



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Medicina
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

Tesis

Identificación y caracterización del bacterioma productor de
pirroloquinolina quinona en individuos sanos y pacientes con
colitis ulcerosa crónica inespecífica

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Médicas e Investigación

Presenta

Sandra Jessica Olivera Hernández

Directores

D.C. Cheryl Zilahy Diaz Barrientos

D.C. Ricardo Carreño López

Puebla, Puebla, México

febrero , 2023

Directores de tesis



D.C. Cheryl Zilahy Diaz Barrientos



D.C. Ricardo López Carreño



Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

Revisores de tesis



D.C. Maura Cárdenas García



M.C. Verónica Anuette Mayoral



M.C. María Guadalupe González González



Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para realizar la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación a través de la beca de PNCP, con número de registro 885. Así como a las instituciones que hicieron posible la elaboración del presente proyecto: Facultad de Medicina, Vicerrectoría de Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

A mis directores la Dra. Cheryl Diaz Barrientos por su apoyo; y al D.C. Ricardo López Carreño por su apoyo y enseñanzas en el transcurso de la maestría tanto en lo teórico como en la práctica de laboratorio; ambos por el apoyo en la realización de este proyecto. Finalmente, a la Dra. Julia María Alatorre Cruz por toda su ayuda y guía en el análisis estadístico y en el seguimiento con las encuestas proporcionadas a los pacientes.

Dedicatoria

Quiero agradecer y dedicar esta tesis principalmente a mi tío Luis Hernández Álvarez QEPD y a mi papá Mauricio Olivera; ya que sin ellos no habría conocido esta maestría; mi tío siempre me impulsaba y sabía las mejores opciones de carreras en donde yo podría aprender y sacar provecho para mi desarrollo profesional, mil gracias hasta el cielo tío, siempre acudí a ti para todo tipo de consejos, desde profesionales, académicos, hasta emocionales y de la vida. A mi papá por tener la confianza en mí, de poderme realizar como profesional e impulsarme en todos mis deseos de la vida; por sentir orgullo de mi al poner empeño de mi parte en cada etapa de la maestría y al recordarme que debo tener paciencia y constancia en las cosas que me comprometo.

Un agradecimiento especial a mis amigas de maestría principalmente a Dianelly, Paulina, Karla y Marisol; quienes se convirtieron en muy gratas amistades en el transcurso de la maestría y a quienes les tengo un cariño y aprecio especial ya que nos acompañamos en desvelos, tareas, proyectos y situaciones personales.

A mi familia que sin el apoyo de ellos no hubiera recaudado la paciencia y recargado el desvelo ante los días pesados de esta travesía; más profundo el agradecimiento especialmente a mi hermano May, mis tías Dona y Vero; mis primas Stephany y Diana Pao.

Finalmente, pero que no carece de importancia, a mi madre QEPD Martha Patricia Hernández; por estar en cada paso de mi destino alentándome como mejor lo sabía hacer; por esas platicas internas a medianoche de la tesis y de más cosas. Por siempre estar conmigo de diferentes formas y cuando más la necesito.

Resumen

Las Enfermedades Inflamatorias del Intestino (EII), son mayormente conocidas por sus formas de Cuci y Crohn, donde Cuci es distinguido por ser una inflamación específicamente en el colon con afectación solo a nivel de la mucosa. La etiología de esta sigue siendo no muy clara, y los factores de riesgos más importantes para esta son: la alimentación y las infecciones por microorganismos; siendo este último importante ya que se ha demostrado en estudios de metagenomas una disbiosis del bacterioma y se han querido demostrar que esta disbiosis conjuntada con un aumento en las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) puede agravar estas enfermedades. Los EROs conocidos por provocar destrucción tisular causada por reacción de oxidación se ven exacerbados en Cuci; y los mecanismos antioxidantes naturales que están en nuestro cuerpo no son suficientes.

Tomando en cuenta lo anterior, existe un cofactor denominado Pirroloquinolina quinona (PQQ), que es sintetizado por algunas bacterias y liberado al medio, el cual puede ser utilizado por otras células, ya sea como cofactor o como molécula antioxidante, por lo que pensamos que en padecimientos donde haya estrés oxidativo ésta podría actuar ya sea mejorando los síntomas al eliminar especies reactivas o bien ayudando a bacterias sensibles a las EROS a establecerse en esos ambientes.

Tras el incremento en la incidencia de Cuci, es pertinente realizar investigaciones que permitan conocer los mecanismos involucrados en la enfermedad, por lo que se intentó caracterizar el bacterioma potencialmente productor de PQQ en muestras fecales de pacientes con Cuci e individuos sanos, mediante metodologías moleculares, utilizando un marcador molecular derivado del operón de genes de biosíntesis de PQQ.

Como resultados del análisis de la presencia de dicho marcador en secuencias derivadas de metagenomas, se identificó mediante un análisis filogenético la presencia de géneros bacterianos patógenos en individuos con Cuci,

como *Hyllemonella gracilis* y la ausencia de otros géneros beneficiosos para el ser humano como el género *Bacteroidetes*.

Además, se realizó un análisis estadístico tomando en cuenta los hábitos alimenticios, la gravedad de la enfermedad y los parámetros bioquímicos de los pacientes. Donde se encontró el consumo de ciertos alimentos que se relacionan con algunos síntomas como dolor abdominal, consistencia de las heces, cantidad de evacuaciones y gravedad de la enfermedad (puntuación de PUCAI).

Palabras clave: Bacterioma, Pirroloquinolina quinona, Colitis ulcerosa crónica inespecífica.

Índice

Capítulo 1	14
1. Antecedentes Generales	14
Capítulo 2	32
3. Planteamiento del problema.....	32
4. Hipótesis.....	34
6. Objetivos.....	36
1. General:.....	36
2. Específicos:	36
7. Material y métodos.....	37
7.1. Diseño de estudio:	37
7.2. Ubicación espacio - temporal	37
7.3. Muestra:	37
Definición de la Población:.....	37
Tamaño de muestra:.....	37
7.4. Criterios de selección de la muestra.....	37
Criterios de inclusión para pacientes:.....	37
Criterios de inclusión para grupo control:	38
Criterios de exclusión para pacientes:.....	38
Criterios de exclusión para grupo control:	38
Criterios de eliminación:	38
Diseño y tipo de muestreo:.....	38
7.5. Definición de las variables y escala de medición:	38
Variables demográficas:.....	38
Variables Metabólicas:.....	38
Variables Clínicas:	39
7.6. Técnicas y procedimientos:	39
Registro de protocolo en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:	39
Registro de protocolo ante comité del hospital universitario de puebla (HUP):	39
Identificación de la población:.....	40
Búsqueda bioinformática de posibles bacterias sintetizadoras de PQQ.....	40
Toma de muestra fecal	41

Información y firma del consentimiento:.....	41
Caracterización Clínica:	41
Análisis clínicos:	41
Manejo de muestra y extracción ADN bacterial	41
Amplificación y detección de biomarcador <i>pqqCDE</i>	42
Análisis Estadístico:.....	42
Métodos de recolección de datos:	43
Historia clínica (expediente clínico):.....	43
Consentimiento informado:.....	43
Obtención de heces fecales:.....	43
Parte <i>in silico</i>	43
Análisis de bases de datos de secuencias de metagenomas.....	43
7.7. Análisis estadístico:	46
8. Resultados:	47
Capítulo 3	84
15. Bibliografía:	88
16. Anexos	92
16.1. Carta de consentimiento informado:	92
16.2. Bioética:	95
16.4. Lógistica	98
Recursos humanos:	98
Recursos Materiales:.....	98
Recursos Financieros:.....	98
16.5. Tabla de variables	98
16.6. Descripción de la técnica de medición de las variables.....	101
16.6.1. Manual de toma de muestras fecales	101
16.6.2. Extracción de DNA	101
11.6.3. Electroforesis y buffer TAE 10x	102
15.7. Instrumentos de medición	103
Amplificación del marcador molecular	103
Electroforesis:.....	104

Lista de figuras

Figura 1. Estructura genética y funciones de los genes del operón pqqABCDE de <i>Glucanobacter oxydans</i>	26
Figura 2. Primer paso de la síntesis de PQQ.	27
Figura 3. Segundo paso en la síntesis de PQQ.	27
Figura 4. Tercer paso en la síntesis de PQQ.....	27
Figura 5. Paso cuatro en la síntesis de PQQ.....	28
Figura 6. Paso 5 en la síntesis de PQQ.	28
Figura 7. Ejemplo de descargas de secuencias. Programa virtual machine terminal.	44
Figura 8. Ejemplo de conversión de las secuencias a fasta con SRAToolkit:	45
Figura 9. Diagrama de la metodología utilizada.	45
Figura 10. Alineamiento de secuencias.	55
Figura 11. árbol filogenético de individuos sanos.	55
Figura 12. Arbol filogenético de pacientes con CUCI.	56
Figura 13. Clado de sanos.	57
Figura 14. Segundo clados de sanos.....	58
Figura 15. Clados de CUCI.....	59
Figura 16. Clados de CUCI con <i>Escherichia</i>	60
Figura 18. Gel 1.....	75
Figura 19. Segundo gel.	76
Figura 20. Análisis electroforético de amplicones derivados de la PCR con el marcador molecular pqqCDE.	77

