncoalveolares en comparación con los ratones que no sufrieron la modificación, este patrón fue repetitivo en todas las partículas probadas.

En los experimentos realizados por [Acosta Quintero y cols. \(2011\)](#) evaluaron la patogenicidad de *Beauveria bassiana* por vía dérmica en 12 ratones albinos NMRI.

En este trabajo evaluó la infección mediante examen directo y cultivo de muestras de piel así como de tejidos de varios órganos. En estos experimentos no se detectaron anomalías en la inspección anatomopatológica ni conidios germinados en ninguno de los órganos estudiados, no se detectó reacción tisular patológica, sugiriendo que no existe evidencia de multiplicación fúngica. Se concluyó que dosis elevadas del aislamiento LF14 de *B. bassiana* no es patogénico por vía dérmica en ratones albinos NMRI.

## 4. JUSTIFICACIÓN

---

Actualmente en México se emplean formulaciones de hongos entomopatógenos como mecanismo de control biológico en campañas de sanidad vegetal, con lo que se han incrementado los volúmenes de producción de los bioformulados. En nuestro país la mayor parte de los laboratorios productores de entomopatógenos llevan a cabo el proceso de reproducción del principio activo de forma manual, de tal forma que los trabajadores que se dedican a la reproducción de hongos entomopatógenos están en contacto directo con ellos. Sumado a esto en el proceso de aplicación de los formulados en campo no existen barreras adecuadas entre la persona que asperja y el producto asperjado, motivo por el cual el personal dedicado a la aplicación de organismos entomopatógenos también está en contacto directo.

Los hongos entomopatógenos están compuestos en su pared celular de quitina y se ha demostrado experimentalmente que la quitina induce una respuesta en el sistema inmune de mamíferos, el sistema inmune como sistema de defensa induce por medio de cascadas de señalización la producción de enzimas quitinolíticas con la finalidad de hidrolizar y eliminar a la quitina. Algunas enzimas quitinolíticas expresadas como respuesta del sistema inmune han sido asociadas a diversas patologías que no involucran micosis pero sí involucran respuesta exagerada del sistema inmune.

Por otra parte, el uso de agentes de control biológico en México no esta regulado en su totalidad, existen organizaciones gubernamentales encargadas de la regulación de los bioinsecticidas que se enfocan en las características que deben presentar los bioformulados como viabilidad y virulencia, además de estudios sobre la toxicología, efecto sobre organismos no blanco y efecto ambiental.

Por parte de los organismos no blanco se analizan insectos benéficos y algunos peces, no se analiza el efecto en humanos ni en mamíferos similares a este, debido a que se le atribuye a los hongos entomopatógenos la incapacidad de producir micosis en mamíferos, sin embargo se producen modificaciones en la respuesta inmune y en la expresión enzimática.

*Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más empleados en México debido al amplio rango de especies de insectos blanco que ataca, para garantizar una mayor especificidad sobre alguna plaga en particular, se deben emplear hongos entomopatógenos autóctonos. En este caso, la cepa en estudio fue aislada originalmente de un cultivo de café en Oaxaca. Lo anterior implicaría que cuenta con la maquinaria enzimática (quitinasas) asociada a la virulencia y patogenicidad contra este tipo de organismos.

En el presente trabajo se planteó realizar un análisis para determinar si la quitina contenida en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* puede despertar una respuesta inmunológica en mamíferos en términos de la expresión de las enzimas quitinolíticas, con la finalidad de contribuir en los estudios sobre la bioseguridad de este entomopatógeno. Para esto se seleccionó como mamífero modelo a ratones de la cepa BALB/C debido a la amplia gama de estudios asociados al sistema inmune realizados como consecuencia de su modificación genética y de que las hembras suelen todavía ser más susceptibles, por lo que pequeñas cantidades de efectores pueden ser empleadas en esta cepa.

La metodología empleada para la inoculación se sustenta en la probabilidad de poder detectar y analizar la expresión de enzimas quitinolíticas acídicas en suero. Lo anterior considerando que CHIA y CHIT1 se expresaran, dado que ambas son enzimas activas a pH's bajos y con actividad endoquitinasa. No obstante, es posible que otro tipo de quitinasas (exoquitinasas) pudieran expresarse como resultado de las características estructurales (presencia de extremos reductores en las cadenas) de la quitina en este hongo.

## 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 5.1. Hipótesis:

Las partículas quitinosas de *Beauveria bassiana* con tamaño menor a 30  $\mu\text{m}$ , suministradas vía intraperitoneal incrementaran la actividad de quitinasas ácidas en suero de ratones BALB/c.

### 5.2. Objetivo General:

Demostrar si partículas quitinosas menores a 38  $\mu\text{m}$  incrementan la actividad quitinolítica en suero de ratones BALB/c.

### 5.3. Objetivos específicos:

- Generar 2 grupos de partículas quitinosas, A menores a 38  $\mu\text{m}$  y B en el intervalo de 38-149  $\mu\text{m}$ , a partir de cultivos de *Beauveria bassiana* en estado sólido y líquido.
- Determinar la viabilidad en terminos del porcentaje de germinación de las partículas quitinosas obtenidas empleando la técnica de microcultivo.
- Cuantificar espectrofotométricamente la actividad de endoquitinasas y exoquitinasas en suero de ratones BALB/c inoculados con partículas quitinosas de *B. bassiana*.

## 6. METODOLOGÍA

---

Se desarrolló una estrategia experimental en 3 etapas, en la primera etapa se obtuvieron como producto final partículas quitinosas de tamaño definido a partir de *B.bassiana*, en la segunda etapa se obtuvieron muestras de suero de ratones inoculados con las partículas generadas en la primera etapa, y finalmente se cuantificó y analizó la actividad quitinasa en las muestras de suero obtenidas anteriormente.

### 6.1. Etapa 1

#### 6.1.1. Producción de partículas de *Beauveria bassiana*

##### 6.1.1.1. Inóculo

Se empleó *Beauveria bassiana* cepa Bb885.2 aislada de la broca del café *Hypothenemus hampei*(Ferrani)(Coleoptera:Scolytidae) del sureste del estado de Oaxaca, México e incorporada al laboratorio de bioprocesos de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec por el Dr. Oscar Nuñez Gaona , esta fue cultivada en medio sabouraud sólido con 2.0% de agar w/v y 1% (v/v) de un pre-inóculo, con un volumen ocupado del 40% de la capacidad total del matraz, un tiempo de 9 días y 25 °C. Después se extrajo la biomasa obtenida con ayuda de un agitador magnético y 20 ml de agua destilada estéril para cada matraz que contenía al cultivo, se realizó una mezcla con la extracción de 4 matraces de cultivo para formar una solución altamente concentrada del hongo.

### 6.1.1.2. Cultivo

Se cultivó *Beauveria bassiana* cepa Bb885.2 en medio Sabouraud sólido con 2.0 % de agar w/v y 1 % (v/v) del inóculo preparado previamente, con un volumen ocupado del 40 % de la capacidad total del matraz, un tiempo de 9 días y 25 °C. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se extrajo la biomasa y se observó un porcentaje elevado de medio de cultivo no aprovechado por el microorganismo, por lo que se recurrió a disminuir el volumen de medio de cultivo y se probó con 30, 20 y 10 % de volumen ocupado, al mismo tiempo se incrementó el porcentaje de agar (2.2, 2.4, 2.5 % respectivamente) para evitar problemas de extracción, se emplearon 6 matraces de cultivo para probar cada uno de los porcentajes de volumen ocupado.

Con lo anterior se establecieron las mejores condiciones de cultivo en medio Saboraud sólido, siendo: 2.5 % w/v de agar, 1 % de inóculo (v/v), 9 días de cultivo a 25 °C y un volumen ocupado del 10 % de la totalidad del matraz.

Por otra parte, se cultivó a la misma cepa en medio Sabouraud líquido empleando 1 % (v/v) de un pre-inóculo, y un volumen ocupado del 40 % de la capacidad total del matraz, un tiempo de cultivo de 9 días, 25 °C y 180 rpm.

El cultivo en medio sólido al final de los 9 días produce mayormente esporas, mientras que el cultivo en medio líquido da como resultado estructuras miceliales con tamaños de partícula mayores respecto a los tamaños de partícula generados en el cultivo en medio sólido.

### 6.1.1.3. Extracción de biomasa

Para el cultivo en medio sólido se realizó una extracción en medio acuoso colocando agua destilada estéril dentro del matraz junto con un agitador magnético, el matraz fue colocado sobre una parrilla de agitación magnética a 500 rpm por 5 minutos o hasta observar la mayor recuperación de biomasa. Se recurrió al traspaso del líquido de matraz en matraz, para lo cual se colocaron 30 mL de agua en un matraz y se procedió a la extracción, una vez removida la mayor cantidad de biomasa se colocó la solución formada en un nuevo matraz,

ésto para formar soluciones altamente concentradas en volúmenes pequeños que facilitaran su posterior liofilización.

Para el cultivo en medio líquido se extrajo la biomasa obtenida por centrifugación a 5,500 rpm y 4 °C durante 30 minutos, después del tiempo de centrifugación se eliminó el sobrenadante por decantación y los pellets obtenidos se sometieron al proceso de liofilización.

#### **6.1.1.4. Liofilización**

Después de la extracción ambos tipos de cultivo se congelaron a - 20 °C por 12 horas para posteriormente liofilizar las muestras a -52 °C y 0.018 mBar por 48 h.

#### **6.1.1.5. Reducción del tamaño de partícula y tamizado**

Después del proceso de liofilización se observó que las partículas libres de agua formaron aglomerados por lo cual se colocaron en un mortero para reducir su tamaño, luego de este proceso se hizo pasar al hongo por tamices para obtener tamaños de partícula en rangos definidos. Para el caso de las partículas que fueron cultivadas en medio sólido se empleó un tamiz con numero de malla de 400 (apertura de 38  $\mu\text{m}$ ) con lo que se obtuvo el lote A con tamaños de partícula menor a 38  $\mu\text{m}$ . Las partículas que fueron cultivadas en medio líquido se tamizaron con un numero de malla 100 (apertura de 149  $\mu\text{m}$ ) seguido de un tamiz con numero de malla 400 (apertura 38  $\mu\text{m}$ ) para obtener un intervalo de 38-149  $\mu\text{m}$  (lote B). Después de este proceso las muestras fueron conservadas a -20 °C.

#### **6.1.1.6. Determinación de la viabilidad de la biomasa**

Se tomaron muestras antes del proceso de liofilización-tamizado y después del proceso de liofilización-tamizado, para la determinación de la viabilidad de la cepa se recurrió al método de micro cultivo.

Inicialmente se prepararon cajas Petri de 100 x 15 mm con 10 mL de medio de cultivo sabouraud, la caja fue dividida y marcada en 4 cuadrantes. Se tomo una alícuota de la solución obtenida de la extracción antes del proceso de liofilización-tamizado y se colocaron

10  $\mu\text{L}$  en cada cuadrante, con ayuda de un cubreobjetos se expandió la muestra evitando mezclar los cuadrantes, se prepararon 4 cajas Petri (incubadas a 25 °C) para poder analizar una caja cada 6 horas por un periodo máximo de 24 horas en las que se observó la geminación paulatina de los conidios. En cada hora de análisis un cuadrante representaba una réplica de tal manera que para cada hora de análisis se obtuvieron 4 réplicas. Para las muestras después del proceso de liofilización-tamizado se tomaron 100  $\mu\text{g}$  del hongo liofilizado y se diluyeron en 1000 $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.

Para la determinación de la viabilidad de la cepa se recurrió al conteo de esporas germinadas cada 6 horas. En el momento del conteo se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de azul de lactofenol sobre la muestra en cada cuadrante, en seguida se colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico a 40X, tomando el campo visible como un total, se inició el conteo a las 12 h en sentido de las manecillas del reloj tomando en cuenta las primeras 100 esporas visibles. De las 100 esporas contadas se hizo un recuento nuevamente, para determinar cuántas de ellas presentaban la morfología habitual de una espora en geminación (forma de espermatozoide) considerando que el tubo germinal debía tener al menos el 50 % del tamaño de la espora.

Finalmente el porcentaje de geminación corresponde al número de esporas germinadas de las cuales se obtuvo el promedio de las réplicas. Toda la metodología descrita para la determinación de la viabilidad de las partículas se empleó para los 2 tipos de cultivo.

## 6.2. Segunda etapa: Inmunización

### 6.2.1. Ensayo preliminar de actividad quitinolítica en mamíferos

Para la determinación del tiempo aproximado en cual se observaría una máxima expresión de la actividad quitinasa en los mamíferos modelo, se recurrió a un ensayo preliminar en el que se sometió a 2 ratones hembras de la cepa BALB/c (obtenidas del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM) al contacto con partículas quitinosas de (*Beauveria bassiana*)

pertenecientes al lote B. La duración del ensayo preeliminar fue de 16 días.

En la Tabla 6-1 se muestra el esquema de inducción empleado, se inoculó por vía intra-peritoneal a los ratones cada 2 días, tomando al día cero como primera inoculación, la dosis fue 100  $\mu\text{g}$  de partículas quitinosas disueltas en 100  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos salino (PBS), se extrajo sangre por el método de sangrado del seno orbital ([Mexicana, 1999](#)) en los días 6, 10, y 16 del ensayo.

Tabla 6-1: Esquema de inducción empleado en el ensayo preliminar

Día	Nº De Dosis	Dosis Por Individuo	Extracción de Sangre
0	1	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
2	2	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
4	3	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
6	4	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	Si
8	5	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
10	6	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	Si
12	7	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
14	8	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	No
16	9	100 $\mu\text{g}$ /100 $\mu\text{L}$	Si

A partir de los extractos de sangre se obtuvo suero, mismo que se sometió a ensayos enzimáticos de actividad endoquitinasa por el método de [Tronsmo y Harman \(1993\)](#). El tamaño de partícula en este ensayo se determinó con base en la hipótesis planteada, esto para cuantificar las cantidades mínimas de actividad enzimática detectable en la técnica descrita. En este ensayo preliminar se cuantificaron endoquitinasas esto basado en las características de CHIT1 y CHIA. Las condiciones empleadas en la reacción enzimática se muestran en la Tabla 6-2.

Posteriormente y para la determinación de los niveles de actividad quitinasa que posee un mamífero no expuesto a partículas quitinosas de forma inducida, se recurrió a la cuantificación de actividad quitinolítica en suero de un ratón CD1 hembra de 5 semanas de edad no expuesto al contacto con partículas quitinosas o alguna clase de tratamiento. Se recurrió a tomar una muestra de sangre por el método sangrado del seno orbital, posteriormente se extrajo el suero de esta muestra para realizar la determinación de la actividad quitinolítica

Tabla 6-2: Condiciones empleadas en la determinación de la actividad endoquitinasa

Parámetros	
Sustrato	4-Nitrofenil-N-N-Diacetil- $\beta$ -D-Quitobiosa (0.18 mM)
Buffer de Reacción	Citrato/Fosfato (0.1M/0.2M, pH:2.6)
Tiempo	1h
Temperatura	37 °C
Velocidad	180 rpm
Control positivo de actividad	Endoquitinasa de <i>Trichoderma viride</i> (1mg/mL)

por el método de [Tronsmo y Harman \(1993\)](#).

### 6.2.2. Inducción con partículas quitinosas

Esta etapa se inició con la inducción de la expresión de quitinasas en mamíferos modelo con las partículas obtenidas en la primera etapa. Se emplearon 21 ratones hembras de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad (obtenidas del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM), 9 de estos fueron inoculados vía intraperitoneal con partículas del lote A, 9 ratones inoculados con partículas del lote B y 3 ratones fueron empleados como control negativo. La dosis para cada ratón fue de 100  $\mu$ g de partículas disueltas en 100  $\mu$ L de PBS (Ver anexo A-1) , la dosis para los ratones empleados como control fue de 100  $\mu$ L de PBS. Todos los ratones recibieron la dosis correspondiente en los días 0, 2, 4, 6, 8,10, 12 y 14.