Lista de Tablas

Tabla 1. Femeninos y masculinos en el estudio con diagnóstico de Cuci y sujetos sanos.	47
Tabla 2. Frecuencia de las edades.	48
Tabla 3. Ocupación de los sujetos en estudio.	51
Tabla 4. Lugar de residencia de los sujetos en el estudio.	53
Tabla 5. Estudios de metagenomas humanos de EII y sanos	54
Tabla 6. Tipo de actividad física.....	61
Tabla 7. Tiempo a la semana en minutos de la actividad física.	62
Tabla 8. Tabaquismo en los sujetos de estudio	62
Tabla 9. Enfermedad extra de los sujetos en estudio.....	63
Tabla 10. Presencia de estreñimiento.....	64
Tabla 11. Horas de sueño, deposiciones al día y a la semana.....	65
Tabla 12. Sangrado en heces de sujetos en estudio.....	65
Tabla 13. Duración del sangrado en heces.....	66
Tabla 14. Presencia o ausencia de hemorroides	66
Tabla 15. Presencia o ausencia de dolor abdominal.....	67
Tabla 16. Sensación incompleta al evacuar	67
Tabla 17. Tipo de heces en los sujetos de estudio.....	68
Tabla 18. Consumo de laxantes	69
Tabla 19. Tratamiento médico actual.....	69
Tabla 20. Uso de mesalazina como tratamiento	70
Tabla 21. Tipo de alimento mas consumible por los sujetos de estudio, dulce, salado o picozo.....	72
Tabla 22. Suplementos alimenticios que consuman a la fecha.....	72
Tabla 23. Tratamiento nutricional	73

Lista de gráficas

Gráfica 1. Diagnóstico de sanos y Cuci (n=21) de los sujetos en el estudio	49
Gráfica 2. Estado civil de todos los sujetos en el estudio	50
Gráfica 3. Nivel de estudios	52
Gráfica 4. Ausencia/presencia y tiempo de estreñimiento	64
Gráfica 5. Índice de masa corporal en los sujetos de estudio	71

Lista de Abreviaturas:

ADH		GDH	
hormona antidiuretica	22	Glutamato deshidrogenasa	22
CFB		IBD	
Cytophaga-Flavobacterium-		Inflammatory Bowel Disease.....	16
Bacteroides.....	14	LTQ	
Cuci		Tiosil lisina quinona	22
Colitis ulcerosa cronica inespecifica..	17	PQQ	
EC		Pirroloquinolina quinona	21
Enfermedad de Crohn	17	rRNA	
EII		Acido desoxirribonucleico ribosomal...	14
Enfermedades Inflamatorias		TPQ	
Intestinales.....	16	Topaquinona.....	22
ERO		TTQ	
Especie Reactiva de Oxigeno	20	Triptofano quirosil quinona	22

Capítulo 1

1. Antecedentes Generales

El bacterioma intestinal y sus características generales.

Actualmente existen dos términos usados en investigación microbiota y microbioma, el “microbioma” se refiere a los genes que se incluyen en los genomas de especies representadas en un bacterioma, mientras que el “microbiota” es el conjunto de seres que están en un mismo ambiente. Por otro lado, cuando alguien se refiere al “bacterioma normal”; se designa “normal” (bacterioma normal) a especies de la bacterioma que comúnmente se encuentran en individuos saludables, aun cuando la ecología microbial del intestino tiene un variado grado espacial y complejidad temporal que hacen que la definición de “normal” sea igualmente de diversidad y una difícil tarea para los investigadores(1).

En este estudio se trabajó con el término de bacterioma, el cual, es el conjunto de genes de células bacterianas que hay en un solo lugar o un medio ambiente(2). Esto debido a que, se ha visto que en varios estudios se refieren a bacterioma y microbioma como términos iguales, sin embargo, el “microbioma” en términos más científicos se le conoce como todos los genomas que se encuentran en un medio ambiente, esto incluye bacterias, hongos, protozoarios, virus, etcétera (3). Mientras que el término Bacterioma se refiere al conjunto de genes, únicamente de filos, géneros y familias de bacterias en un medio ambiente (1).

Los humanos antes de nacer llegan a estar en un estado prácticamente libre de gérmenes. Casi al instante de nacer, varios microorganismos provenientes de la madre o incluso del medio ambiente empiezan a colonizar muchos lugares de nuestro cuerpo(4). Esta colonización específicamente en el intestino es de suma importancia ya que ayuda en el adecuado desarrollo del ser humano y en su salud. Los efectos de esta colonización son particularmente más activos en el intestino o tracto digestivo, donde existe una gran variedad de tipos de

bacterias, este número llega a sobrepasar el número de células totales en el ser humano. Se piensa que la exposición a los primeros microorganismos empieza al dar a luz, en el canal de parto y en el medio ambiente inmediato al que se expone (5).

Las relaciones entre el bacterioma y el huésped se centran en la simbiosis y son bastante complejas, muchas bacterias utilizan varias características y funciones del mismo huésped o de otras bacterias para poder así sobrevivir en el intestino(6). Sin embargo, el crecimiento de las bacterias siempre es supervisado por el propio organismo del huésped, la composición del bacterioma intestinal es afectada por muchos factores incluyendo el propio sistema inmune, la genética y elementos del medio ambiente. Por lo tanto, es necesario el funcionamiento adecuado de todos los sistemas en el cuerpo del huésped ya que el bacterioma es vital para la homeostasis intestinal. La relación entre las bacterias intestinales y la salud fue establecida por diferentes estudios (5).

Además de que el bacterioma contribuye a la digestión en el tracto gastrointestinal, estas tienen diferentes funciones que son esenciales para el ser humano, en estas se incluye la producción de vitaminas, educación del sistema inmune, en el cual el sistema inmune detecta la microbiota y si esta llega a presentar cambios, el sistema inmune cumple su rol atacando a lo extraño y hace que el bacterioma vuelva a su estado basal, también existe la comunicación con las células intestinales e incluso modulación del comportamiento del propio huésped (7).

Diversidad en el bacterioma del intestino humano

La verdadera biodiversidad del intestino es aún no concreta ya que la mayoría de los microorganismos no se pueden cultivar a nivel *ex vivo* (1), lo que se sabe es que en el tracto gastrointestinal de un humano en etapa adulta contiene tres diferentes dominios de vida: Bacteria, Arquea y Eucariota. De estos tres

dominios, el dominio de Bacteria llega a tener una densidad celular mucho más alta que los otros dos. La división bacterial que predomina de estos es la de los Cytophaga-Flavobacterium- Bacteroides (CFB), que como ejemplo tenemos a los Bacteroides, Firmicute y Clostridium por mencionar algunos. Cada uno de estos comprende el 30% de bacterias en las heces y en la sobre capa mucosa en el epitelio intestinal (8).

La diversidad presentada en el tracto gastrointestinal ciertamente parece ser por una selección específica del huésped y su coevolución con este bacterioma, por así decirlo, los miembros de bacterias de CFB son los más derivados de todos indicando que tuvieron una evolución más acelerada en el momento que tuvieron el vínculo o la simbiosis con el huésped a diferencia de las demás divisiones de bacterias (8).

Se ha estudiado que la comunidad bacteriana en su punto culminante de diversidad en la zona fecal de un adulto va a ser influenciado tanto por los factores ambientales como por los genotipos del mismo huésped, esto se ha reportado en varios estudios por Zoetendal et. al. Quien reportó que mellizos mono-cigotos tienen transcritos de rRNA 16S del bacterioma más similar que una pareja casada(3). Sin embargo, aunque las variaciones de las composiciones del bacterioma cambien en los individuos, estos tienen una función de estabilidad similar con las reacciones bioquímicas, degradación de carbohidratos, fermentación y síntesis de vitaminas(1).

Contribuciones del bacterioma al ser humano

En la interacción entre el bacterioma y el huésped se puede observar que se trata de un vínculo que abarca la simbiosis, el comensalismo y la patogenicidad. Simbiótico en el sentido de que ambos son beneficiados por ambas partes, mientras que la relación con patogenicidad es cuando se beneficia de un lado a expensas del otro. Las relaciones de comensalismo son definidas así cuando un lado se beneficia sin necesariamente restarle beneficios al otro; esta lleva a cabo

muchas reacciones químicas y por eso se le toma en cuenta como un “órgano” activo en el huésped; esta juega un rol crítico en la nutrición por degradar un número alto de sustancias en la dieta cotidiana que de otra manera el ser humano sería incapaz de digerir (1).

Microbiólogos famosos del pasado y del ahora, han enfatizado la importancia del entendimiento de las contribuciones del bacterioma al ser humano en cuanto a la salud o enfermedad. Las herramientas computacionales y los experimentos han ido en desarrollo para poder caracterizar la naturaleza de la diversidad microbiana en el intestino, sus caracteres genómicos y los principios que tienen para dar nutrientes al huésped, un ejemplo de esto es que en ciertas enfermedades como las Inflammatorias Intestinales, se ha demostrado que cuando los animales que tienen un ambiente intestinal libre de gérmenes manifiestan menos signos de inflamación que aquellos que si presentan (8)(9).

El Bacterioma y su resiliencia

Este complejo ecosistema del bacterioma es característico de tener la capacidad también de regenerarse a sí mismo, esto también es conocido como el fenómeno de resiliencia. Gracias a este fenómeno, el bacterioma intestinal tiene la habilidad de regresar a su equilibrio después de haber sufrido una perturbación externa como una infección de un patógeno o estar bajo influencia de un tratamiento con antibióticos. Así pues, el concepto teórico es descrito como la capacidad de un ecosistema en recuperarse de una perturbación modulada que comprende 4 partes: latitud (grado máximo del sistema donde puede ser cambiado por una perturbación antes de que pierda la propiedad de recuperar su estado basal), resistencia, precariedad (la distancia del estado homeostático inicial a un límite donde no hay regreso) y panarquía (la influencia de un estado organizacional de un ecosistema que tiene para tratar el estrés) (10).

Los ecosistemas complejos como el de las comunidades microbianas en el intestino tienen un número limitado de estados estables en equilibrio. El término “estado” se refleja en una dinámica de equilibrio, el cual tiene fluctuaciones menores que son asociadas con distintas funciones. Si estas funciones son benéficas para el huésped se catalogarán como un complejo de simbiosis. Sin embargo, si el estado de equilibrio estable es asociado con funciones que deploran al huésped son considerado un estado de disbiosis. La disbiosis ocurre cuando en el bacterioma hay una continuidad de una cierta enfermedad o malestar que no se puede atribuir a solo una especie de bacteria. Un ejemplo a esto es cuando el bacterioma contribuye al desarrollo de una enfermedad crónica intestinal como un síndrome metabólico o una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD por sus siglas en inglés, Inflammatory Bowel Disease, o EII por sus siglas en español), por estas razones es necesario entender el mecanismo de la estabilidad en la bacterioma en el hecho de que las perturbaciones continuas pueden llegar a afectar de modo crónico la salud humana (10).