En el día 6 se tomaron al azar 3 ratones inoculados con partículas del lote A, 3 ratones inoculados con partículas del lote B y un ratón control, a cada uno de los ratones se les realizó extracción de sangre por el método de sangrado del seno orbital. La sangre se sedimentó a temperatura ambiente por tiempos prolongados hasta observar 2 fases en cada muestra. El suero recuperado se centrifugó a 11,000 rpm por 5 min esto con el fin de eliminar restos celulares. Este proceso para extracción de muestra y obtención de suero, se repitió en los días 10 y 14 como se observa en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3: Esquema de inmunización

Día	Nº De Dosis	Nº de Ratones	Dosis por Ratón	Muestra
0	1	21	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	No
2	2	21	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	No
4	3	21	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	No
6	4	21	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	7 Ratones
8	5	14	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	No
10	6	14	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	7 Ratones
12	7	7	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	No
14	-	7	-	7 Ratones

### 6.3. Tercera etapa: Cuantificación y análisis

Se realizó la determinación de la actividad quitinasa de cada una de las muestras de suero obtenidas en la segunda etapa, la metodología a seguir fue la propuesta por [Tronsmo y Harman \(1993\)](#) con algunas modificaciones.

Para la determinación de la actividad Endoquitinasa se empleó el sustrato 4-Nitrofenil-N-N-Diacetil- $\beta$ -D-Quitobiósido (N6133 SIGMA) a una concentración de 0.18 mM disuelto en agua tridestilada, el buffer de reacción empleado fue Citrato/Fosfato (0.1/0.2 M, pH=2.6), el pH de este buffer fue modificado respecto al valor de la técnica original debido a la naturaleza ácida de CHIA y CHIT1, para este ensayo enzimático se empleó como control positivo de la actividad endoquitinasa a quitinasas de *Trichoderma viride* (C8241 SIGMA) a una concentración de 1mg/mL en fosfato de potasio 50 mM, las reacciones enzimáticas se realizaron por triplicado a 37 °C, 180 rpm durante 1h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción esta se detuvo añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2 M. La lectura de las muestras se llevó a cabo en un lector de microplacas a 405 nm para posteriormente interpolar los datos con una curva estándar de p-Nitrofenol.

Para la determinación de la actividad exoquitinasa en las muestras se utilizó la misma metodología antes descrita cambiando al sustrato dimérico por el monomérico 4-Nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida.

Los resultados obtenidos después de la interpolación de los valores, fueron sometidos a un ANOVA de 2 vías, con una confiabilidad de 95 % en el software estadístico Minitab 16.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 7.1. Viabilidad de las partículas obtenidas

A partir de los cultivos de *Beauveria bassiana* se obtuvieron partículas en intervalos de tamaño definidos, del cultivo en medio sólido se obtuvieron partículas menores a 30  $\mu\text{m}$ , mientras que del cultivo en medio líquido el intervalo fué de 30 a 149  $\mu\text{m}$ . En la Figura 7-1 se puede observar la evolución de la germinación de las partículas del lote A.

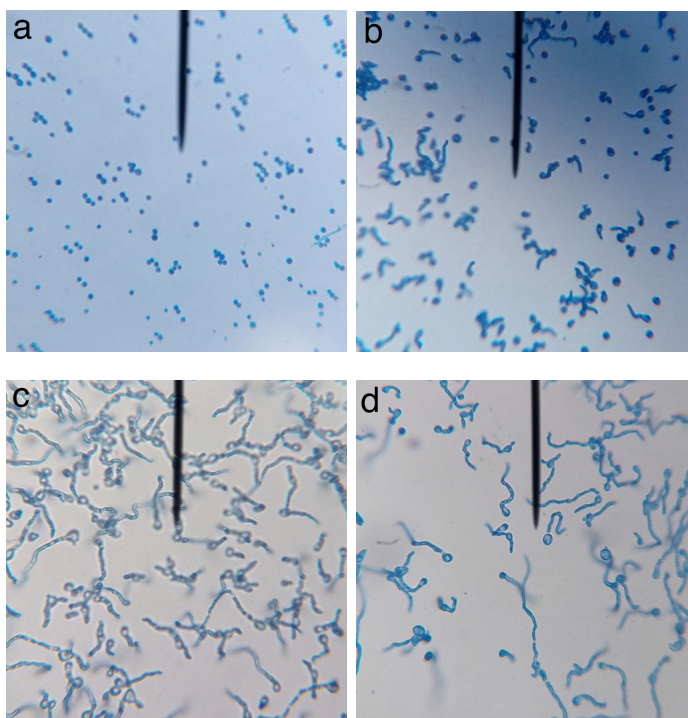


Figura 7-1: Evolución de la germinación de las partículas de *B. bassiana* cultivadas en medio Sabouraud sólido.. a) 6 h, b)12 h, c)18 h y d)24 h.

Después de 6 horas de iniciado el cultivo no se observó crecimiento del tubo germinal, a las 12 horas pudo apreciarse la aparición del tubo germinal en algunas esporas, mientras que a las 18 horas se observó un incremento en el número de esporas germinadas y en el tamaño del tubo germinal. Por último, a las 24 horas sólo se observan esporas completamente germinadas con tubos germinales totalmente desarrollados.

Para el caso de las esporas cultivadas en medio líquido, se observó un comportamiento similar en la evolución del cultivo, con la diferencia de un ligero incremento en el tiempo de germinación, mismo que inició a las 6 horas, como se muestra en la Figura 7-2.

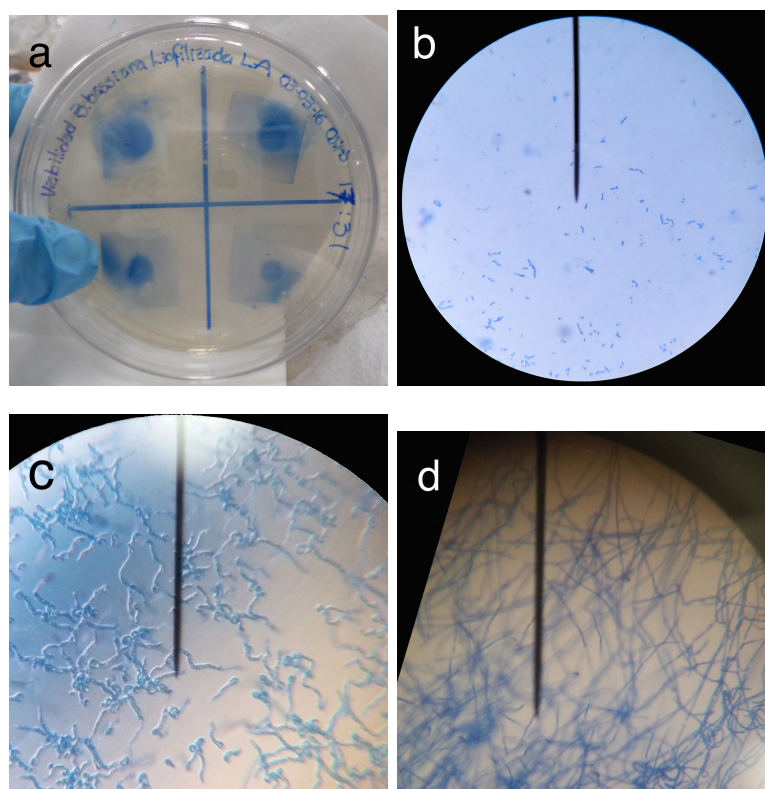


Figura 7-2: Evolución de la germinación de las partículas de *B. bassiana* cultivadas en medio Sabouraud líquido. en donde a) corresponde a la figura de la técnica de microcultivo empleada para la determinación de la viabilidad, b)corresponde a las 6 horas de cultivo, mientras que c) y d) a las 12 y 18 h respectivamente.

Durante la etapa de cultivo se monitoreó la viabilidad de las partículas por medio del porcentaje de germinación, mismo que fue obtenido antes del proceso de liofilización-tamizado y después del proceso de liofilización-tamizado.

En la Figura 7-3 se muestra la viabilidad de las partículas cultivadas en medio sólido, se puede observar un retraso en la velocidad de germinación después del proceso de liofilización-tamizado respecto a la obtenida previa a este proceso. En ambos casos el porcentaje y velocidad de germinación toma valores de cero hasta las 6 h, mientras que en el intervalo de 6 a 12 h la velocidad de germinación es de 4.71 esporas germinadas/h para la determinación antes del proceso de liofilización-tamizado y de 3.33 esporas germinadas/h para el proceso después de la liofilización-tamizado.

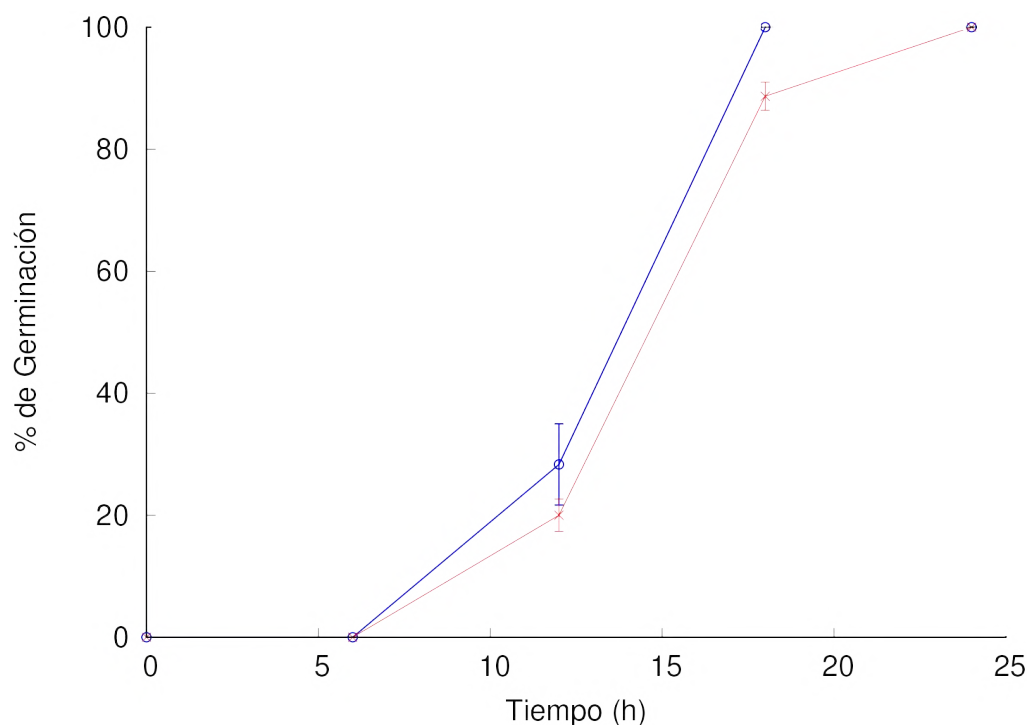


Figura 7-3: Viabilidad de *B. bassiana* en medio sabouraud sólido en agar. (-) antes del proceso de liofilización-tamizado, (-) después del proceso de liofilización-tamizado. Los datos graficados corresponden al promedio de las 4 replicas del conteo de germinación y las barras de error a la desviación estándar entre las replicas obtenidas. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$  indicó que no existe diferencia significativa antes y después del proceso de liofilización-tamizado.

En el intervalo de 12 a 18 horas los valores de la velocidad son 11.95 y 11.44 esporas germinadas/h antes y después del proceso de liofilización-tamizado respectivamente, hacia las 24 h ambos tratamientos produjeron un 100 % de germinación. Tomando los valores obtenidos de velocidad de germinación, puede concluirse que el proceso de liofilización tamizado no afecta la viabilidad de las esporas.

La Figura 7-4 muestra la viabilidad obtenida en las partículas cultivadas en medio líquido, los porcentajes de germinación a las 6 h muestran un mayor crecimiento de las partículas previas al proceso de liofilización-tamizado respecto a las obtenidas después de este proceso.

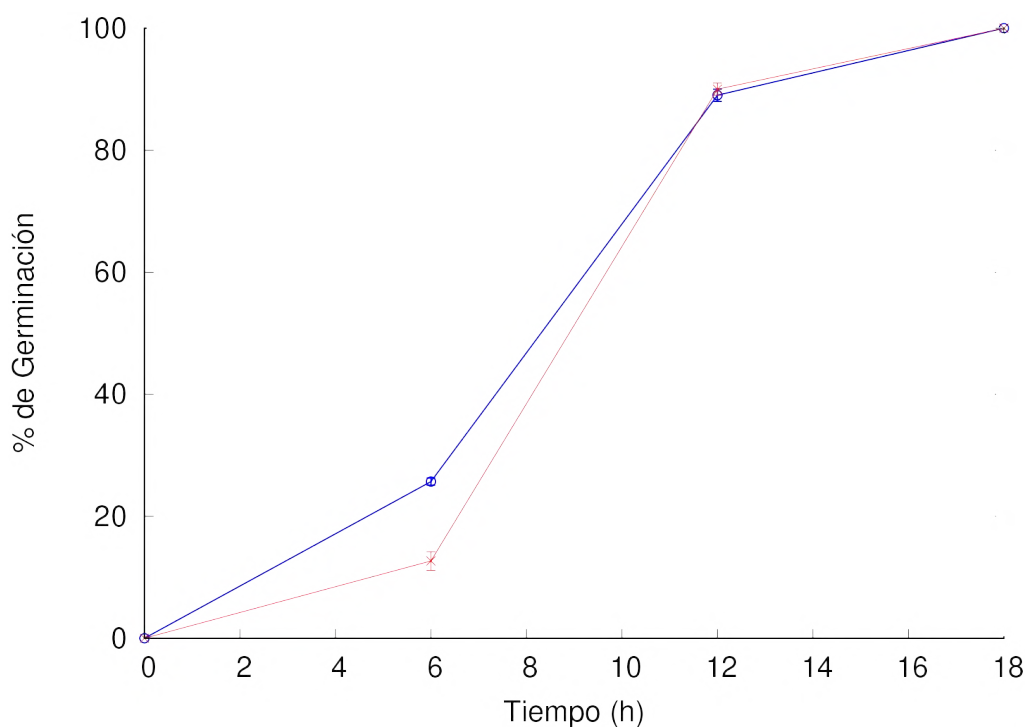


Figura 7-4: Viabilidad de *B. bassiana* en medio sabouraud líquido. (-) antes del proceso de liofilización-tamizado, (-) después del proceso de liofilización-tamizado. Los datos graficados corresponden al promedio de las 4 replicas del conteo de germinación y las barras de error a la desviación estándar entre las replicas obtenidas. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$  indicó que no existe diferencia significativa antes y después del proceso de liofilización-tamizado.

En contraste, el medio líquido produjo partículas cuya germinación comienza a ser apreciable en etapas tempranas de cultivo (antes de las 6 h), a diferencia de las partículas culti-

vadas en medio sólido donde el inicio de la germinación pudo observarse a partir de 6 h. La diferencia en el comportamiento de las partículas puede atribuirse a la diferencia estructural de estas.

Los valores de germinación a las 6, 12 y 18 h son mayores en las partículas antes del proceso de liofilización-tamizado respecto a las partículas después del proceso de liofilización-tamizado. La velocidad de germinación en el intervalo de 0 a 6 h fué de 4.27 y 2.11 esporas germinadas/h antes y después del proceso de liofilización-tamizado respectivamente, esta velocidad se incrementó en ambos casos para el intervalo de 6 a 12 h donde los valores fueron de 10.55 esporas germinadas/h (antes del proceso de liofilización-tamizado) y 12.88 esporas germinadas/h después de éste proceso. Finalmente para el intervalo de 12 a 18 h la velocidad disminuye, antes del proceso de liofilización-tamizado la velocidad fue de 1.833 esporas germinadas/h y después de este proceso la velocidad fue de 1.66 esporas germinada/h. En base al acercamiento de los valores de velocidad de germinación obtenidos antes y después del proceso de liofilización-tamizado y tomando en cuenta que ambas partículas llegan al 100 % de germinación a las 18 h se concluye que el proceso de liofilización-tamizado descrito en este trabajo no disminuye la viabilidad de las partículas producidas, estos resultados son similares a lo obtenidos por [Palomar y cols. \(2015\)](#) donde se evaluó la viabilidad de las esporas después del proceso de liofilización obteniendo el 100 % de germinación.

Cabe mencionar que el mejor medio de producción de partículas que alcanzan más rápido el máximo de germinación es el medio líquido en comparación con el medio sólido.

## 7.2. Ensayo preliminar de actividad quitinolítica en mamíferos

Para la determinación de la duración del ensayo de inducción se realizó un ensayo preliminar en el que se emplearon 2 ratones de la cepa BALB/c y las partículas generadas en la primera etapa que corresponden al lote B, los resultados de la determinación de la actividad

endoquitinasa en suero de 2 ratones se presentan en la Figura 7-5.

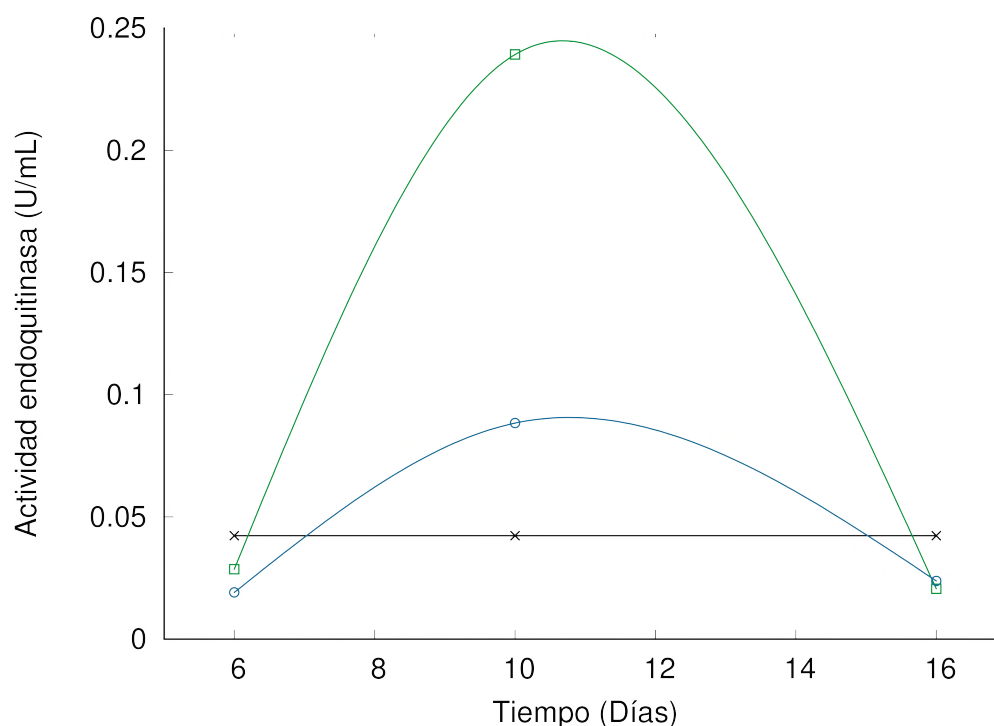


Figura 7-5: Resultados de actividad quitinolítica (endoquitinasas) del ensayo preliminar en 2 ratones BALB/c. Quitinasa de *Trichoderma viride*(x), Ratón 1 (□), Ratón 2 (○). Los resultados corresponden a un solo ensayo de actividad enzimática

Puede observarse que los resultados correspondientes al control positivo de la actividad endoquitinasa no presenta cambios a través del tiempo, este comportamiento corresponde al esperado debido a que la evaluación se llevó a cabo sobre un extracto enzimático comercial, en el día 6 el ratón 1 y el ratón 2 muestran valores de actividad inferiores respecto a control positivo, y para el décimo día ambos ratones presentan los valores máximos de actividad endoquitinasa además de ser superiores al valor del control positivo siendo marcada la diferencia para el ratón 1. Para el día 16 los valores de esta actividad disminuyen nuevamente a niveles inferiores al control positivo.

En base a estos resultados se determinó que la mayor inducción de actividad endoquitinasa se observó a los 10 días motivo por el cual el tiempo de los siguientes experimentos se

fijó en 14 días, con la finalidad de prolongar el tiempo de exposición a las partículas después del máximo obtenido.

Como parte de los ensayos preliminares, se determinaron los niveles actividad quitinolítica en suero del raton CD1, estos valores fueron considerados niveles de actividad basal de un mamifero no expuesto a partículas quitinosas. Los valores obtenidos fueron 0.00141 U/mL y 0.0697 U/mL para la actividad endoquitinasa y exoquitinasa respectivamente.

### 7.3. Efecto de la inducción sobre la actividad endoquitinasa en suero de ratones BALB/c

#### 7.3.1. Lote A

Los valores de actividad endoquitinasa obtenidos a partir de la exposición de ratones BALB/c a partículas del lote A se muestra en la Figura 7-6.

Se observa que la enzima control empleada para la detección de la actividad endoquitinasa genera valores constantes de dicha actividad a través del tiempo, comportamiento esperado debido a su carácter comercial. Los valores obtenidos para el ratón control en el día 6 son inferiores a los obtenidos con los ratones expuestos directamente a las partículas del lote A, por su parte, este efecto se muestra invertido en el día 10 mientras que para el día 14 los valores del ratón control vuelven a ser superiores a los de los ratones inoculados por vía intraperitoneal.

Se observó que los ratones empleados como control mostraron niveles de actividad elevados respecto a los niveles mostrados por el ratón CD1 considerando a este último como un estado basal de actividad quitinolítica y de acuerdo con los estudios realizados por [Mier y cols. \(2005\)](#) en los que se expone a un grupo de mamíferos modelo al contacto por diversas vías con el entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* y en el que se determinó que una parte de las esporas de este entomopatógeno fueron eliminadas por medio de heces fecales, puede inferirse que al estar en contacto los ratones expuestos a las partículas del lote A con

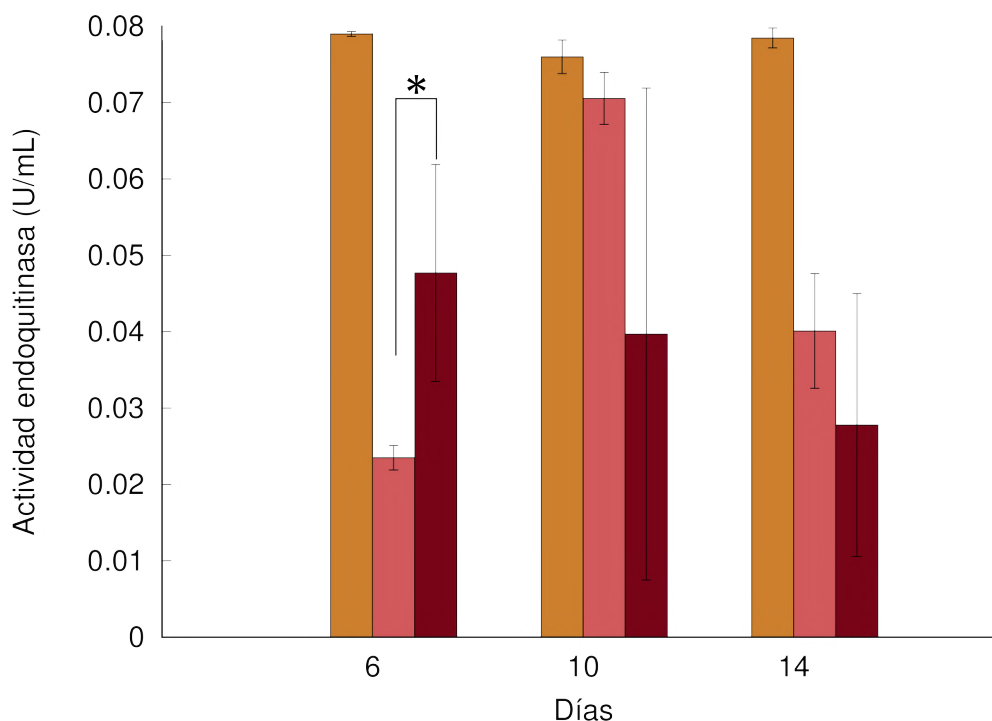


Figura 7-6: Actividad endoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote A. Quitinasa de *Trichoderma viride* ■, Ratón control (n=1) ■ y Ratones expuestos (n=3) ■. Para los ensayos de actividad quitinolítica se llevaron a cabo 3 réplicas por individuo analizado, los datos graficados corresponden al promedio de las replicas y las barras de error a la desviación estándar entre los valores obtenidos. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$ , \* indica diferencia significativa.

los ratones control ocurrió un efecto cruzado de los tratamientos.

Los valores obtenidos de la cuantificación de actividad endoquitinasa en suero de ratones expuestos al lote A oscilan entre 0.0100 U/mL y 0.0739 U/mL, el valor mínimo obtenido en este ensayo es similar al de actividad endoquitinasa del ratón CD1 (0.0141 U/mL) además de esto puede apreciarse que el efecto de la inoculación de las partículas en los mamíferos no sigue un patrón de comportamiento a partir de lo cual puede concluirse que las partículas quitinosas de origen fúngico no desencadenan el mismo efecto en todos los mamíferos aun de la misma especie debido a la variabilidad metabólica de estos, por lo que pueden observarse valores muy elevados de actividad endoquitinasa y valores cercanos al estado basal de un

organismo libre del contacto con partículas quitinosas.

Los valores obtenidos de actividad endoquitinasa en ratones BALB/c expuestos a partículas del lote A provenientes de *B. bassiana* son inferiores hasta en 3000 órdenes de magnitud respecto a los reportados por [Dubey y cols. \(2014\)](#) en donde se emplearon partículas provenientes del hongo patógeno *Aspergillus fumigatus*, en este trabajo se analizó el tejido pulmonar donde además de realizar las determinaciones de la actividad quitinolítica se evaluaron los niveles de inflamación asociados al sistema inmune. A partir de los resultados de [Dubey y cols. \(2014\)](#) y con las diferencias existentes en los niveles de actividad catalítica puede determinarse que *B. bassiana* induce actividad endoquitinasa pero los niveles de actividad no son significativos respecto a los mostrados por un hongo patógeno.

### 7.3.2. Lote B

Los valores obtenidos de la actividad endoquitinasa a partir del suero de ratones expuestos a partículas del lote B se muestran en la Figura 7-7, donde se observa que el ratón control presenta niveles bajos de actividad endoquitinasa en el día 6, mismos que se incrementan en el día 10 y disminuyen nuevamente en el día 14. Mientras que los ratones expuestos por vía intraperitoneal a las partículas de lote B muestran un incremento de la actividad quitinasa entre el día 10 y 14.

Los valores de la actividad endoquitinasa obtenidos con los ratones expuestos a las partículas del lote B oscilan entre 0.0131 U/mL y 0.0995 U/mL, al comparar estos valores con los obtenidos en el análisis de actividad endoquitinasa en el ratón CD1, se determinó que existe un efecto de la exposición de los ratones BALB/c a las partículas del lote B, sin embargo este efecto no es igual en todos los ratones expuestos, esto basado en que la diferencia entre los valores obtenidos de actividad endoquitinasa en los ratones inoculados por vía intraperitoneal son diferentes entre sí incluso en el mismo tiempo de exposición.

Para determinar el efecto del tamaño de partícula y del tiempo de exposición sobre la actividad quitinolítica se realizó un ANOVA de 2 vías con ayuda del software estadístico

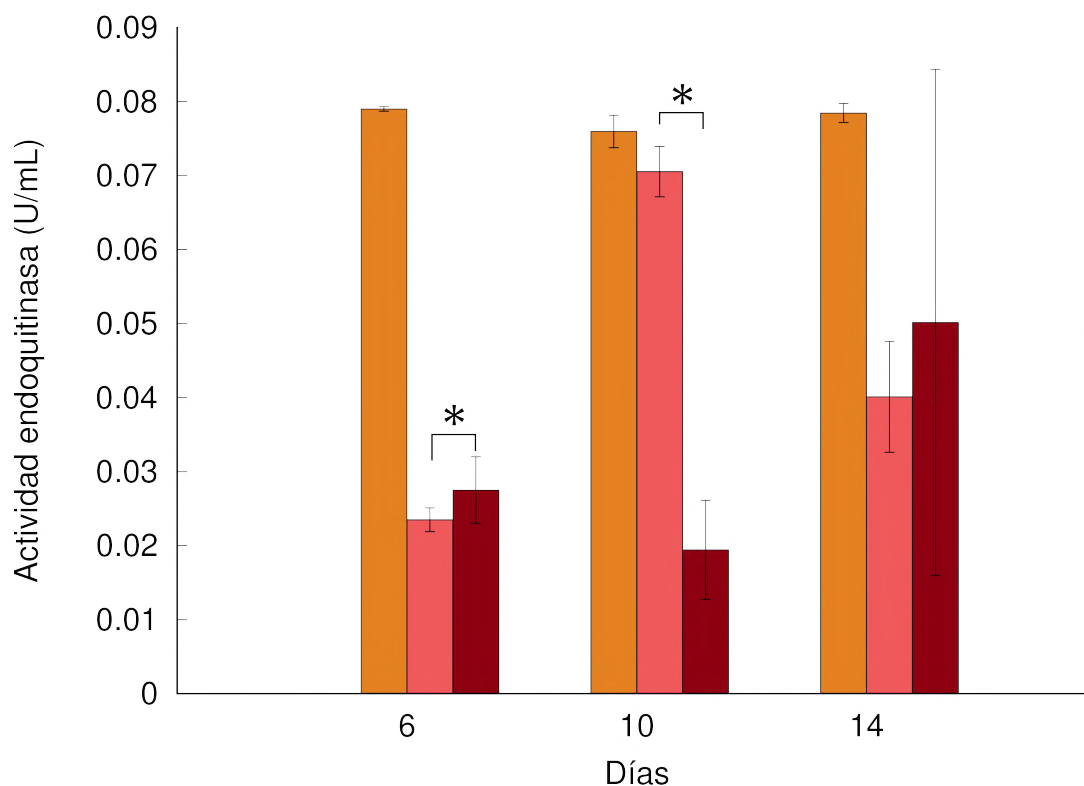


Figura 7-7: Actividad endoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote B. Quitinasa de *Trichoderma viride* ■, Ratón control (n=1) ■ y Ratones expuestos (n=3) ■. Para los ensayos de actividad quitinolítica se llevaron a cabo 3 réplicas por individuo analizado, los datos graficados corresponden al promedio de las replicas y las barras de error a la desviación estándar entre los valores obtenidos. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$ , \* indica diferencia significativa.