Dentro del ejemplo de las EII se tiene muy bien establecido el rol del bacterioma comensal en la iniciación y perpetuación en la enfermedad de Crohn, donde ocurre una disbiosis generalizada, aunque aún no se sabe por falta de estudios y pruebas, si la disbiosis es consecuencia de la enfermedad o viceversa (11).

Cuci: Colitis ulcerosa crónica inespecífica **Cuci y las Enfermedades Inflamatorias del Intestino (EII)**

Cuando se habla acerca de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD o EII en español), este se refiere a un grupo de desórdenes inflamatorios en el tracto gastro intestinal en el cual se incluyen dos fenotipos, la enfermedad de Crohn (CD por sus siglas en inglés o EC en español) y a la colitis ulcerosa (UC en inglés o Cuci en español). La EII ocurre tanto en adultos como en pacientes pediátricos, pero la mayoría de los pacientes con EII son diagnosticados en la población pediátrica. Las principales manifestaciones clínicas de la EII son:

diarrea, dolor abdominal, fistulas y lesiones perineales que afectan a todo el tracto digestivo y causa síntomas sistemáticos (12).

Cuci se caracteriza por una inflamación continua de la mucosa del colon. De extensión se limita únicamente al colon, iniciando desde el recto hasta el colon proximal. Por otro lado, la EC es una afectación discontinua y con carácter transmural, que puede desarrollarse en cualquier tramo del tracto digestivo, aunque su localización principal es en el íleon terminal y en el colon. La etiología y patogénesis de Cuci sigue siendo no muy clara. Hoy en día se asume que Cuci ocurre a individuos con influencia genéticamente susceptibles, del sistema inmune, resultado de una activación inadecuada y continua del sistema inmunitario de la mucosa intestinal, en respuesta a un antígeno luminal (probable componente de biota intestinal) que conduciría a un desequilibrio de respuesta inmunitaria y pérdida de homeostasis intestinal (13) (14).

Incidencia de la Colitis ulcerosa Crónica inespecífica (CUCI)

Ambas Enfermedades Inflammatorias Intestinales, tanto Cuci como Crohn tienen una incidencia global de 0.1% a 0.2%, resultan ser un tipo de inflamación crónica y persistente, la Cuci se presenta en la superficie mucosa del colon y del recto, dando como manifestaciones clínicas específicas una incurrancia de diarrea, sangrado purulento mucoso y tenesmo. Se consideran varios factores para esta enfermedad que tienen un rol de impacto importante como el medio ambiente, la genética heredada, inmunidad, inflamación, infección y bacterioma intestinal (15). A diferencia de Cuci, la EC se presenta como envolvimientos discontinuos de diferentes o varias porciones del tracto gastrointestinal que va desde la boca hasta el ano; y se puede desarrollar complicaciones incluyendo abscesos y fistulas intestinales, es importante resaltar las diferencias de cada una para mayor entendimiento (16).

Cuci afecta a un estimado de 1.5 millones de personas americanas, 2.2 millones de personas europeas y varios cientos de miles de personas alrededor

del mundo, la naturaleza de estas enfermedades ejerce impacto en las terapias, hospitalizaciones, cirugías, calidad de vida y el funcionamiento social (17). En las últimas décadas del siglo XXI se ha visto un incremento en las incidencias de estas patologías a nivel global y se caracteriza por ser muy variable demográficamente.

En México se sabe que la incidencia por edad de Cuci está en un rango de 0.90 a 2.30 por 100,000 habitantes. Y donde la prevalencia tiene un rango entre 15.65 a 71.19 por cada 100,000 habitantes (18). En un estudio hecho por Yamamoto Furusho en el 2008 se encontró una incidencia elevada que fue de 28 (1987-1996) a 71.6 (1997 a 2006) dando como resultado un aumento de 2.6 veces en la incidencia anual (19). En otros estudios realizados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en la última década se corrobora que se han presentado 76 nuevos pacientes diagnosticados por año, comparada con décadas pasadas en donde el promedio de pacientes por año era de 28 (20).

Alteraciones del bacterioma en CUCI

La comunidad bacteriana en el intestino del ser humano constituye una barrera de mucosa rica en nutrientes, que tiene un rol importante de protección contra varios microorganismos y también es muy importante en su impacto en el funcionamiento del sistema inmune (21). La respuesta inmune del bacterioma del intestino es inducida por la población de organismos comensales, estas regulan la composición del bacterioma; por lo tanto, existe una compleja interacción entre el sistema inmune del huésped y el del bacterioma, la cual, es necesaria para la homeostasis del intestino. Sin embargo, cuando la mutualidad entre el bacterioma y el huésped es irrumpida o afectada, este bacterioma intestinal puede causar o contribuir a muchas enfermedades (22).

Alteraciones en las composiciones del bacterioma intestinal, que es llamada como disbiosis, ha sido reportada en las EII en la última década. Estos son

asociados con una disminución en la biodiversidad del bacterioma y un desequilibrio en la composición de esta, comparados con controles sanos (23). Existen resultados en estudios donde hay respuestas inmunes de forma descontrolada que están dirigidos a las bacterias comensales en huéspedes genéticamente susceptibles (24). Otros estudios demostraron que pacientes con Cuci con adenocarcinomas son asociados particularmente con un incremento en la diversidad bacteriana pero únicamente con Actinobacterias y Proteobacterias; y una baja densidad de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (25).

En uno de los estudios del bacterioma que han surgido para ver las diferencias de diversidad de este entre los pacientes con Colitis Ulcerosa. En donde se correlaciona la disbiosis en el ambiente del microbioma con estas patologías, dando como resultados, una biodiversidad disminuida de *Firmicutes*, *Christensenellaceae* y *Coriobacteriaceae*, e incrementada en *Gammaproteobacterias*, *Actinomyces*, *Veillonella*, and *Escherichia coli* (26). Un ejemplo en la enfermedad de Crohn hay proporciones de la clase Clostridia alteradas, como los géneros de *Roseburia* y *Feacalibacterium* de las familias de *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceas* respectivamente, ambos se encuentran disminuidos, aunque *Ruminococcus gnavus* incrementado. Mientras que en Cuci esta disbiosis está menos descrita con un incremento en Delta-proteobacteria sulfato-reductor. Sin embargo, no se ha descrito los roles funcionales de estos organismos, ni se tiene una total claridad de a qué se debe esta disbiosis en ambos casos (27).

Aun cuando se han reportado cambios globales en el bacterioma de pacientes con EII y tras excesivas búsquedas, no hay información acerca de la existencia de microorganismos comensales y microorganismos patógenos sean asociados con algún modelo para iniciación de EII (28). Sin embargo, se conoce que las anomalías genéticamente determinadas del sistema inmune pueden desembocar en modificaciones del bacterioma y causar EII. Los cambios más conocidos en el bacterioma son: *Firmicutes*, Enterobacterias como *E. coli*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Fusobacterium nucleatum*,

actuando como comensales posiblemente causantes de EII. Una hipótesis en estudios diferente es que estos comensales actúan en conjunto con el resto del bacterioma en el intestino para causar la enfermedad, en vez de solo ser los únicos agentes infecciosos, esto únicamente se ha reportado en modelos animales. Aunque es tentativo el proponer un rol iniciativo del bacterioma en las EII, se debe enfatizar que estos estudios solo han descrito asociaciones y no muestran como tal una causa (29)(30).

Cuci, Crohn, inflamación y estrés oxidativo

Aunque la influencia genética y los factores ambientales ocupan un rol importante de iniciación para esta patología; otro elemento central en esta patogenia es la función aberrante del sistema inmune de las mucosas, dándose en defectos en el sistema inmune innato y adaptativo. Dentro del sistema adaptativo se incluyen linfocitos T, B y células dendríticas que son responsables de respuestas inmunes específicas guiadas por señales que vienen de celular presentadoras de antígeno. Todo este componente de sistema se compone por linfocitos T CD8+ citotóxicos, células CD4+ T helper (las cuales se subdividen en Th1, Th2, Th17 y T reguladoras). La Th17 que un papel importante en la EII ya que tiene un rol conocido de reclutamiento de células proinflamatorias. Por otro lado, también existe una cantidad aumentada de citoquinas proinflamatorias (TNF- α) que es producida por macrófagos activados, monocitos y linfocitos T (31).

La inflamación a su vez es un proceso que va de la mano con la producción de metabolitos reactivos como las especies reactivas de oxígeno (ERO en español y ROS en inglés Reactive Oxygen Species) que son producidas en gran cantidad por las células inmunes activadas que alcanzan la mucosa en la EII (13). Los EROs son bioproductos naturales del oxígeno, estas son moléculas altamente reactivas por la presencia de electrones impares(32), donde los radicales libres de varias moléculas oxidativas, secretadas por fagocito,

neutrófilos y más, se acumulan en una lesión inflamatoria causando deterioro de la estabilidad en la membrana celular y pueden causar muerte celular (33).

Para regular sus efectos destructivos de los EROs, hay tejidos que están equipados con un sistema de defensas antioxidantes; cuando hay un desequilibrio muy remarcado entre la producción de EROs y las defensas antioxidantes surge lo que es llamado el estrés oxidativo (32). En los últimos años se ha hipotetizado que estos metabolitos reactivos están implicados de forma directa en destrucción tisular, más cuando ya existe una disminución de defensas antioxidantes y que representen un papel etiopatogénico en la EII (13).