Minitab 16, donde DIA representa la variable del tiempo, TAMAÑO 1 representa a las partículas del lote A y TAMAÑO 2 representa las partículas del lote B. (Se mantuvo la misma nomenclatura para todos los análisis estadísticos). El análisis estadístico muestra el efecto de los tamaños de partícula empleados y del tiempo de exposición sobre la actividad endoquitinasa (como se muestra en A-2), se determinó que la interacción entre el tiempo y el tamaño de partícula es el factor con mayor influencia en la actividad endoquitinasa respecto a estos efectos de forma individual, la suma de cuadrados del error fue elevada debido a la variabilidad metabólica de los individuos implicados en estos experimentos. Para el análisis de los efectos individuales empleando la diferencia de medias se encontró que no

existió diferencia significativa entre los valores de actividad endoquitinasa obtenidos en los días 6, 10 y 14. De igual manera se analizó el efecto del tiempo y se determinó que no hubo diferencia significativa entre los valores medios de los 2 tamaños de partícula analizados.

En A-3 se pueden observar las gráficas de residuos en las que se muestra la distribución de los valores obtenidos para la actividad endoquitinasa, los datos obtenidos no tienen un comportamiento gaussiano esto fue atribuido a la variabilidad metabólica de los organismos empleados como modelo.

La diferencia en en los tratamientos a lo largo del tiempo puede observarse en A-4. La media de los valores obtenidos en el día 6 y 10 son diferentes para cada tamaño de partícula, en estos 2 tiempos los valores obtenidos a partir del lote A mostraron una media superior a la obtenida por el lote B, en el día 14 ocurrió el efecto contrario.

Se analizó el efecto individual del tamaño de partícula (A-5) con lo que se observó que sí existe un efecto del tamaño de partícula en la actividad endoquitinasa aunque este efecto es positivo en el tamaño 1 y negativo en el tamaño 2 respecto a la diferencia de medias, lo anterior puede verificarse en el análisis de varianza donde el valor de F para el tamaño de partícula ( $F=1.40$  y  $P=0.243$ ) es inferior respecto a los valores de F obtenidos para el tiempo de exposición ( $F=1.30$  con  $P= 0.281$ ) y la interacción ( $F=7.71$  con  $P= 0.001$ ) entre los 2 factores.

Con respecto al tiempo como efecto individual se determino que existe un diferencia significativa entre los 3 tiempos analizados, es decir que el tiempo tiene efecto sobre la actividad endoquitinasa en mamíferos lo que corrobora que la interaccion entre los 2 factores analizados es el elemento con mayor impacto sobre la actividad endoquitinasa.

Por ultimo se analizó el efecto de la interacción entre el tiempo y los tamaños de partícula, y se determinó que si existe un efecto positivo sobre la actividad quitinasa derivada de la interacción de los 2 factores, esto se observa en A-6.

Para el caso de la actividad endoquitinasa la hipótesis planteada en este proyecto no concuerda con el resultado obtenido, debido a que la interacción entre el tiempo y el tamaño de partícula fué el factor con mayor impacto sobre la actividad endoquitinasa.

## 7.4. Efecto de la inducción la actividad exoquitinasa en suero de ratones BALB/c

### 7.4.1. Lote A

Los valores de actividad exoquitinasa obtenidos a partir de los ensayos enzimáticos con el sustrato artificial 4-Nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida en suero de ratones expuestos a partículas del lote A se muestra en la Figura 7-8. Las enzimas de *Trichoderma viride* empleadas como control positivo de la actividad quitinasa muestran valores constantes de esta actividad a través del tiempo, este efecto corresponde al esperado por ser un extracto comercial.

Todos los ratones expuestos a las partículas de este lote presentan niveles de actividad catalítica elevados, este resultado no puede ser comparado con referencias previas ya que no hay hasta la fecha estudios que determinen actividad exoquitinasa en mamíferos de ningún tipo. El conocimiento actual se basa en reportes de actividad endoquitinasa en diversos tejidos y fluidos de mamíferos.

En el día 6 el nivel de actividad exoquitinasa en el suero del ratón control se muestra inferior a la actividad que presentan los ratones expuestos por vía intraperitoneal, indicando nuevamente la diferencia en la respuesta de cada individuo a las partículas del lote A, en los días 10 y 14 este efecto es inverso, cabe destacar que los valores del error son elevados en los ratones expuestos esto nos dice la diferencia en respuesta de cada individuo al contacto de las partículas de *B. bassiana*.

Se pueden atribuir los valores elevados en el ratón control al mecanismo por el cual estuvieron en contacto con las partículas del lote A, es decir, existe la posibilidad de que los ratones expuestos por vía intraperitoneal y los inoculados por vía dérmica, oral y/o nasal o una combinación de éstos, desarrollaran mecanismos diferentes para tratar de eliminar a las partículas quitinosas con las que estaban en contacto, motivo por el cual los valores de actividad exoquitinasa muestran patrones de comportamiento distintos. Mientras la activi-

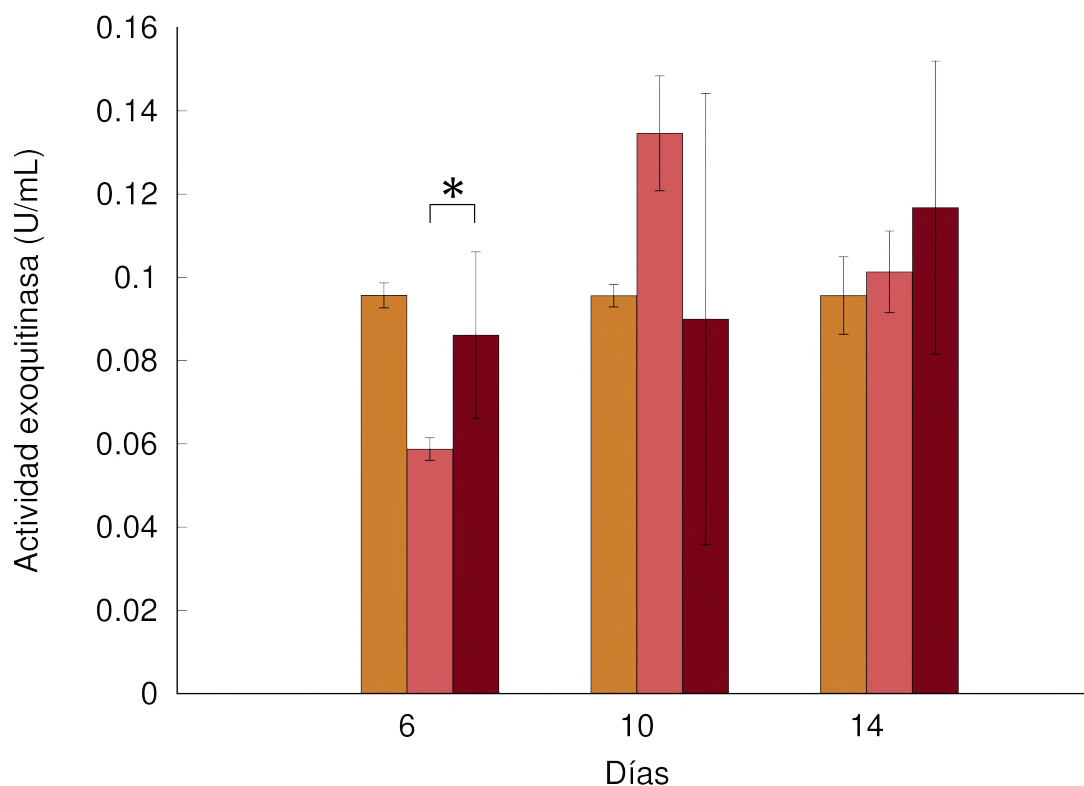


Figura 7-8: Actividad exoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote A. Quitinasa de *Trichoderma viride* ■, Ratón control (n=1) ■ y Ratones expuestos (n=3) ■. Para los ensayos de actividad quitinolítica se llevaron a cabo 3 réplicas por individuo analizado, los datos graficados corresponden al promedio de las replicas y las barras de error a la desviación estándar entre los valores obtenidos. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$ , \* indica diferencia significativa.

dad exoquitinasa en el ratón empleado como control sigue un comportamiento gaussiano, los ratones inoculados por vía intraperitoneal siguen un comportamiento decreciente.

Por otra parte el ratón CD1 mostró valores de actividad exoquitinasa de 0.0697 U/mL, si se considera a este como valor en estado basal de mamíferos no expuestos constantemente a partículas quitinosas, puede concluirse que los ratones que mostraron valores cercanos o iguales a este valor no presentaron un efecto a partir del contacto con partículas de este origen, mientras que los ratones que presentan valores superiores al valor obtenido con el ratón CD1 muestran una reacción a la exposición de estas partículas.

### 7.4.2. Lote B

Por otra parte se realizó la determinación de los niveles de actividad exoquitinasa en el suero de los ratones expuestos al lote B, estos se muestran en la Figura 7-9, donde puede apreciarse el comportamiento del ratón empleado como control y los ratones expuestos.

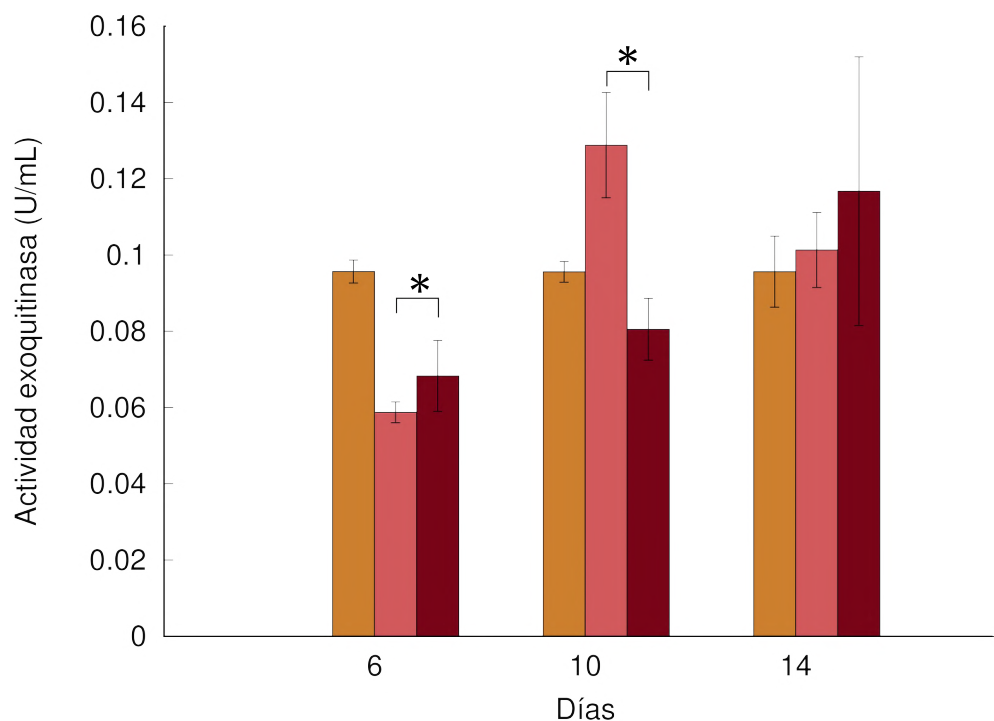


Figura 7-9: Actividad exoquitinasa de ratones BALB/c expuestos a partículas del lote B. Quitinasa de *Trichoderma viride* ■, Ratón control (n=1) ■ y Ratones expuestos (n=3) ■. Para los ensayos de actividad quitinolítica se llevaron a cabo 3 réplicas por individuo analizado, los datos graficados corresponden al promedio de las replicas y las barras de error a la desviación estándar entre los valores obtenidos. Prueba de t-Student con  $\alpha < 0.05$ , \* indica diferencia significativa.

El ratón denominado control muestra un comportamiento gaussiano nuevamente, los ratones expuestos por vía intraperitoneal muestran valores de actividad decrecientes, esto puede observarse de manera clara en el día 6 y 10, mientras que en el día 14 los valores del promedio de los ratones expuestos se muestran elevados, sin embargo al considerar los valores elevados de error en este día puede concluirse que la actividad endoquitinasa en ratones expuestos al lote B muestra un perfil decreciente a través del tiempo. Nuevamente se

consideró que la variación elevada entre los valores obtenidos de la actividad exoquitinasa en este lote se debe principalmente a la variabilidad metabólica existente en los sistemas *in vivo*.

Para determinar el efecto de los tratamientos empleados en este proyecto sobre la actividad exoquitinasa se analizaron los valores de actividad exoquitinasa de la misma forma en la que se analizó la actividad endoquitinasa y puede observarse en la figura A-7.

A partir del análisis de varianza se determinó que el factor con mayor impacto sobre la actividad exoquitinasa fue el tiempo ( $F=9.61, P=0.00$ ) seguido del tamaño de partícula ( $F=1.34, P=0.252$ ), es importante destacar que la suma de cuadrados del error es un valor elevado, esto refleja la diferencia metabólica entre los individuos sometidos a la exposición de partículas quitinosas. Por otra parte se analizó al tiempo y al tamaño de partícula como factores individuales tal como se muestra en A-7 y en A-10 empleando un análisis de medias con un 95 % de confiabilidad. Con el tiempo como efecto individual se observó que no existe una diferencia significativa entre el día 6 y el día 10 de los tratamientos, efecto que se muestra opuesto en el día 14 en el que existe una diferencia significativa entre este día y los dos anteriores analizados.

Estos resultados son contrarios a los planteados en la hipótesis debido a que el tamaño de partícula no tuvo un efecto significativo sobre la actividad catalítica de las exoquitinasas presentes en suero de ratones expuestos a partículas de *B. bassiana*. La actividad endoquitinasa en este proyecto puede ser atribuida a las enzimas CHIT1 y CHIA, ambas son los únicos miembros de la familia glucosil hidrolasas 18 con actividad catalítica en mamíferos (Di Rosa y cols., 2013).

Los datos obtenidos de la determinación de actividad endoquitinasa y exoquitinasa en ratones BALB/c con partículas del lote A y B muestran un comportamiento semejante en la evolución de la actividad quitinolítica presente en el suero de ratones expuestos a ambos lotes, los niveles de actividad son similares para los dos tamaños de partícula empleados. La actividad endoquitinasa en ambos lotes mostró un perfil decreciente, con una diferencia marcada en el día 6 en el cual los valores de actividad en el lote A son superiores a los

obtenidos en el lote B. La diferencia en los niveles de actividad mostrados (Tabla 7-1) se atribuye a la diferencia en el tamaño de la partícula, para la inducción en ambos lotes se emplearon 100  $\mu\text{g}$  de partículas y se supone que en el lote A existió un mayor número de partículas que expusieron regiones del polímero de quitina con secuencias consecutivas acetiladas, que fueron objeto de reconocimiento de las enzimas quitinolíticas CHIT1 y CHIA.

Tabla 7-1: Porcentaje de actividad endoquitinasa en ambos lotes

Tratamiento	Día	Lote A	Lote B
Quitinasa de <i>trichoderma</i> <i>viride</i>	6	45.24	45.24
	10	44.28	44.28
	14	45.07	45.07
Ratón control	6	28.57	28.57
	10	34.39	35.39
	14	28.36	28.36
Ratones expuestos	6	35.67	28.69
	10	30.64	19.43
	14	19.21	30.05

Por el contrario la actividad exoquitinasa en ambos lotes mostró un perfil incrementado con lo que se puede suponer que las enzimas CHIT1 y CHIA después de realizar la hidrólisis exponen fragmentos susceptibles a reconocimiento por exoquitinasas las cuales al encontrar múltiples fragmentos tuvieron mayor procesabilidad e incrementaron conforme el tiempo de exposición su actividad.

Además al momento de inducirse las exoquitinasas, las endoquitinasas disminuyeron su acción. El hecho de que hubieran más partículas pequeñas del lote A para ser hidrolizadas, hace coherente el resultado de que la actividad endoquitinasa fuera casi del doble en comparación con las del lote B. A partir de los niveles actividad de las enzimas quitinolíticas puede concluirse que el comportamiento de estas es sinérgico, esta forma de comportamiento ha sido evidenciado durante el crecimiento de hongos filamentosos [Seidl \(2008\)](#), pero al momento no ha sido descrito para mamíferos.

Finalmente después del análisis de los niveles de actividad quitinolítica en suero de ratones expuestos a partículas de *B. bassiana*, se determinó en base a un ANOVA de 2 vías (ver anexo A-12 y A-13) que la mayor aportación en niveles de actividad catalítica la proporciona la actividad exoquitinasa.

## 8. CONCLUSIONES

---

1. A partir de los análisis de viabilidad de *Beauveria bassiana* se concluye que el proceso empleado para la obtención de partículas con tamaños diferentes de este entomopatógeno no altera la viabilidad de las partículas.
2. A partir de los resultados obtenidos en la actividad quitinasa total, endoquitinasa y exoquitinasa se concluye que el tamaño de partícula de *B. bassiana* no tuvo un efecto significativo sobre la actividad quitinolítica detectada en suero de ratones expuestos a este tipo de partículas.
3. El tiempo de exposición a las partículas de *B. bassiana* es fundamental en el efecto de la actividad quitinolítica en el ratón modelo de la cepa BALB/c. En específico la actividad exoquitinasa se incrementó al final de la inmunización sin importar el tamaño de partícula.
4. *Beauveria bassiana* induce actividad quitinolítica en ratones BALB/c expuestos por vía intraperitoneal.
5. En ratones BALB/c expuestos a partículas de *B. bassiana* la actividad quitinolítica predominante es la actividad exoquitinasa, esto en suero e independientemente del tipo de partícula y mecanismo de exposición.
6. Los ratones control expuestos de forma indirecta (contacto con residuos, por vía dérmica o intranasal) partículas de *B. bassiana* presentaron niveles de actividad endoquitinasa y exoquitinasa elevados (5 y 1.93 veces mayores respectivamente) considerando

los niveles de actividad de un ratón no expuesto (CD1) de manera continua a este tipo de partículas.

7. Finalmente, aunque este trabajo demostró que *B. bassiana* induce la actividad quitinasa en ratones BALB/c, los valores reportados en este trabajo no son suficientes para descartar o afirmar la patogenicidad sobre cualquier mamífero.

## 9. PERSPECTIVAS

---

1. Realizar estudios sobre la actividad quitinolítica de mamíferos expuestos a *B. bassiana* por vía intranasal, oral y dérmica en suero, incrementando el número de individuos expuestos para cada tratamiento e incrementando el tiempo de exposición.
2. Analizar la actividad quitinolítica en diversos tejidos, de mamíferos inoculados por vías distintas a la intraperitoneal, al mismo tiempo en el que se analicen los niveles de crecimiento fúngico en diversos tejidos y hacer énfasis en la actividad exoquitinasa, que no ha sido reportada anteriormente en mamíferos.
3. Para la determinación de la actividad quitinolítica en suero y tejido de ratones se propone utilizar sustratos artificiales unidos a grupos fluorogénicos dado que estos poseen mayor sensibilidad.
4. Realizar la caracterización química de las partículas inductoras, como la determinación del porcentaje de quitina presente en las partículas y del grado de acetilación de éstas.
5. Emplear inmunoensayos para la determinación específica de los miembros de la familia glucosil hidrolasas 18 presentes a partir de la exposición de *B. bassiana*.

# A. ANEXOS

---

## A.1. Bioinsecticidas comerciales

Producto	Hongo
Naturalis	<i>Beauveria bassiana</i>
Mycontrol-GH-OF	<i>Beauveria bassiana</i>
BotaniGard	<i>Beauveria bassiana</i>
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>
Ostrinil	<i>Beauveria bassiana</i>
Boverol	<i>Beauveria bassiana</i>
Bovesil	<i>Beauveria bassiana</i>
BeaSin	<i>Beauveria bassiana</i>
BioGreen	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Bioblast	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Bio1020	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Green Muscle	<i>Metarhizium anisopliae</i>
MetaSin	<i>Metarhizium anisopliae</i>
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
PreFeRal	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
PaeSin	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
Loginex	<i>Langenedium giganteum</i>
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>
Vertalec	<i>Verticillium lecanii</i>
VertiSin	<i>Verticillium lecanii</i>
Betel	<i>Beauveria brongniartii</i>
Engerlingspiz	<i>Beauveria brongniartii</i>
Schweizer Beauveria	<i>Beauveria brongniartii</i>
Melocont	<i>Beauveria brongniartii</i>

[Zapata \(2004a\)](#)

## A.2. Laboratorios productores de *Beauveria bassiana* en México

Estado	Laboratorio
Chiapas	- Tiemelonla Nick K Lum S. de S.S.
	- Laboratorio de Reproducción de Hongos Entomopatógenos
	- Centro de Reproducción y Estudio de Organismos Benéficos del Ingenio Pujiltic
	- Organismos Benéficos Hongos, Insectos, Nematodos
Chihuahua	- Facultad de Agrotecnología Universidad Autónoma de Chihuahua
	- Control Biológico A.C.
CDMX	- Departamento de Biotecnología UAM-Iztapalapa
Durango	- Desarrollo Lácteo, S.P.R. de R.L. (DESLAC)
Guanajuato	- CESAVEG - Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos
	- BIOKRONE, S.A. DE C.V.
Guerrero	- Consejo Estatal del Café (CECAFE)
	- Laboratorio de Entomopatógenos
Hidalgo	- CESAVEH-JLSVH
Jalisco	- Alta Tecnológica Agrotécnica SPR. de R.L. de C.V
Edo. de México	- Laboratorio Reprodutor de Organismos Benéficos Nocon, S. A. de C.V.
	- Asesoría Integral Ambiental
Michoacan	- Productos Orgánicos de Nueva Italia S. P. R. De R. L.
	- Ultraquímica Agrícola S.A. de C.V.
Puebla	- Agroindustria Fungi-Agrícola de Oriente S.P.R. de R.I.

Continúa

## Continuación

Quintana Roo	- Unidad De Producción de Organismos Benéficos (UPOB) - Laboratorio para la Producción de Hongos Entomopatógenos
Sinaloa	- Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V. - Agrobiosol de México S.A. de C.V
Veracruz	- Bios Cobi Inc Sistemas de Control Biológico Integrado - BIOZENTLA - Biotecnología Andreb S.A. De C.V.
Yucatán	- Comité Estatal De Sanidad Vegetal De Yucatán

[Centro Nacional de Referencia de Control Biológico \(2016\)](#)

### A.3. Buffer de fosfatos salino (PBS)

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. En la tabla A-1 se muestra la composición del buffer y las concentraciones en las que debe prepararse, una vez preparado el buffer debe ajustarse el pH a 7.4 con soluciones concentradas de NaOH y HCl [Facultad de Medicina UASLP \(2008\)](#).

Tabla A-1: Preparación de PBS

Componente	Concentración
NaCl	138 mM
KCl	3mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM

#### A.4. Curva estándar p-Nitrofenol

A continuación se describe el procedimiento que se llevo a cabo para obtener una curva estándar de p-Nitrofenol. Se preparó una solución stock de p-Nitrofenol en agua a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , de la cual se tomaron alicuotas para formar nuevas soluciones a diferentes concentraciones como se muestra en la tabla A-2. Posteriormente se realizó una lectura 405 nm en un lector de microplacas, los datos fueron procesados con el programa GNUplot y se obtuvo la gráfica A-1 donde  $Y = 0.1135x - 0.00133$  con  $R^2=0.99995$ .

Tabla A-2: Preparación de concentraciones diferentes de p-Nitrofenol

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Solución stock $\mu\text{L}$	Agua $\mu\text{L}$	Volumen total $\mu\text{L}$	NaOH 0.2M $\mu\text{L}$	Volumen final $\mu\text{L}$
0	0	600	600	1000	1600
2	32	568	600	1000	1600
4	64	536	600	1000	1600
6	96	504	600	1000	1600
8	128	472	600	1000	1600
10	160	440	600	1000	1600

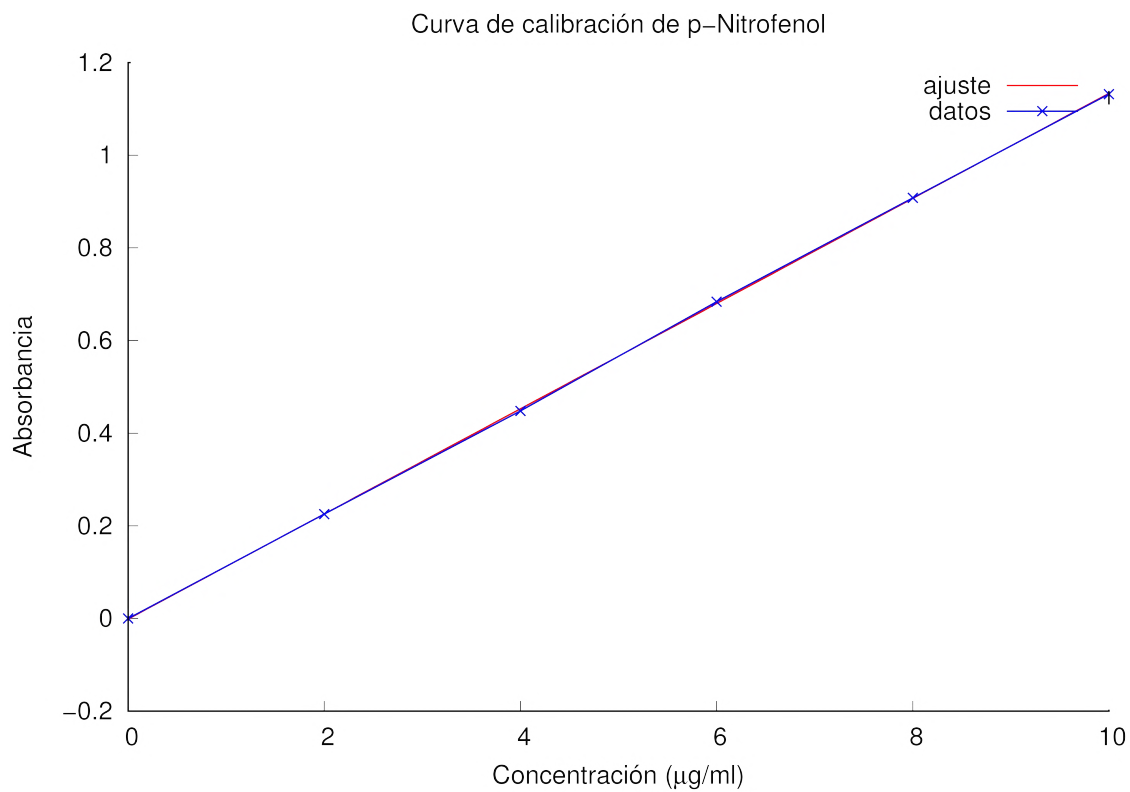


Figura A-1: Curva de estándar de p-Nitrofenol realizada en GNU-plot con  $\lambda = 405$  nm,  $Y = 0.1135x - 0.00133$  con  $R^2=0.99995$

## A.5. Análisis estadístico correspondiente a la actividad endoquitinasa

Two-way ANOVA: Endo-Quitinasa versus DIA; TAMAÑO

Source	DF	SS	MS	F	P
DIA	2	0,0009238	0,0004619	1,30	0,281
TAMAÑO	1	0,0004963	0,0004963	1,40	0,243
Interaction	2	0,0054685	0,0027342	7,71	0,001
Error	48	0,0170202	0,0003546		
Total	53	0,0239088			

S = 0,01883    R-Sq = 28,81\%    R-Sq(adj) = 21,40\%

Individual 95\% CIs For Mean Based on Pooled StDev

DIA	Mean	+-----+-----+-----+-----
1	0,0376167	(-----*-----)
2	0,0295889	(-----*-----)
3	0,0389556	(-----*-----)
		+-----+-----+-----+-----
	0,0210    0,0280    0,0350    0,0420	

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

TAMAÑO	Mean	-----+-----+-----+-----+-
1	0,0384185	(-----*-----)
2	0,0323556	(-----*-----)
		-----+-----+-----+-----+-
	0,0300    0,0360    0,0420    0,0480	

Figura A-2: Análisis estadístico correspondiente a la actividad endoquitinasa (Diseño factorial de 2 factores)

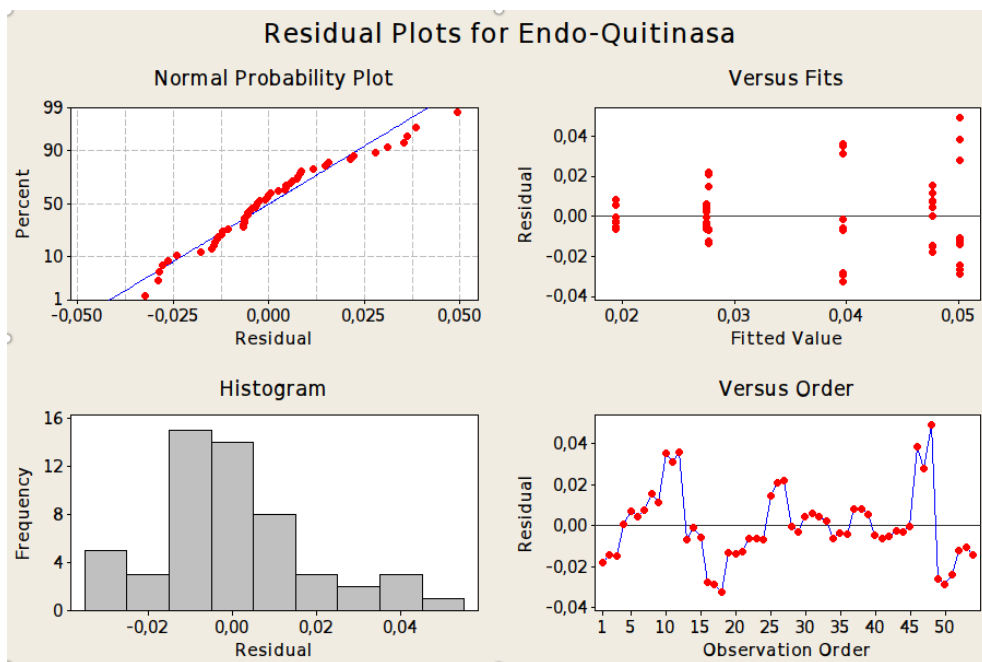


Figura A-3: Dispersión entre los datos obtenidos de actividad endoquitinasa

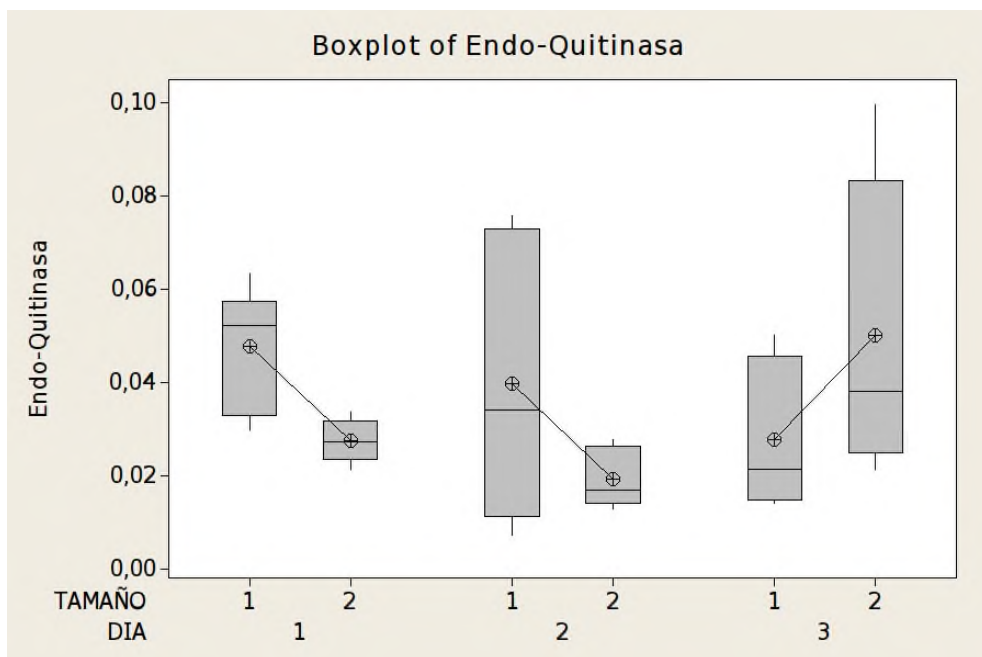


Figura A-4: Comparación de los datos obtenidos de actividad endoquitinasa con respecto al tamaño y día