Existen evidencias en estudios donde se encontró un estrés oxidativo alto y defensas antioxidantes disminuidas, en pacientes que presentan EII, en biopsias de mucosas del colon; donde pareciera que los pacientes con esta patología presentan un exceso de moléculas oxidativas en comparación con sujetos del grupo control. Y dentro de esta enfermedad (Cuci), aunque las dos presentan diferencias elevadas de ROMs, en la enfermedad de Crohn es más pronunciada esta elevación (33).

Como reacción al estrés oxidativo, el organismo responde produciendo más antioxidantes, sin embargo, si este estrés oxidativo es persistente, puede llegar a agotar o cansar los recursos de antioxidantes en el cuerpo y hay un bajo nivel de estos. Los cambios de concentraciones de antioxidantes son conflictivos en los estudios realizados, el objetivo principal de esto es el hecho de un desequilibrio en la concentración de los antioxidantes que puede llegar a justificar el que varios órganos vitales en las enfermedades inflamatorias intestinales puedan tener un estrés oxidativo de diferente grado (32).

En otro estudio, se trataron a pacientes con dosis de PQQ en un estudio de placebo controlado con doble ciego y se observó una pequeña mejoría en aquellas personas que tenían dosis de pqq PQQ que aquellas que no, sin embargo, en otra investigación no se encontraron diferencias o mejoría en la actividad de la patología (no se controló como en el otro estudio), en estas

últimas se usaron otros suplementos como antioxidantes (efectos del aceite de pescado y sus antioxidantes) (34).

2. Antecedentes específicos

Pirroloquinolina quinona (PQQ)

Es un grupo prostético cofactor de las quinoproteínas que cataliza reacciones en el periplasma de bacterias. La mayoría de estas realiza una oxidación de alcoholes o azúcares aldosa (ADH o GDH) (4). Muchas membranas unidas a deshidrogenasas en el espacio periplásmico o en la superficie de la membrana citoplasmática de bacterias acéticas y otras bacterias de Gram negativas han sido clasificadas como PQQ dependientes(35).

La pirroloquinolina quinona (PQQ) es un cofactor redox de varias enzimas involucradas en la oxidación de un amplio rango de sustratos (azúcares, alcoholes, aminas y aldehídos). El grupo de las PQQ quinoproteínas incluye varias enzimas con actividad deshidrogenasa, las cuales oxidan gran cantidad de sustratos mencionados anteriormente; algunos de sus grupos se unen a estas de forma covalente. Las quinoproteínas más conocidas que utilizan cofactores O-quinona son: TPQ (topaquinona), TTQ (triptofano-tirosil quinona) Y LTQ (lisoil-lisina quinona) (36).

Una característica clave de la estructura de PQQ es la ortoquinona situada en los carbonos C4 y C5 del anillo quinona, los cuales son reducidos a quinol durante la catálisis. En su estructura tiene tres grupos de ácido carboxílico (C2, C7 y C9) y dos grupos cetónicos (C4 y C5). Los dos grupos cetónicos están involucrados en el poder redox de la misma molécula, en especial el C5 en su forma oxidada es muy reactivo hacia nucleófilos como alcoholes, amoníaco, aminas, cianuro y aminoácidos(4).

La PQQ está distribuida ubicuamente en la naturaleza y en muchos lados en la dieta cotidiana, desde soja fermentada, té, pimientos verdes, perejil, kiwi y leche materna, sin embargo, está concentrada de diferente forma en cada una de estas, ya que es reactivo y propenso a formar derivados o condensar productos. El humano consume aproximadamente de 0.1 a 1 mg de PQQ y sus derivados por día. Aun con esto, la ruta biosintética de PQQ no ha sido resuelta completamente; aunque se sabe la necesidad de varios genes para su biosíntesis (34).

El análisis estructural de PQQ con otros antioxidantes, como los derivados de indol y pirrol, demuestra que PQQ tiene una densidad de electrones reactivos más altos comparativamente con otros; convirtiéndola en una molécula antioxidante fuerte. Y esto demuestra la idea de que una de sus funciones es que interacciona directamente neutralizando a los EROs. Se ha demostrado en un estudio de como PQQ puede neutralizar a los EROs por medio de su mecanismo de transferencia de electrones y los aductos formados, son no oxidantes por naturaleza (37).

Dentro de las familias de cofactores quino-proteicos, el PQQ pareciera tener un potencial redox alto en pH 7, que es un aproximado de 90 mV, en comparación con las TPQ (topaquinona) con un rango de -150 mV, la TTQ (triptófano-tirosil quinona) con -150 mV igualmente, la LTQ (tisoil-lisina quinona) con -182 mV y en comparación con la familia de las flavinas que tienen un rango de -45 mV (38).

Síntesis de PQQ

La PQQ es proveniente de la unión de glutamato y tirosina, ambos aminoácidos incorporados intactos, la cadena de lado del tirosil tiene 6 átomos de carbono del anillo de ortoquinona del PQQ; esto llevo a la teoría de rutas de conversión de la tirosina y el glutamato a PQQ; sin embargo, no hay una bioquímica evidente para soportar estas teorías. Un pequeño polipéptido de

entre 23 a 29 aminoácidos demostró estar involucrada en la producción de PQQ en un número basto de bacterias. Estos polipéptidos tienen una gran semejanza entre ellos y contienen un motivo (motif, secuencia consenso de nucleótidos) con residuos de glutamato y tirosina separados por otros 3 residuos (4).

Los genes implicados en la biosíntesis de PQQ se han caracterizado en varios números de bacterias, incluyendo *K. pneumoniae*, *A. calcoaceticus*, *M. extorquens*, *G. oxydans*, etc. En *K. pneumoniae*, los genes de síntesis están agrupados en el operón *pqqABCDEF*, que están bajo el control del promotor *pqqA*, mientras que en bacterias como en *Pseudomonas aeruginosa*, el operón *pqqABCDE* se separa del operón *pqqF*; Actualmente, se conoce de forma general las funciones de los genes involucrados en la síntesis del cofactor PQQ, donde se sabe que estos están estructurados en forma de operón bajo el control del promotor de *pqqA*. Se sabe que *pqqA* actúa como el péptido precursor de la molécula, *pqqB* como una oxigenasa putativa, *pqqC* como una oxidasa que no requiere cofactor, *pqqD* como una chaperona de *pqqC*; *pqqE*, el cual pertenece a la familia de las proteínas SAM capaces de catalizar la unión C-C (4,38).

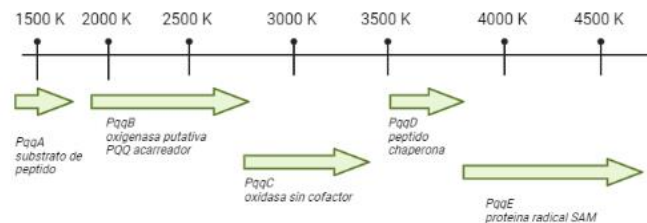


Figura 1 Estructura genética y funciones de los genes del operón *pqqABCDE* de *Glucanobacter oxydans*, creado con biorender (38).

Aunque actualmente se conoce la forma aproximada de las funciones de los genes involucrados en la biosíntesis de PQQ, aún no se tiene la vía completamente elucidada, sin embargo, se cree que podría llevarse de la siguiente manera, explicada en el artículo de Puehringer, 2008(38):

1.- Se toman del esqueleto de PqqA los aminoácidos Tyr y Glu, para posteriormente ser unidos. La formación de enlaces C-C (carbono – carbono) en los átomos de C9 y C9a.



Figura 2. Primer paso de la síntesis de PQQ, creado con biorender (38).

2.- Después de esta reacción los aminoácidos Glu y Tyr que están ahora unidos covalentemente, se encuentran aún unidos a la cadena principal del péptido PqqA-peptido. Se cree que PqqF podría estar actuando como proteasa responsable de la escisión de los cuatro enlaces peptídicos en R1 y R2 de Glu; y R2 y R3 de Tyr.

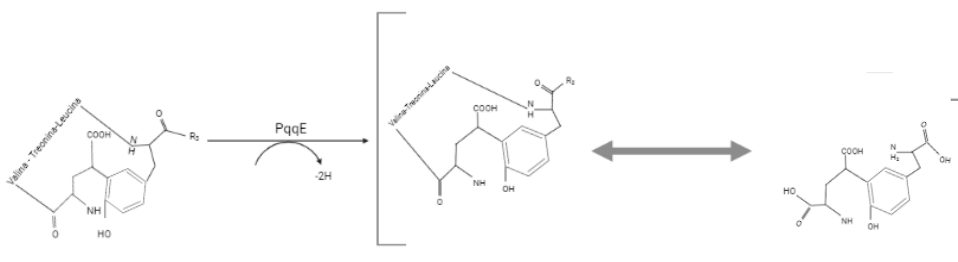


Figura 3. Segundo paso en la síntesis de PQQ, creado con biorender (38).

3.- Finalmente, el grupo amino N6 de Glu y el OH (C5a) de Tyr están listos para formar espontáneamente una reacción base Schiff.

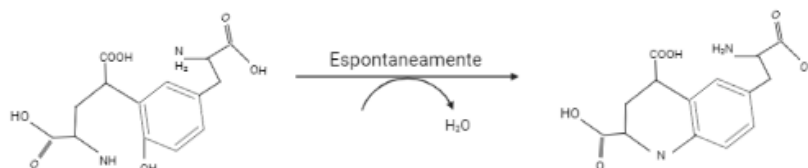


Figura 4. Tercer paso en la síntesis de PQQ, creado con biorender (38).

4.- En la próxima etapa de reacción es posible que se añadan dos grupos OH a los átomos de C4 y C5 en el anillo de tirosina y para esto se requiere una deshidrogenasa. Sin embargo, no hay ninguna proteína con similitud de secuencia con una dioxigenasa en el operón PQQ. Los candidatos serían PpqqB y PpqqD, aun cuando no presentan similitud con ninguna otra dioxigenasa bacteriana.