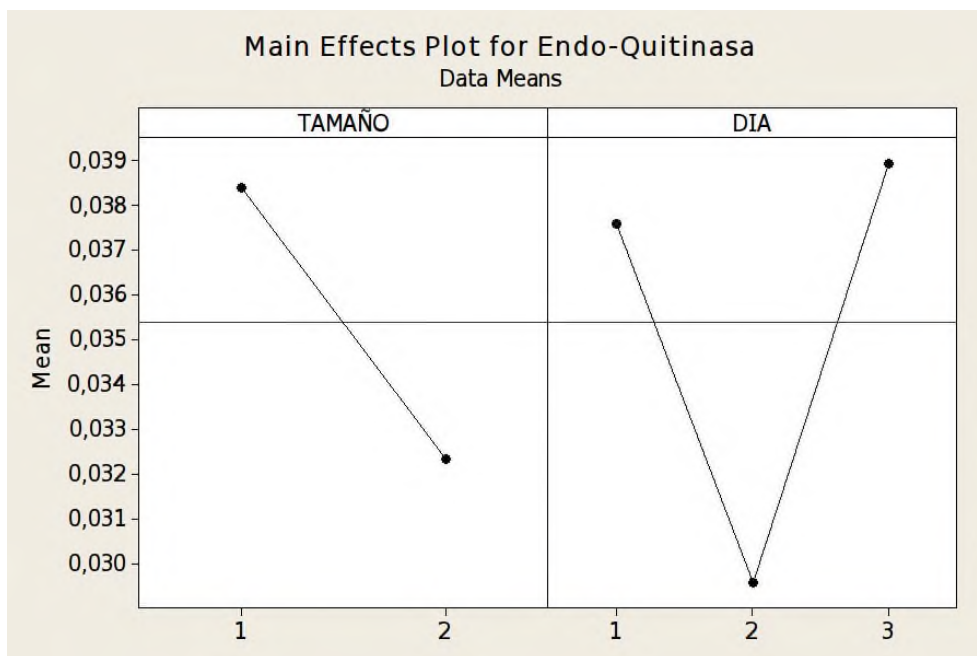


Figura A-5: Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales

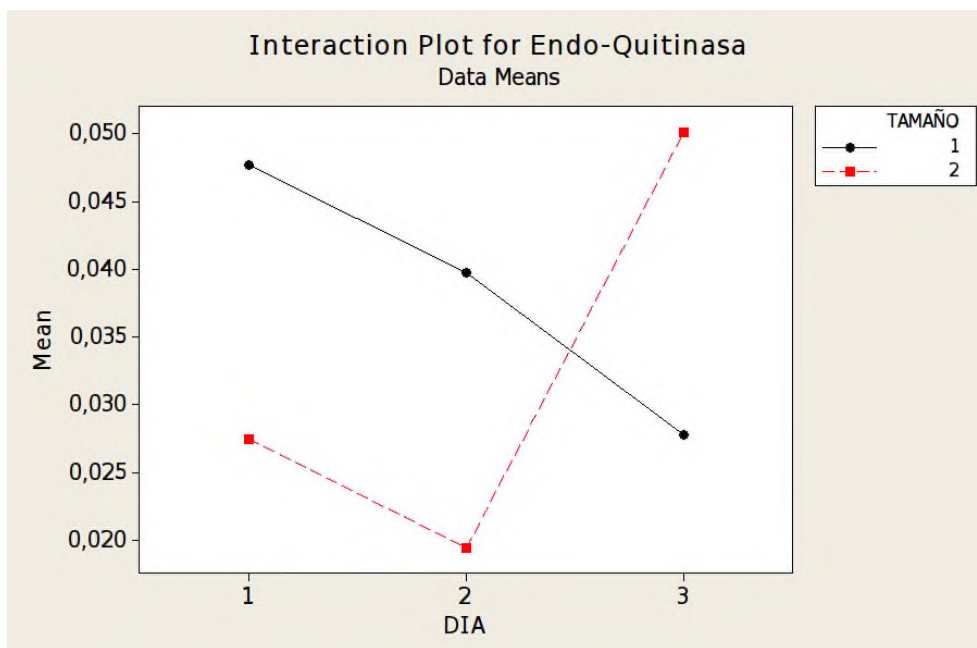


Figura A-6: Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición

## A.6. Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa

Two-way ANOVA: Exo-Quitinasa versus DIA; TAMAÑO

Source	DF	SS	MS	F	P
DIA	2	0,0157674	0,0078837	9,61	0,000
TAMAÑO	1	0,0011025	0,0011025	1,34	0,252
Interaction	2	0,0007025	0,0003513	0,43	0,654
Error	48	0,0393924	0,0008207		
Total	53	0,0569649			

S = 0,02865    R-Sq = 30,85\%    R-Sq(adj) = 23,64\%

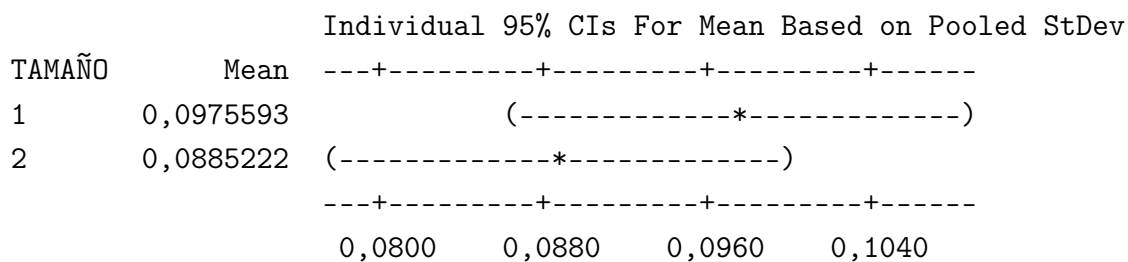
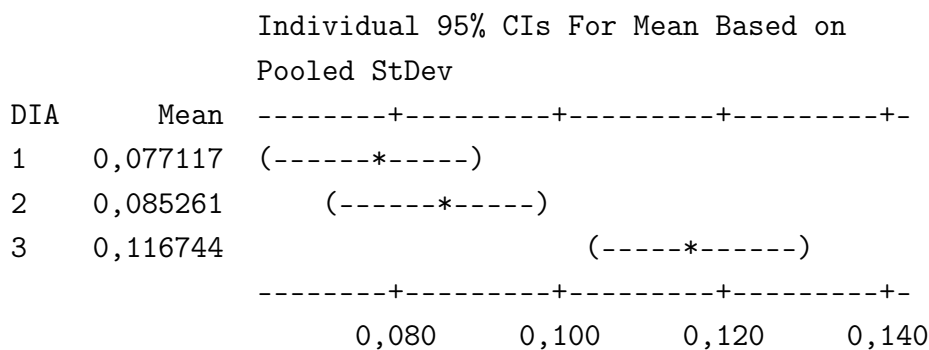


Figura A-7: Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa (Diseño factorial de 2 factores)

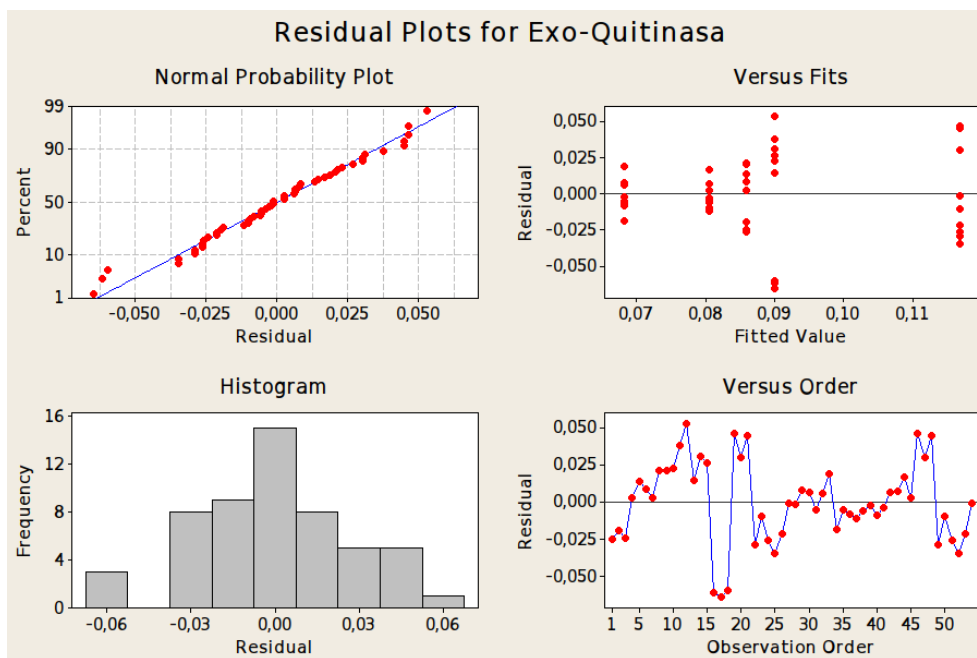


Figura A-8: Dispersión entre los datos obtenidos de actividad exoquitinasa

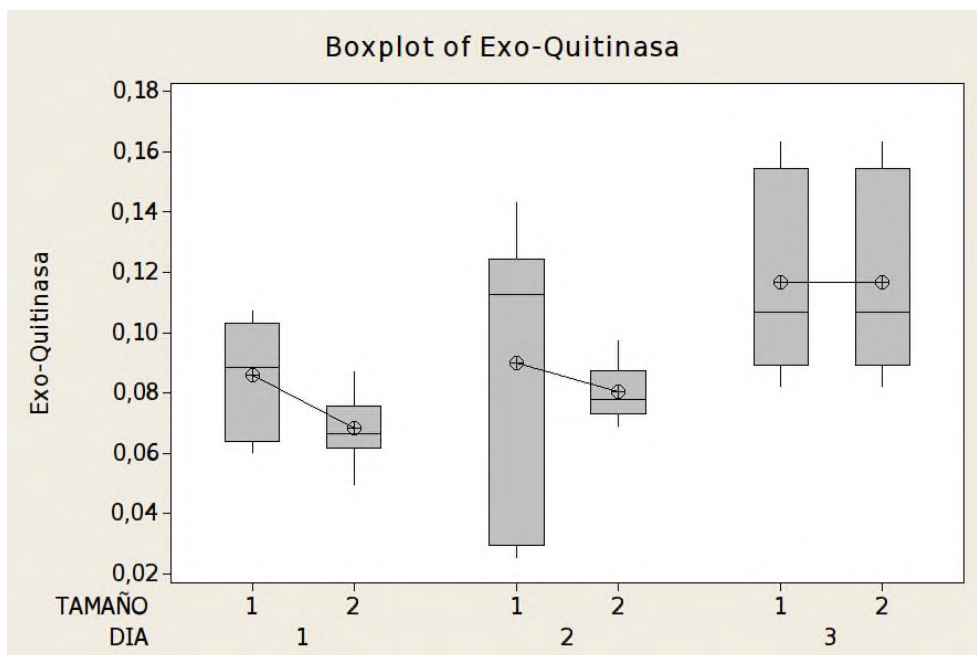


Figura A-9: Comparación de los datos obtenidos de actividad exoquitinasa con respecto al tamaño y día

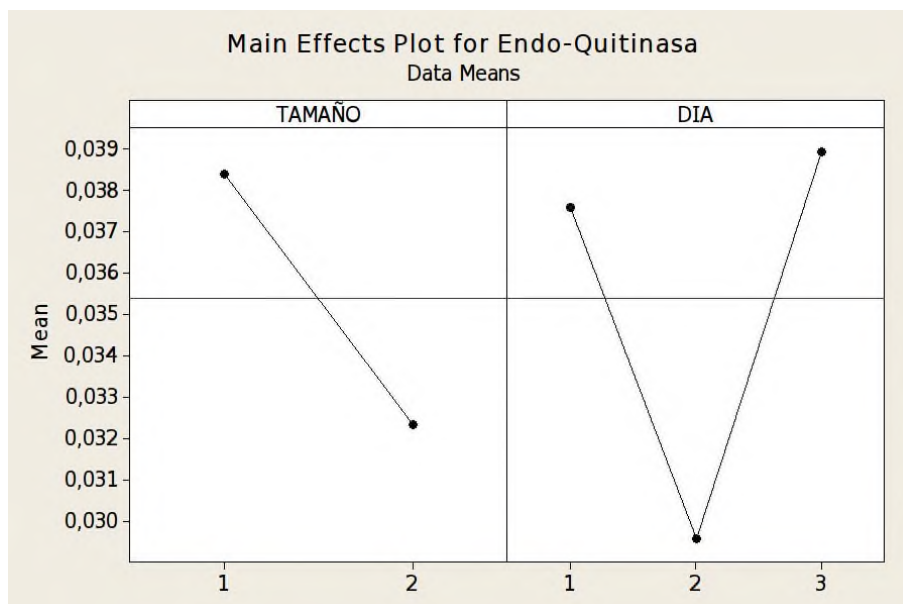


Figura A-10: Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales sobre la actividad exoquitinasa

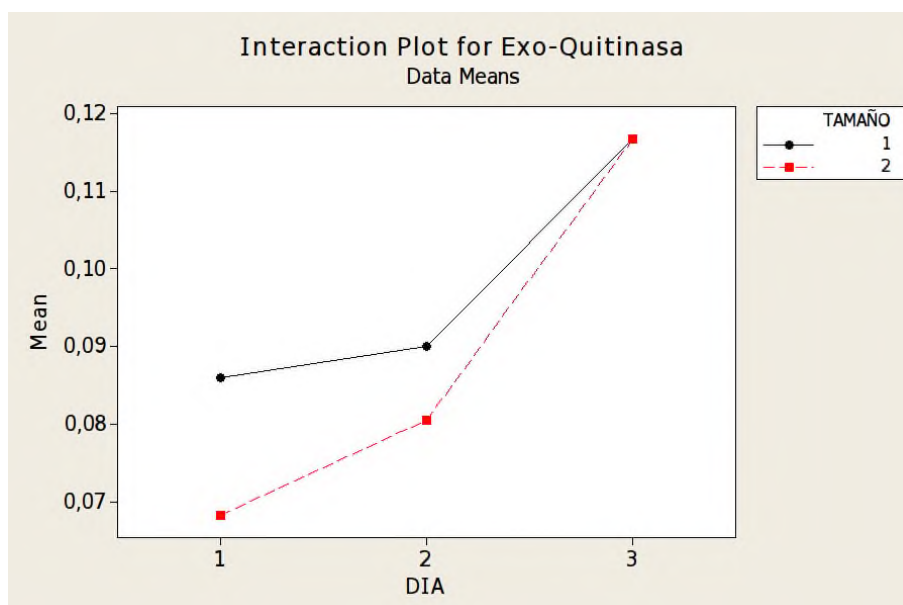


Figura A-11: Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición sobre la actividad exoquitinasa