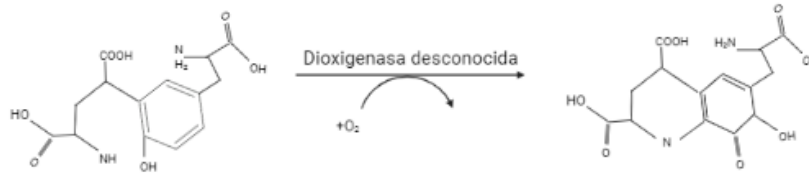


Figura 5. Paso cuatro en la síntesis de PQQ, creado con biorender (38).

5.- El paso final en la reacción se ha aproximado que es catalizado por PqqC. Esta reacción de múltiples etapas incluye un cierre de anillo en N1 y la eliminación de ocho electrones y protones para poder formar PQQ.

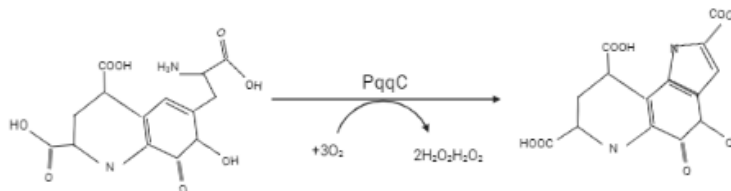


Figura 6. Paso 5 en la síntesis de PQQ, creado con biorender (38).

En la actualidad no existen datos o estudios que hablen de la caracterización del bacterioma productor de la PQQ en pacientes con Cuci y esto llama la atención ya que no se sabe aún si puede jugar un rol importante en el desarrollo o mejoramiento de las enfermedades inflamatorias intestinales. A continuación, debido a que no existen datos o estudios de la caracterización del bacterioma productor de PQQ, se estará hablando de las bacterias que podrían ser

potencialmente productoras en pacientes sanos y pacientes con Cuci y también de estudios donde se ha visto evidencia que a través de un suplemento con PQQ se logra disminuir el desarrollo de las EII y más en específico con Cuci.

Bacterias potencialmente productoras de PQQ

En la actualidad hay estudios acerca de asociaciones entre microbiota intestinal y enfermedades que dependen mucho de la cultivación de bacterias, Estas con la tecnología de metagenómica se facilita el paso de cultivación; ya que muchas bacterias suelen ser difíciles de cultivar; hoy en día, aunque el 23% de las especies identificadas en el intestino humano siguen siendo incultivables. Sin embargo, existe una técnica que ha permitido cierto crecimiento de estas bacterias no caracterizadas. Esto quiere decir que hay ciertos factores de crecimiento para las bacterias que normalmente en medios de cultivo *in vitro* no tienen para estas, pero que son aportados. Un ejemplo de fuente de crecimiento son otros microorganismos; en el intestino del ser humano y el ejemplo de factor de crecimiento son las quinonas producidas por ciertas bacterias (39).

Muchas de las bacterias que son productoras de PQQ (una quinona) lo excretan al medio en ciertas condiciones durante el crecimiento. Esto indica la importancia de las comunidades bacterianas que sintetizan PQQ, ya que pueden estimular el crecimiento bacteriano. Algunos organismos que no pueden sintetizar PQQ crean apoenzima, las cuales se puede transformar en una holoenzima si PQQ se encuentra presente en el medio de crecimiento; estas bacterias productoras de PQQ pueden ser capaces de usar otros substratos como medio de energía y posiblemente como fuente de carbón (4). La cantidad de PQQ que excretan las bacterias puede variar entre 1ug/ml a 1 mg/ml y depende de la composición del medio de crecimiento (36).

Por esta misma razón la PQQ ha provocado un interés particular por su presencia en alimentos, sus propiedades antioxidantes y su rol como factor

promotor de crecimiento. Es necesario el recalcar que las bacterias necesitan varios genes para su biosíntesis, sin embargo, varía el número de genes según la bacteria; *Klebsiella* necesita 6 genes, mientras que *Methylobacterium extorquens* 7 y *Acinetobacter calcoaceticus* requieren solamente 4 genes (38).

Pirroloquinolina Quinona en Colitis ulcerosa crónica inespecífica

En un estudio por Friedman (2018) (40); se comprobó que la PQQ puede ayudar a atenuar la respuesta de una disbiosis microbiana al aumentar su dosis en diferentes especies de ratones. Sin embargo, no hay evidencias significativas del bacterioma caracterizado en enfermedades inflamatorias intestinales tal como Cuci.

El estudio de PQQ en Cuci puede ayudar a descifrar las causas de la disbiosis en esta; también se tratará de vislumbrar si la PQQ puede ayudar o deplorar la salud del ser humano, ya que esta puede estar vinculada a que bacterias patógenas se desarrollen en la enfermedad y esto causa también agravamiento de la enfermedad.

Posteriormente se podría intentar desarrollar alternativas terapéuticas para estos padecimientos; también es importante ya que se sabe que los pacientes con Cuci presentan un nivel alto de ROS/EROS que son los causantes de la agravación y presentación de síntomas graves a causa de la destrucción tisular que presentan en gran cantidad; sabiendo que PQQ es un neutralizante natural de los EROS y por lo mismo se tiene en cuenta de que podrían ayudar en la reducción de síntomas y en el alivio del paciente(41,42).

Se han comprobado en estudios hechos por Fenn y Col. (2017) (43) que las quinonas son factores requeridos de promoción de crecimiento para diversas bacterias y esto sería requerido en el microbioma intestinal del ser humano; esto indicando que la pérdida de biosíntesis de las quinonas puede pasar independientemente en muchos linajes del bacterioma humano. Los roles

importantes de la PQQ en animales y humanos se saben que están conectados en: la reparación y heridas neurológicas, en la piel y en el mejoramiento de la memoria (43,44).

Sabiendo que en enfermedades inflamatorias del intestino hay una variación o disbiosis en el intestino, esto quiere decir que hay un desequilibrio en el bacterioma intestinal y por ende es susceptible enfermedades inflamatorias crónicas; esto incluye por sus múltiples factores de riesgo en las personas vulnerables a tener IBD.

Capítulo 2

3. Planteamiento del problema

La etiología y patogénesis de la Enfermedad de Crohn y de la Colitis ulcerosa crónica inespecífica sigue siendo no muy clara. Hoy en día se asume que estas ocurren en individuos genéticamente susceptibles con una respuesta inmune aberrante y que es detonado también por factores en el medio ambiente. Dado al actual aumento de la incidencia (0.2%), prevalencia, mortalidad y variación epidemiológica geográficamente, se debe implementar un pronóstico, y un tratamiento alternativo que ayude a disminuir las incidencias y la progresión de estas. Sin embargo, existe una falta de información en México de estas enfermedades y sus probables asociaciones e interacciones en el microbiota intestinal, por lo tanto, es necesario implementar trabajos en el campo básico para contribuir a la información en las asociaciones y poder detener la progresión de ambas enfermedades inflamatorias crónicas.

Existen estudios en el bacterioma, todos con muestras fecales, que han surgido para ver las diferencias de diversidad de este entre los pacientes con Colitis ulcerosa. En donde se correlaciona la disbiosis en el ambiente del microbioma con el desenlace de estas patologías, dando como resultados, una biodiversidad disminuida de *Firmicutes*, *Christensenellaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*, e incrementada en Gammaproteobacterias, *Actinomyces*, *Veillonella*, y *Escherichia coli*. Un ejemplo en Cuci, se denota que esta disbiosis está menos descrita. Aunado con eso, no se ha descrito las funciones de estos organismos ni se tiene una total claridad de a qué se debe esta disbiosis. Otro de los principales temas que ha tenido renombre en los últimos años por su papel en el agravamiento de estas enfermedades es el bacterioma. L y su producción de enzimas, en este caso la pirroloquinolina quinona, la cual es conocida por su factor actividad antioxidante y se tiene pensado que podría ayudar a disminuir la inflamación conocida característica en la enfermedad de Cuci, donde se espera obtener una pero también mantener o consolidar la disbiosis ligeramente

remarcada en los pacientes, sin embargo, aún no hay estudios que hablen de la identificación del bacterioma productor de PQQ que se tiene en estos pacientes.

Con lo recalado anteriormente, es de importancia conocer la relación entre la disbiosis, y la inflamación, de la patología, su desarrollo y el papel que juega el bacterioma productor de PQQ. Ya que es primordial para poder crear un nuevo campo de estudio en beneficio de estas patologías y de los pacientes, poder desarrollar posteriormente un pronóstico rápido, tratamiento temprano y tratar de evitar la progresión agresiva de estas. Por lo tanto, se llega a una pregunta inicial y de la cual se debe partir para abrir este campo de investigación nuevo.

¿Cuál es el bacterioma productor de PQQ existente entre el grupo control y pacientes con Cuci?

4. Hipótesis

Existen diferencia de géneros bacterianos productores de PQQ entre los pacientes con Colitis ulcerosa crónica inespecífica y en un grupo control.

5. Justificación

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal tiene una incidencia global de 0.1% a 0.2%. En México se realizó un estudio donde representó la escala de incidencias, demostrando que de 1987 -1996 había incidencia anual de 28.8 pacientes anuales por cada cien mil habitantes, comparada con 1997-2006 donde se contaron a 71.6 casos nuevos, comprobando un aumento en promedio de 2.6 de casos en la incidencia anual. En un último estudio realizado en el 2018 por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán describen que se presentaron 76 nuevos casos diagnosticados.

En ambas enfermedades, se ha observado que la etiología es multifactorial e inespecíficas y que se pueden desarrollar complicaciones incluyendo abscesos y fistulas intestinales. Es indispensable determinar el factor principal del inicio de estas, uno de los cuales es el microbiota intestinal y su equilibrio que este tiene en el tracto gastrointestinal del huésped, las interacciones de la microbiota tiene muchos beneficios para la salud, y que al presentarse alguna disbiosis en esta se sabe que puede llegar a desarrollarse diferentes tipos de enfermedades, desde inflamatorias hasta inmunológicas, sin embargo, no se sabe exactamente las interacciones a nivel microbiota en esta disbiosis de diversidad que podrían estar jugando un rol importante en estas patologías.