## A.7. Análisis comparativo de niveles de actividad quitinolítica

Two-way ANOVA: REPLICA versus ACTIVIDAD, TAMAÑO

Source	DF	SS	MS	F	P
ACTIVIDAD	1	0.0140423	0.0140423	86.46	0.000
TAMAÑO	1	0.0032338	0.0032338	19.91	0.000
Interaction	1	0.0000152	0.0000152	0.09	0.762
Error	32	0.0051971	0.0001624		
Total	35	0.0224884			

S = 0.01274 R-Sq = 76.89% R-Sq(adj) = 74.72%

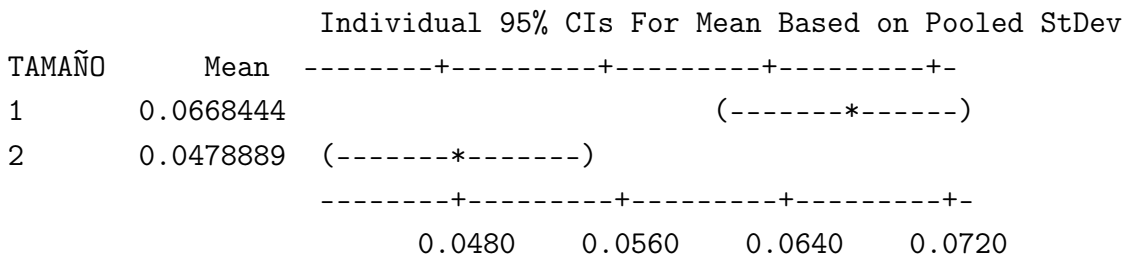
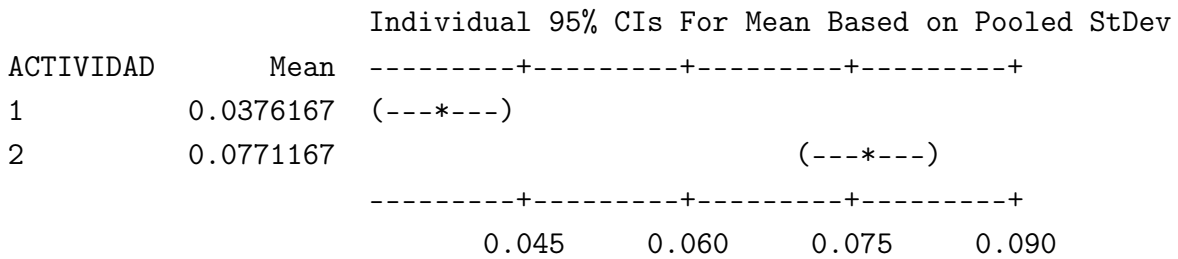


Figura A-12: Análisis estadístico correspondiente a la actividad exoquitinasa y endoquitinasa en el día 6. Donde tamaño 1 corresponde a partículas de lote A, tamaño 2 a partículas del lote B, actividad 1 significa endoquitinasas y actividad 2 corresponde a exoquitinasas.

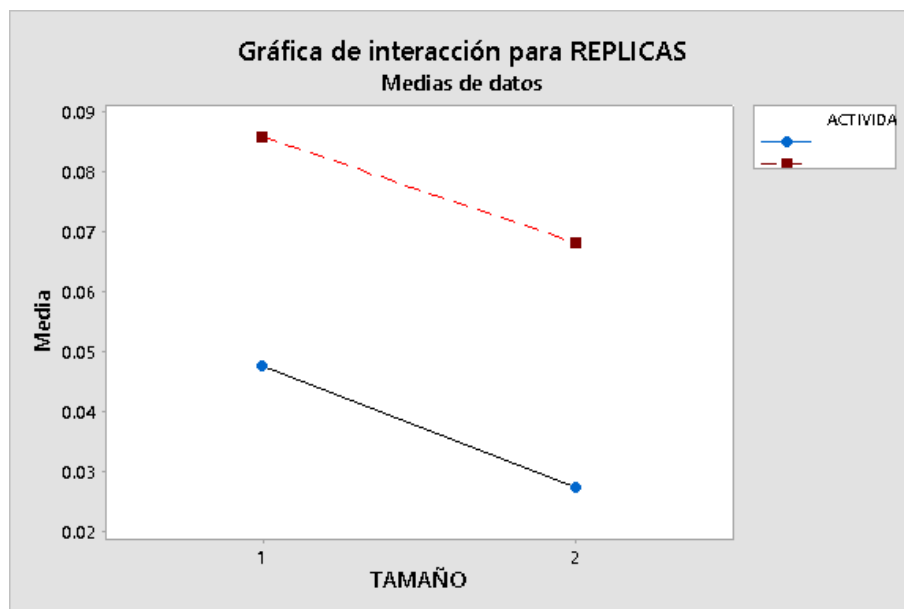


Figura A-13: Niveles de expresión exoquitinasa

## A.8. Análisis estadístico correspondiente a la actividad Quitinasa total

Two-way ANOVA: ACTIVIDAD QUITINASA versus DIA; TAMAÑO

Source	DF	SS	MS	F	P
DIA	2	0,020082	0,0100410	5,45	0,007
TAMAÑO	1	0,003078	0,0030781	1,67	0,203
Interaction	2	0,009641	0,0048203	2,61	0,084
Error	48	0,088511	0,0018440		
Total	53	0,121312			

S = 0,04294    R-Sq = 27,04%    R-Sq(adj) = 19,44%

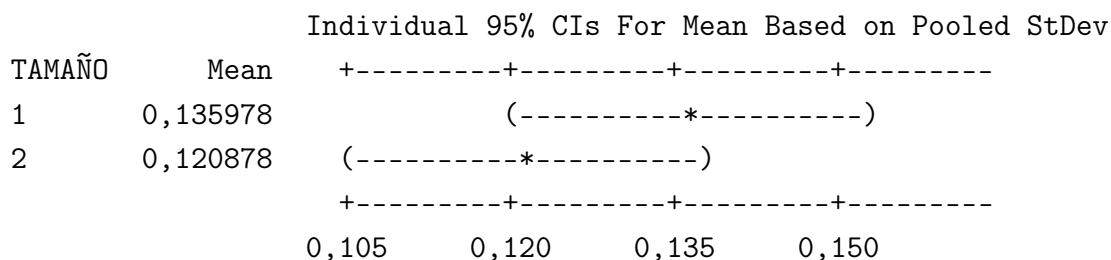
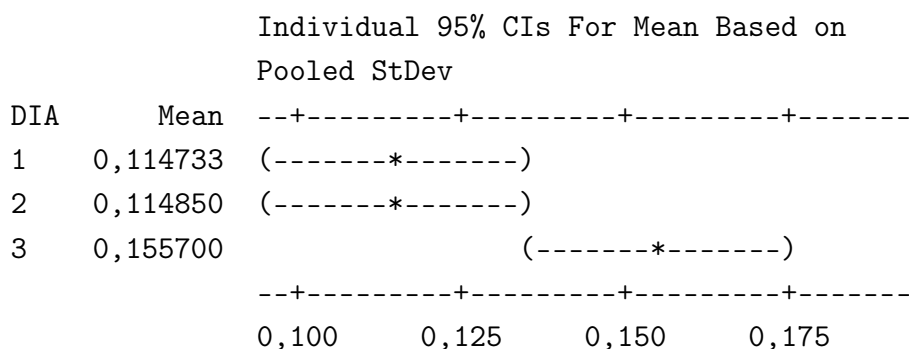


Figura A-14: Análisis estadístico correspondiente a la actividad Quitinasa total(Diseño factorial de 2 factores)

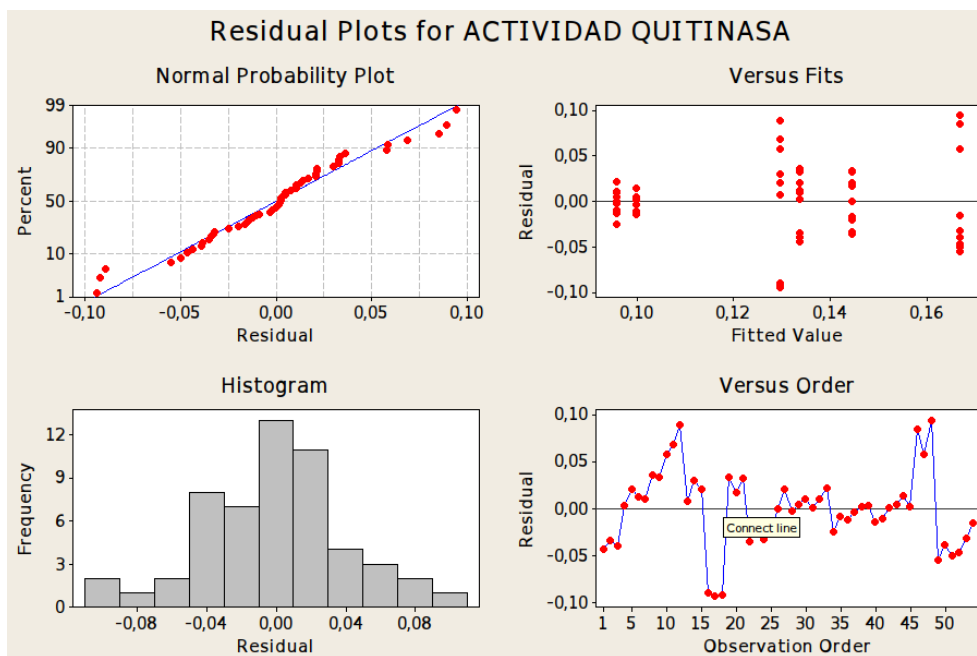


Figura A-15: Dispersión entre los datos obtenidos de actividad Endo-quitinasa

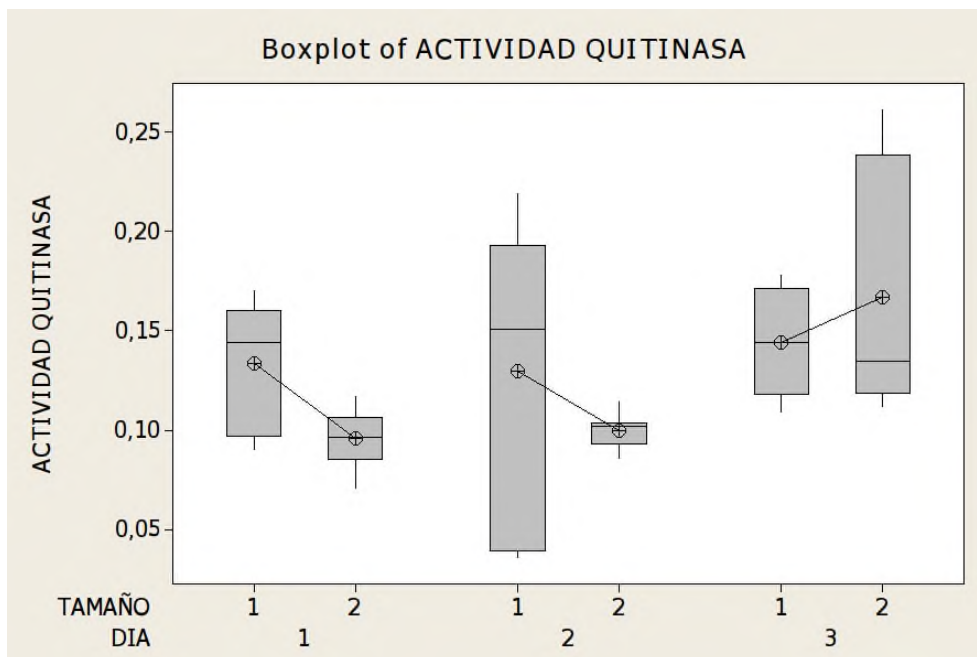


Figura A-16: Comparación de los datos obtenidos de actividad Endo-quitinasa con respecto al tamaño y día

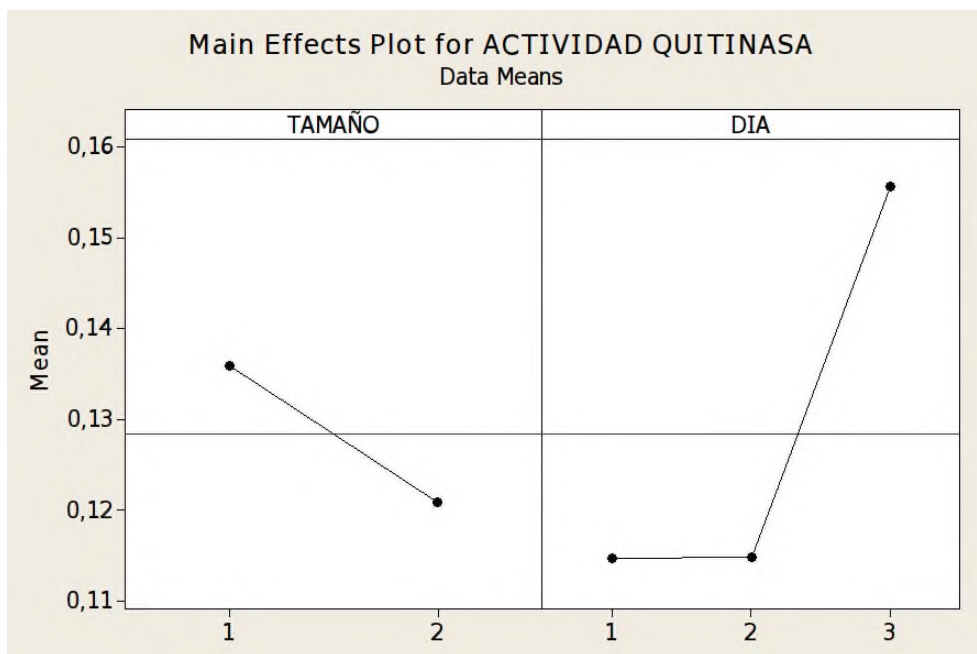


Figura A-17: Efecto del tamaño de partícula y el tiempo como factores individuales

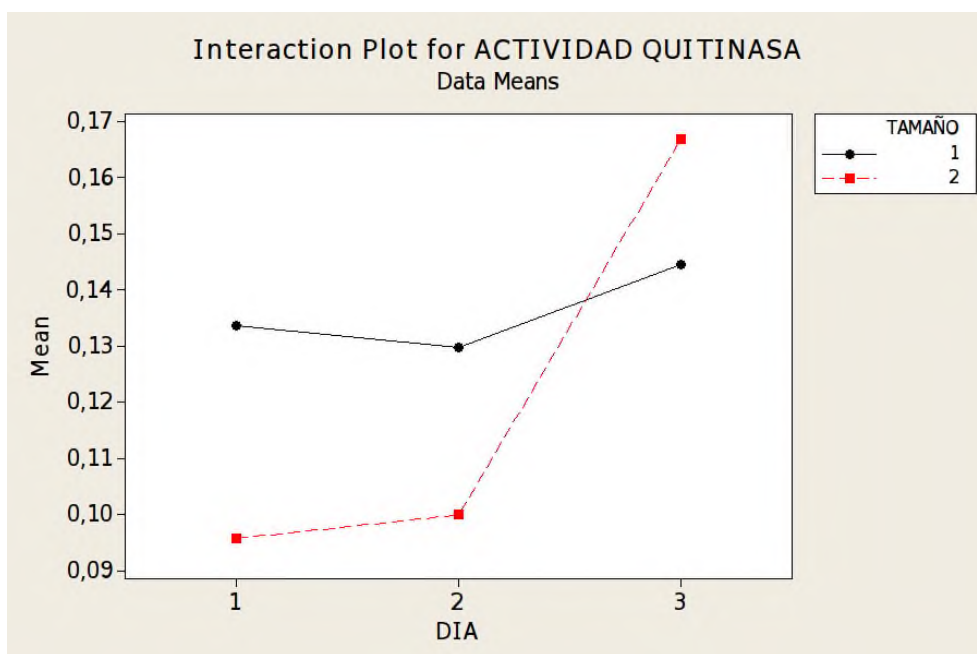


Figura A-18: Efecto de la interacción entre el tamaño de partícula y el tiempo de exposición

## A.9. Pruebas T-Student

Actividad endoquitinasa lote A  
(día 6)

0.0216 0.0299

0.0242 0.0333

0.0247 0.0327

0.0216 0.0483

0.0242 0.0550

0.0247 0.0523

0.0216 0.0555

0.0242 0.0633

0.0247 0.0594

$t_{calc} = 5.739624282$

gl 8

alpha 0.05

$t_{tabla} 1,859548038$

$\mu_1 \neq \mu_2$

Actividad endoquitinasa lote A  
(día 10)

0.0719 0.0750

0.0667 0.0709

0.0731 0.0759

0.0719 0.0330

0.0667 0.0387

0.0731 0.0342

0.0719 0.0119

0.0667 0.0108

0.0731 0.0074

$t_{calc} 1.595778564$

gl 8

alpha 0.05

$t_{tabla} 1.859548038$

$\mu_1 = \mu_2$

Actividad endoquitinasa lote A  
(día 14)

0.0315 0.0146

0.0456 0.0142

0.0432 0.0153

0.0315 0.0215

0.0456 0.0215

0.0432 0.0210

0.0315 0.0426

0.0456 0.0490

0.0432 0.0501

$t_{calc} 1.155430723-1.155430723$

gl 8

alpha 0.05

$t_{tabla} 1.859548038$

$\mu_1 = \mu_2$

Actividad endoquitinasa lote B  
(día 6)

0.0216 0.0273

0.0242 0.0243

0.0247 0.0317

0.0216 0.0336

0.0242 0.0321

0.0247 0.0300

0.0216 0.0214

0.0242 0.0239

0.0247 0.0231

$t_{calc} -2.534371368 2.534371368$

gl 8

alpha 0.05

$t_{tabla} 1.859548038$

$\mu_1 \neq \mu_2$

## A.10. Pruebas T-Student

Actividad endoquitinasa lote B	Actividad endoquitinasa lote B
(día 10)	(día 14)
0.0719 0.0277	0.0315 0.0887
0.0667 0.0278	0.0456 0.0781
0.0731 0.0250	0.0432 0.0995
0.0719 0.0145	0.0315 0.0239
0.0667 0.0131	0.0456 0.0215
0.0731 0.0140	0.0432 0.0260
0.0719 0.0171	0.0315 0.0381
0.0667 0.0166	0.0456 0.0395
0.0731 0.0190	0.0432 0.0361
$t_{calc}$ 3.004335396 3.004335396	$t_{calc}$ -0.703345491 0.703345491
gl 8	gl 8
alpha 0.05	alpha 0.05
$t_{tabla}$ 1.859548038	$t_{tabla}$ 1.859548038
$\mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 = \mu_2$
Actividad exoquitinasa lote A	0.0588 0.1068
(día 6)	0.0614 0.1074
0.0561 0.0603	$t_{calc}$ -4.330903538 4.330903538
0.0588 0.0664	gl 8
0.0614 0.0616	alpha 0.05
0.0561 0.0886	$t_{tabla}$ 1.859548038
0.0588 0.0994	$\mu_1 \neq \mu_2$
0.0614 0.0943	Actividad exoquitinasa lote A
0.0561 0.0887	(día 10)

0.1251 0.1129	0.1442 0.0253
0.1442 0.1278	0.1172 0.0303
0.1172 0.1432	$t_{calc}$ 1.305751956 1.305751956
0.1251 0.1044	gl 8
0.1442 0.1209	alpha 0.05
0.1172 0.1167	$t_{tabla}$ 1.859548038
0.1251 0.0284	$\mu_1 = \mu_2$

## A.11. Pruebas T-Student

Actividad exoquitinasa lote A (día 14)	Actividad exoquitinasa lote B (día 6)
0.0903 0.1633	0.0561 0.0664
0.1087 0.1471	0.0588 0.0764
0.1050 0.1618	0.0614 0.0747
0.0903 0.0880	0.0561 0.0629
0.1087 0.1067	0.0588 0.0742
0.1050 0.0907	0.0614 0.0872
0.0903 0.0822	0.0561 0.0495
0.1087 0.0954	0.0588 0.0630
0.1050 0.1155	0.0614 0.0603
$t_{calc}$ -0.711705893 0.711705893	$t_{calc}$ -2.532406162 2.532406162
gl 8	gl 8
alpha 0.05	alpha 0.05
$t_{tabla}$ 1.859548038	$t_{tabla}$ 1.859548038
$\mu_1 = \mu_2$	$\mu_1 \neq \mu_2$

Actividad exoquitinasa lote B

(día 10)

0.1251 0.0690

0.1442 0.0747

0.1172 0.0778

0.1251 0.0712

0.1442 0.0765

0.1172 0.0872

0.1251 0.0878

0.1442 0.0975

0.1172 0.0831

 $t_{calc}$  1.883211196 1.883211196

gl 8

alpha 0.05

 $t_{tabla}$  1.859548038 $\mu_1 \neq \mu_2$ 

Actividad exoquitinasa lote B

(día 14)

0.0903 0.1633

0.1087 0.1471

0.1050 0.1618

0.0903 0.0880

0.1087 0.1067

0.1050 0.0907

0.0903 0.0822

0.1087 0.0954

0.1050 0.1155

 $t_{calc}$  -0.60754899 0.60754899

gl 8

alpha 0.05

 $t_{tabla}$  1.859548038 $\mu_1 = \mu_2$

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Acosta Quintero, M. E., Cazorla-Perfetti, D. J., Eduarte-Pereira, G., y Morales-Moreno, P. (2011). Patogenicidad dérmica de un aislamiento autóctono del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en ratones. *Revista Científica*, 21(006).
- Aguilar, G. A. G. (2012). *Nuevas tendencias en ciencia y tecnología de alimentos*. Trillas.
- Aminuddin, F., Akhabir, L., Stefanowicz, D., Pare, P., Connett, J., Anthonisen, N., Fahy, J., Seibold, M., Burchard, E., Eng, C., y cols. (2012). Genetic association between human chitinases and lung function in COPD. *Human genetics*, 131(7):1105–1114.
- Argüelles, W., Heras, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C., y San Román, J. (2004). *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*.
- Bargagli, E., Bennett, D., Maggiorelli, C., Di Sipio, P., Margollicci, M., Bianchi, N., y Rottoli, P. (2013). Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis. *Journal of clinical immunology*, 33(1):264–270.
- Braunschweig, T. U. (2016). The Comprehensive Enzyme Information System. consultado en agosto de 2016 en [www.brenda-enzymes.org/](http://www.brenda-enzymes.org/).
- Brinchmann, B. C., Bayat, M., Brogger, T., Muttuvelu, D. V., Tjonneland, A., y Sigsgaard, T. (2011). A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18(1).
- Burton, O. T. y Zacccone, P. (2007). The potential role of chitin in allergic reactions. *Trends in immunology*, 28(10):419–422.

- Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M., y Boot, R. G. (2007). Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*, 177(2):959–970.
- Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (2016). *Directorio de laboratorios reproductores y comercializadores de agentes de control biológico*. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Cho, S. J., Weiden, M. D., y Lee, C. G. (2015). Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy, asthma & immunology research*, 7(1):14–21.
- Chou, Y.-T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., y cols. (2006). Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry*, 45(14):4444–4454.
- del Bosque, R., Bernal, L. Á. A., Hugo, C., y cols. (2007). Teoría y aplicación del control biológico.
- Di Rosa, M., De Gregorio, C., Malaguarnera, G., Tuttobene, M., Biazzo, F., y Malaguarnera, L. (2013). Evaluation of AMCase and CHIT-1 expression in monocyte macrophages lineage. *Molecular and cellular biochemistry*, 374(1-2):73–80.
- Di Rosa, M., Distefano, G., Zorena, K., y Malaguarnera, L. (2016). Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions. *Immunobiology*, 221(3):399–411.
- Donnelly, L. E. y Barnes, P. J. (2004). Acidic mammalian chitinase—a potential target for asthma therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 25(10):509–511.
- Dubey, L. K., Moeller, J. B., Schlosser, A., Sorensen, G. L., y Holmskov, U. (2014). Induction of innate immunity by *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides is enhanced by the composite presentation of chitin and beta-glucan. *Immunobiology*, 219(3):179–188.

- Dubey, L. K., Moeller, J. B., Schlosser, A., Sorensen, G. L., y Holmskov, U. (2015). Chitin enhances serum IgE in *Aspergillus fumigatus* induced allergy in mice. *Immunobiology*, 220(6):714–721.
- Elias, J. A., Homer, R. J., Hamid, Q., y Lee, C. G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T H 2 inflammation and asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 116(3):497–500.
- Facultad de Medicina UASLP, L. d. G. V. y. H. (2008). Universidad Autonoma de San Luis Potosi, 1 edición.
- Funkhouser, J. D. y Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC evolutionary biology*, 7(1):96.
- Galán Franco, L. (2012). *Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México*. PhD thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- García-Gutiérrez, C. y González-Maldonado, M. B. (2013). Síntesis sobre el Uso de Bioinsecticidas y otros Agentes de Control Biológico de Plagas en México. *Vedalia*, 12(1):35–42.
- Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) (2016). Hongos entomopatógenos. consultado en Noviembre de 2016 en <http://www.inbio.ac.cr/papers/entomopatogenos/>.
- Kanneganti, M., Kamba, A., y Mizoguchi, E. (2012). Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *Journal of epithelial biology & pharmacology*, 5:1.
- Kim, L. K., Morita, R., Kobayashi, Y., Eisenbarth, S. C., Lee, C. G., Elias, J., Eynon, E. E., y Flavell, R. A. (2015). AMCcase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. page 201507393.
- Kzhyshkowska, J., Gratchev, A., y Goerdts, S. (2007). Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer. *Biomarker insights*, 2:128.

- Lee, C. G. (2009). Chitin, chitinases and chitinase-like proteins in allergic inflammation and tissue remodeling. *Yonsei medical journal*, 50(1):22–30.
- Lee, C.-G., Da Silva, C. A., Cruz, C. S. D., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., He, C.-H., Takyar, S., y Elias, J. A. (2011). Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of physiology*, 73.
- Lee, C. G., Da Silva, C. A., Lee, J.-Y., Hartl, D., y Elias, J. A. (2008a). Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current opinion in immunology*, 20(6):684–689.
- Lee, C. G., Da Silva, C. A., Lee, J.-Y., Hartl, D., y Elias, J. A. (2008b). Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current opinion in immunology*, 20(6):684–689.
- Lelito, J., Lavallée, R., Lomeli, J. R., y Marcotte, B. L. M. (2013). Documento de Ciencia y Tecnología de la NAPPO.
- Mexicana, N. O. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *NOM-062-zOO-1999*.
- Mier, T., Olivares-Redonda, G., Navarro-Barranco, H., Pérez-Mejía, A., Lorenzana, M., Pérez-Torres, A., y Toriello, C. (2005). Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88(2):103–111.
- Palomar, L. T., Pelaez, E. V., Díaz, L. C., Moreno, M. G. A., Velázquez, Á. G., Beleño-Cabarcas, M. T., y Castro-Toscano, M. J. (2015). Comparación de tres tecnologías en la preservación de conidias de hongos filamentosos y pruebas de viabilidad. *Ciencia y Tecnología*, 1(15).
- Paoletti, M. G., Norberto, L., Damini, R., y Musumeci, S. (2007). Human gastric juice

- contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(3):244–251.
- Peteira, B., González, I., Arias, Y., Fernández Turro, A., Miranda, I., y Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1):16–22.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1):36–42.
- Shuhui, L., Mok, Y.-K., y Wong, W. F. (2009). Role of mammalian chitinases in asthma. *International archives of allergy and immunology*, 149(4):369–377.
- Sociedad Iberoamericana de quitina (2016). Quitina-Quitosano. Consultado en <http://www.siaq.net/quitina.html>.
- Sotgiu, S., Angius, A., Embry, A., Rosati, G., y Musumeci, S. (2008). Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Medical hypotheses*, 70(4):819–825.
- Tamez Guerra, P., Galán Wong, L. J., Medrano Roldán, H., García Gutiérrez, C., Rodríguez Padilla, C., Gómez Flores, R. A., y Tamez Guerra, R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 4(2):143–152.
- Tronsmo, A. y Harman, G. E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical biochemistry*, 208(1):74–79.
- Urtubia, I. y France, A. (2007). Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en la agricultura. *Revista Tierra Adentro Santiago de Chile*, 81:46–49.
- Vega, F. E. y Blackwell, M. (2005). *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press.

- Vicencio, A. G., Narain, S., Du, Z., Zeng, W. Y., Ritch, J., Casadevall, A., y Goldman, D. L. (2008). Pulmonary cryptococcosis induces chitinase in the rat. *Respir Res*, 9(1):40.
- Wiesner, D. L., Specht, C. A., Lee, C. K., Smith, K. D., Mukaremera, L., Lee, S. T., Lee, C. G., Elias, J. A., Nielsen, J. N., Boulware, D. R., y cols. (2015). Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. *PLoS Pathog*, 11(3):e1004701.
- Zapata, F. G. B. (2004a). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. El Colegio Nacional.
- Zapata, F. G. B. (2004b). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. El Colegio Nacional.
- Żurawska-Płaksej, E., Ługowska, A., Hetmańczyk, K., Knapik-Kordecka, M., Adamiec, R., y Piwowar, A. (2015). Proteins from the 18 glycosyl hydrolase family are associated with kidney dysfunction in patients with diabetes type 2. *Biomarkers*, 20(1):52–57.



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

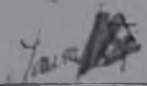
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 20 de Febrero del 2017 a las 12:00 hr. se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Efecto del suministro de partículas quitinosas de origen fúngico sobre la actividad quitinasa en ratones Balb/c** presentado por el alumno **Osiris Lizbeth Garcia Maldonado**, con número de matrícula 11090011, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron **QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN**.


Tuxtepec, Oax., a 20 de Febrero del 2017.

### ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA

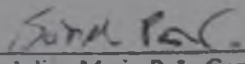
Director de Tesis

  
Dra. Laura Patricia Ramirez Couñho  
Profesor- Investigador

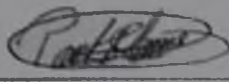
Co-Director de Tesis

  
M.C. Alejandro Olvera Rodriguez  
Profesor- Investigador

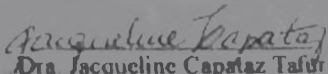
Presidente

  
Dr. Julian Mario Peña Castro  
Profesor- Investigador

Secretario

  
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo  
Profesor-Investigador

Vocal

  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur  
Profesor- Investigador