En varios estudios la cualidad antioxidante de pirroloquinolina quinona (PQQ) en el ambiente microbiano del intestino es importante y ha mostrado protección contra el daño de especies de oxígeno reactivo (ROS) que existen en las enfermedades de colitis ulcerosa crónica inespecífica.

Sin embargo, no hay estudios que respalden tanto la caracterización del bacterioma productor de PQQ, como las diferencias de estos en la enfermedad de Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica y en individuos sanos. El encontrar diferencias entre el bacterioma a causa de la producción de PQQ, podrá ayudar a abrir un campo de investigación y posteriormente poder desarrollar alternativas

terapéuticas para detener el avance e incluso su iniciación de la enfermedad de la colitis ulcerosa crónica.

6. Objetivos

1. General:

Identificar y caracterizar el bacterioma potencialmente productor de PQQ entre el grupo control y pacientes con CUCI.

2. Específicos:

Determinar los géneros bacterianos potencialmente productores de PQQ en pacientes con CUCI e individuos sanos.

Analizar el bacterioma con relación a la enfermedad, los parámetros bioquímicos y con la dieta potencialmente aportadora de moléculas antioxidantes.

7. Material y métodos

7.1. Diseño de estudio:

Se realizó el siguiente estudio: Observacional, analítico, transversal, prospectivo con número de registro en BUAP facultad de medicina 885 y con un número de registro en el Hospital Universitario de Puebla (HUP) de CEIHUP – 2021/001 (Anexo 1 y 2).

7.2. Ubicación espacio - temporal

7.3. Muestra:

Sujetos con historial clínico diagnosticado con Colitis ulcerosa crónica inespecífica del Hospital Universitario de Puebla. Se trabajó en conjunto con el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para el manejo de muestras fecales.

Definición de la Población:

Se tomó en cuenta a los pacientes que asisten a consulta médica al Hospital Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que tuvieran diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal de CUCI. Y con un grupo control de individuos aparentemente sanos en la entrevista de historial clínico.

Tamaño de muestra:

A conveniencia

7.4. Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión para pacientes:

Pacientes con diagnóstico de CUCI
Mayores de edad (18 años en adelante)
De ambos sexos (hombre y mujer).

Criterios de inclusión para grupo control:

- Individuos sanos para grupo control
- Mayores de edad (18 años en adelante)
- De ambos sexos (hombre y mujer)

Criterios de exclusión para pacientes:

- Tratamiento con antibióticos.
- Que tengan tratamiento con inmunomoduladores

Criterios de exclusión para grupo control:

- Tratamiento con antibióticos.

Criterios de eliminación:

- Aquellos sujetos que no quieran seguir participando en el estudio.

Diseño y tipo de muestreo:

- Se realizará un muestreo no probabilístico.

7.5. Definición de las variables y escala de medición:

Todos los conceptos de las variables con sus definiciones operacionales e instrumentos de medición se encuentran explicados en un anexo aparte (anexo 3).

Variables demográficas:

Edad: tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento.

Sexo: condición orgánica que distingue al macho de la hembra en organismos heterogaméticos.

Variables Metabólicas:

Proteína C Reactiva: proteína plasmática circulante, que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación.

Velocidad de sedimentación: mide la distancia que recorren los glóbulos rojos en una hora al descender en un tubo de ensayo.

Klebsiella: Genero de bacterias inmóviles, gram negativas, anaerobias facultativas.

Pseudomonas: organismos ubicuos, gram negativa, del grupo proteobacterias.

Serratia: género gram negativo pertenece a Enterobacteriaceae.

Clostridium: género de bacterias anaerobias. Bacilos gram positivos, parásitos y saprófitos.

Variables Clínicas:

Colitis ulcerosa crónica inespecífica: inflamación continua de la mucosa del colon.

Grupo control: personas aparentemente sanas.

7.6. Técnicas y procedimientos:

Registro de protocolo en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:

Se contó con el registro de protocolo de BUAP número 885 la revisión por parte de un comité interno de la Facultad de Medicina de la BUAP para corroborar la metodología, antecedentes, justificación y objetivos, se aceptan cambios pertinentes en la metodología; y finalmente se realiza el registro del protocolo en la BUAP (Anexo1).

Registro de protocolo ante comité del hospital universitario de puebla (HUP):

Se tuvo el registro de protocolo en el HUP con número 2021/001, se consultó con el comité de bioética del HUP el protocolo del estudio; donde se aceptaron cambios pertinentes a las características de inclusión y exclusión de la población del estudio, para que el estudio quede registrado en el HUP (Anexo 2).

Identificación de la población:

La población de pacientes se identificó por medio de un diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal ya sea que derivó a Cuci y se tomó en un expediente individual descrito en consulta cuando atendieron al Hospital Universitario de Puebla.

La población del grupo control se realizó por invitación, vía mensaje o teléfono, a participar en el estudio a estudiantes o conocidos y también se les realizó una entrevista para creación del historial clínico.

A cada uno de estos participantes que aceptaron, se les programó a una consulta médica en el HUP para realizar la revisión del historial médico y recolección de muestras fecales.

Búsqueda bioinformática de posibles bacterias sintetizadoras de PQQ

Se realizó una búsqueda en NCBI (National Center for Biotechnology information) de estudios metagenómicos con pacientes que tuvieran diagnóstico de CUCI y también muestras de individuos aparentemente sanos. Para descargar los documentos en formato SRA y poder convertirlos a FASTA se trabajó en un programa de simulación de máquina virtual llamado VM Ware Workstation (figura 8), dónde se instaló vía terminal el SRA toolkit que permite descargar archivos SRA de NCBI y convertirlos a FASTA.

En las secuencias obtenidas se realizó una búsqueda con el programa Blast del marcador molecular *pqqCDE*.

Las secuencias que tuvieron similitud con el marcador molecular *pqqCDE* se analizaron en un programa llamado MEGAX, en donde se alinearon todas las secuencias obtenidas junto con la secuencia blanco de PQQ para saber si existen géneros bacterianos con el gen blanco conservado y posteriormente se realizó un análisis filogenético, para determinar qué géneros son potencialmente productores de PQQ.

Toma de muestra fecal

Por teléfono a cada paciente e individuo aparentemente sano, se le explicó de manera breve y concisa la toma de muestras fecales, donde con cuidado usando una hoja de plástico se puso debajo del asiento de la taza del baño y se procedió a defecar, una vez con la muestra en la hoja de plástico se tomó una pequeña porción con un palo de madera estéril o una lengüeta y se puso en un frasco estéril.

Información y firma del consentimiento:

A cada uno de los individuos sanos voluntarios que participó y pacientes diagnosticados con CUCI que asistieron al Hospital Universitario de la BUAP, se les explicó de manera concisa y clara el proyecto, y cuál es su participación en él.

Aquellos sujetos que aceptaron participar debieron leer y firmar cuidadosamente la Carta de Consentimiento Informado para su participación en el proyecto (Anexo 4).

Caracterización Clínica:

Una vez firmada la carta de consentimiento se inició con la elaboración del expediente o historial clínico (edad, sexo, diagnóstico, tiempo de evolución de la enfermedad, medicamentos a la fecha y análisis clínicos).

Análisis clínicos:

Después de la elaboración del expediente se le indicó al sujeto de estudio el asistir a una toma de análisis clínicos en la siguiente consulta (3 semanas después) para obtener los siguientes estudios:

- Proteína C Reactiva
- Velocidad de sedimentación

Manejo de muestra y extracción ADN bacterial

Una vez teniendo la muestra de heces, se extrajo el DNA bacterial de cada muestra con el kit "QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit" de marca Qiagen (cat no. 51604) para muestras fecales a temperatura ambiente, pero manteniendo las muestras y los reactivos en una hielera para no haber degradación del material genético, este kit contó con los pasos a seguir para su centrifugación, adición de

buffer y lavado de muestra para finalizar con elución con agua libre de RNAsas y tener una concentración del ADN bacteriano en un tubo eppendorff (la técnica se encuentra detallada más a fondo en el apartado de técnicas y procedimientos).

Concentración de DNA

Para asegurar que tuviéramos DNA y para aumentar la concentración de DNA puro sin contaminación se llevó a cabo una precipitación con isopropanol y acetato de Na; la técnica se encuentra detallada mejor en el apartado de técnicas y procedimientos.

Amplificación y detección de biomarcador *pqqCDE*

Se amplificó el marcador molecular *pqqCDE* mediante un par de oligonucleótidos específicos, las muestras de DNA estuvieron en concentraciones de .25 ng/mg y los oligonucleótidos en 50 pmol cada uno. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 3 min, 95°C por 1 min, 53.8°C por 45 segundos, 72°C por 2.5 min y 72°C por 5 min, todo esto se repitió por 40 ciclos y finalizó dejando los amplicones a 4°C para mantener las muestras estables. Esto se llevó a cabo en un termociclador marca Eppendorf (Anexo 7).

Los amplificados obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa a 0.7% en buffer Tris-borato-EDTA; los parámetros del corrimiento de electroforesis fueron: 110 volts de 45 min a 1 hora, con tinción de bromuro de etidio por 30 segundos; un contraste con agua por 5 a 10 min y los resultados se revelaron en un transiluminador de UV marca Labnet.

Análisis Estadístico:

Se utilizó la prueba de Shapiro Wilks para comprobar la normalidad de las variables. Se realizó análisis descriptivo de las variables sociodemográficas como edad y sexo, presentándose en media y desviación estándar (DE), así como hábitos, frecuencia de alimentos ricos en compuestos fenólicos, gravedad de la enfermedad, marcadores bioquímicos, detectando que todas no se tenían normalidad excepto la variable VSG por lo que se utilizó t de student con ($p < 0.05$) para la comparación de los datos.

Métodos de recolección de datos:

Historia clínica (expediente clínico):

Se entrevistó al sujeto para rectificar el historial clínico o en dado caso editarlo/crearlo (edad, sexo, diagnóstico, tiempo de evolución de la enfermedad, medicamentos utilizados a la fecha); a continuación, se les solicitó una toma de análisis clínicos (proteína C reactiva y velocidad de sedimentación) para su posterior uso en la estadística de la investigación.

Consentimiento informado:

Se hizo entrega a cada sujeto que participó en el estudio, de una carta de consentimiento donde se les explicó el propósito del estudio y como ellos participaron en este, manteniendo su anonimato en la investigación (Anexo 3).

Obtención de heces fecales:

El médico en turno explicó el método en el cual se deberá tomar la muestra de heces fecales aplicando lo dicho en la guía de “colección de heces para el análisis de bacterias”, usando un frasco de colección de orina estéril. Se empleó una hoja de papel de cera o de plástico estéril debajo de la tapa del baño antes de usarlo. Y posteriormente se usó una cuchara o palo de madera estéril (limpio) para pasar la muestra de la tapa de baño al frasco con cuidado.

Parte *in silico*

Análisis de bases de datos de secuencias de metagenomas

Se tomaron de la base de datos de NCBI documentos que contenían datos metagenómicos para poder hacer un análisis de las secuencias *in silico*; estas bases de datos que se encontraban en documentos SRA se encuentran explicados detalladamente en la tabla 5 en resultados.

Posteriormente por programación en software con lenguaje de python se instaló el SRAToolkit, herramienta que permite descargar los documentos de NCBI en

formato SRA y poder concatenarlos en un solo documento tipo FASTA, en las figuras 7 y 8, se muestra una captura de pantalla que muestra comandos con lenguaje python que muestra cómo se descargaron los documentos SRA y como se concatenaron en diferentes carpetas para su posterior alineación de secuencias.

Después, tomando el documento en FASTA, se pasó a un software de alineamientos parciales (BLAST) que permitió hacer el alineamiento de todas las secuencias junto con la secuencia blanco, en este caso el marcador molecular *pqqCDE* de nuestro gen de PQQ. Posteriormente se realizó un alineamiento total por MAFFT y MUSCLE y análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Se analizó las secuencias y las alineó dándonos resultados de donde esta secuencia blanco se mantenía conservada en ciertas partes del gen; para su mejor rendimiento del análisis se eliminaron varios gaps (espacios vacíos de que no hubo alineación en esos nucleótidos) y se quitaron secuencias que parecían no tener nada conservado; posteriormente se crearon los árboles filogenéticos.

```
/usr/bin/xauth: file /home/sandra/.Xauthority does not exist
sandra@ubuntu:~$
sandra@ubuntu:~$
sandra@ubuntu:~$
sandra@ubuntu:~$
sandra@ubuntu:~$
sandra@ubuntu:~$ cd /db/
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$ ls -ltrh
total 55G
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 120M Mar 20 00:22 SRR006538.3
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 893M Mar 20 01:33 ERR504988.1
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 27M Mar 21 08:28 ERR210758.1
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 54M Mar 21 08:41 ERR674170.1
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 3.9G Mar 21 18:50 ERR504988.1.fastq
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 2.1G Mar 21 18:54 ERR504988.1.fasta
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 2.0G Mar 21 18:57 prueba.txt
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 2.0G Mar 21 18:59 prueba.fastq
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 1.9K Mar 21 21:24 'comandos de python sratoolkit'
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 2.5G Mar 21 21:40 SRR9330774_sra1
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 2.5G Mar 21 21:40 SRR9330774_
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 8.5G Mar 21 21:59 prueba2.txt
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 8.5G Mar 21 21:59 prueba2.fastq
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 6.5G Mar 21 22:10 prueba3.txt
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 6.5G Mar 21 22:12 prueba3.fastq
-rwxrwxrwx 1 sandra sandra 8.7G Mar 29 17:53 sumatoria.fasta
-rw-rw-r-- 1 sandra sandra 55M Apr 2 17:43 SRR006538.3.fasta
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
sandra@ubuntu:/db$
```

Figura 7.- Ejemplo de descargas de secuencias. Programa virtual machine terminal. Programa en una máquina virtual con lenguaje de python, donde se utilizó el software de SRA toolkit para descargar los archivos SRA de NCBI y convertirlos a en fasta. Se

muestran los comandos usados para descargar las secuencias SRA de la base de datos de PubMed.

```
25 cd /db/
26 cd /db/
27 ls -ltrh
28 cd /media/sandra/ADATA\ HV6295/Documents/Tesis\ BUAP\ MCMI\ analisis\ in\ silico\ PQQ\ bases\ datos/
29 ls -ltrh
30 cp -pv * /db
31 sudo cp -pv * /db
32 cd
33 cd /db/
34 ls -ltrh
35 du -shc *
36 ls -ltrh *.fasta
37 fastq-dump --fasta default ERR210758.1
38 vdb-config --interactive
39 fastq-dump --fasta default ERR210758.1
40 sudo fastq-dump --fasta default ERR210758.1
41 cd --
42 sudo su -
43 fastq-dump --fasta default ERR210758.1
44 ls -ltrh
45 rm -frv ERR210758.1.fasta
46 cd /db/
47 ls -ltrh
48 fastq-dump --fasta default SRR006538.3
49 ip a s
50 ip a as
51 ip a s
52 sudo su -
53 cd /db/
54 ls -ltrh
55 cd
56 history
sandra@ubuntu:~$
```

Figura 8.- Ejemplo de conversión de las secuencias a fasta con SRAtoolkit: Se muestra cómo se usan los comandos para convertir el documento SRA a fasta activando el paquete de SRAtoolkit y poder usar los fasta en programa de MEGA11 y posteriormente hacer un análisis filogénico.

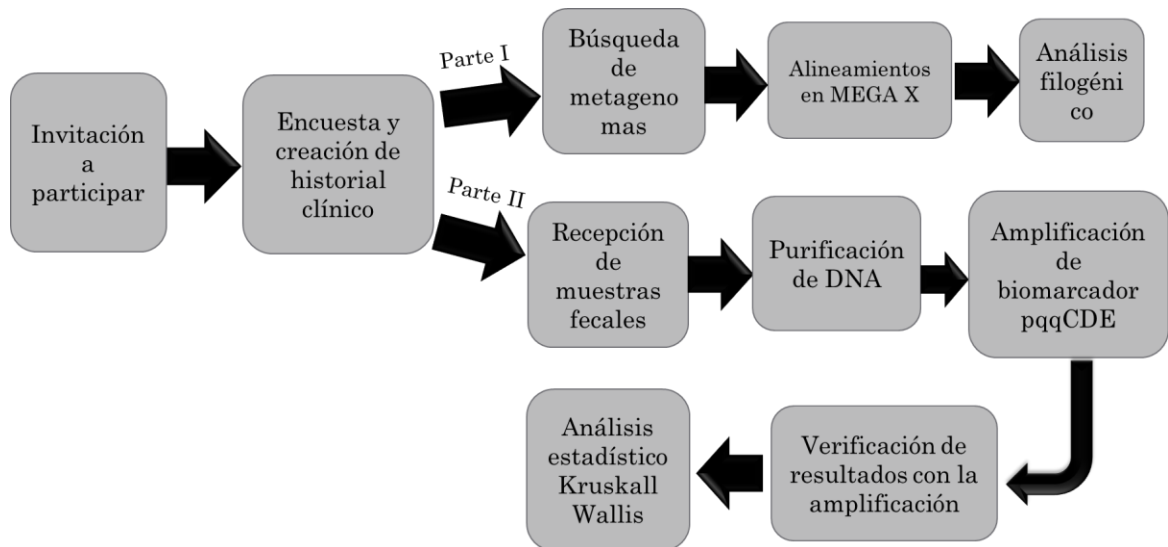


Figura 9. Diagrama de la metodología utilizada. En este diagrama se presentan los pasos a seguir de la metodología usada en la tesis; el cual se divide en dos partes: parte 1 fue la parte *in silico* donde se buscaron estudios de metagenomas en NCBI y con estos se realizó un análisis filogenético. Mientras que la parte 2 fue la parte experimental que incluyó la recepción de muestras fecales y el intento de la amplificación del marcador molecular de *pqqCDE* en estas muestras fecales por medio de PCR punto final.

7.7. Análisis estadístico:

Para los resultados estadísticos de la encuesta se utilizó la prueba de Shapiro Wilks para comprobar la normalidad de las variables. Se realizó análisis descriptivo de las variables sociodemográficas como edad y sexo, presentándose en media y desviación estándar (DE), así como hábitos, frecuencia de alimentos ricos en compuestos fenólicos, gravedad de la enfermedad, marcadores bioquímicos, detectando que todas no se tenían normalidad excepto la variable VSG por lo que se utilizó t de student con una ($p < 0.05$) para la comparación de los datos.

8. Resultados:

En el presente estudio se evaluaron a 22 pacientes del Hospital Universitario del Servicio de coloproctología, 11 con diagnóstico de Colitis ulcerosa crónica inespecífica y 10 individuos sanos, esto con el propósito de determinar el bacterioma productor del cofactor PQQ tanto en los individuos sanos como en los pacientes con Cuci, además de analizar el bacterioma con relación a la enfermedad, los parámetros bioquímicos y con la dieta potencialmente aportadora de moléculas antioxidantes que podrían estar cumpliendo alguna función intrínseca con la enfermedad y el bacterioma.

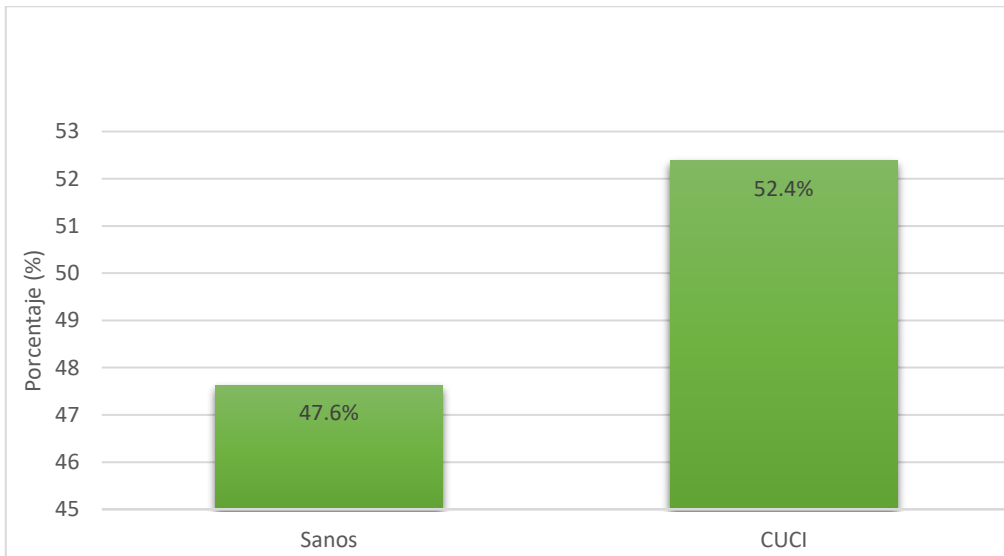
Tabla 1. Femeninos y masculinos en el estudio con diagnóstico de Cuci y sujetos sanos.

		<i>Sexo</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>sexo</i>	<i>mujer</i>	8	3	11
	<i>hombre</i>	2	8	10
<i>Total</i>		<i>10</i>	<i>11</i>	<i>21</i>

Tabla 2. Frecuencia de las edades.

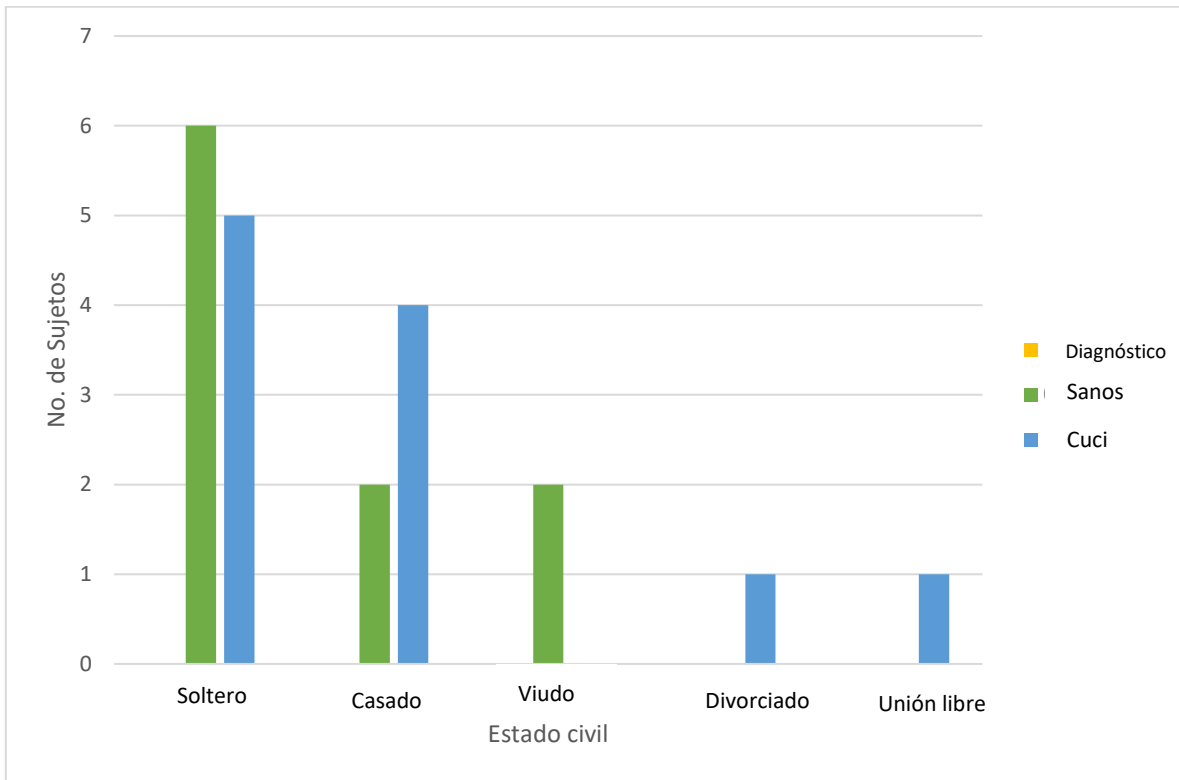
		<i>Edad (años)</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Edad (años)</i>	<i>18</i>	<i>2</i>	<i>0</i>	<i>2</i>
	<i>26</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>27</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>30</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>31</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
	<i>39</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>2</i>
	<i>45</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>46</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	<i>47</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
	<i>49</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>59</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	<i>60</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
	<i>61</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	<i>62</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	<i>65</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>78</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	
<i>80</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	
<i>Total</i>		<i>10</i>	<i>11</i>	<i>21</i>

Con una media de 45.62, una desviación estándar de 18.068, el mínimo en edades fue de 18 años y el máximo fue de 80. Esto tomando en cuenta que en el estudio solo se aceptaban participantes de controles mayor o igual a 18 años.



Gráfica 1. Diagnóstico de sanos y Cuci (n=21) de los sujetos en el estudio

Para el diagnóstico de pacientes con Cuci, aparte de que se contaron en la encuesta las respuestas, también se confirmó con el historial clínico del HUP de cada paciente; como se puede ver en la tabla, la pequeña minoría que se obtuvo fue de pacientes con Cuci (n=11); mientras que en el caso de los sanos se realizaron preguntas sobre antecedentes médicos para poder saber si eran aptos a cumplir los requisitos de individuos sanos.



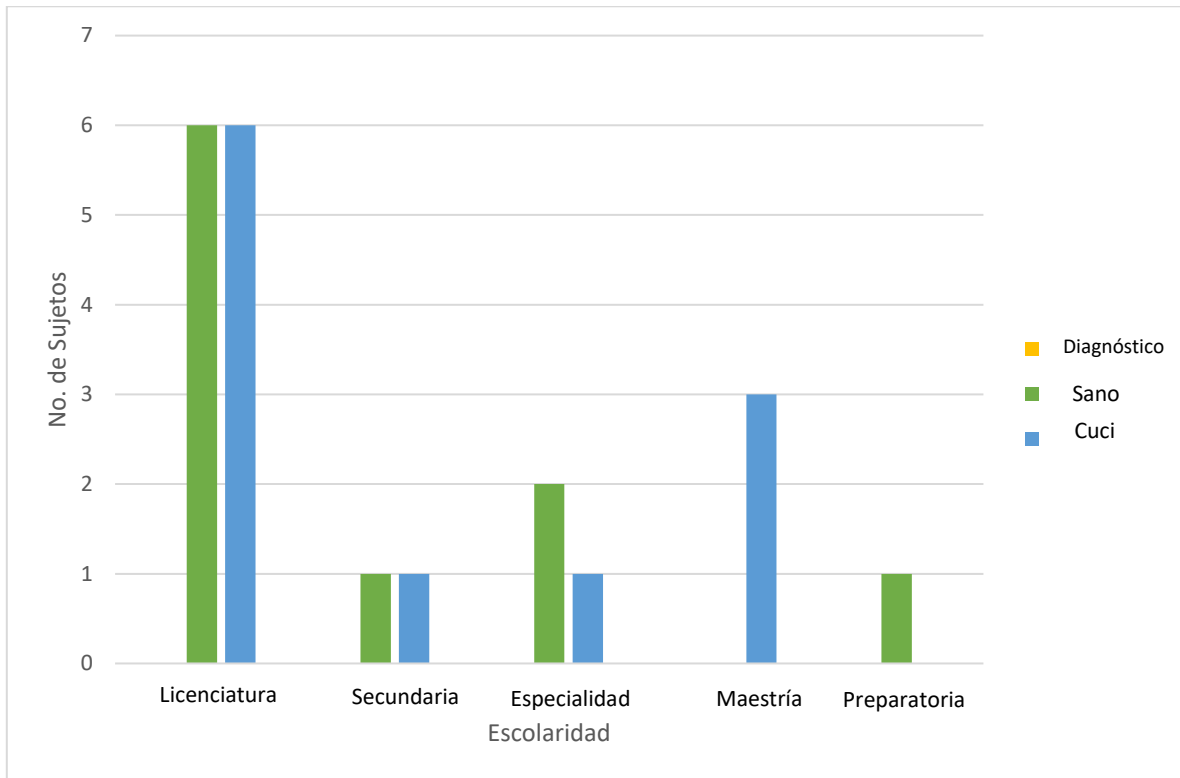
Gráfica 2. Estado civil de todos los sujetos en el estudio

La mayoría de los sujetos en el estudio fueron solteros (n=11) y casados (n=6) resaltando el hecho de que algunos son estudiantes de maestría y licenciatura (gráfica 2).

Tabla 3. Ocupación de los sujetos en estudio.

Ocupación				
		Sano	Cuci	Total
Ocupación	Ama de casa	1	2	3
	Trabajador sector privado	1	0	1
	Profesionista	1	0	1
	Estudiante	2	0	2
	Comerciante	3	0	3
	Auxiliar administrativo	1	0	1
	Ingeniero	1	0	1
	Jubilado	0	3	3
	Docente	0	4	4
	Médico	0	2	2
Total		10	11	21

La ocupación de los sujetos de estudio que más se vio respondida en la encuesta es de estudiante (n=5), seguido por jubilado (n=4) ya que la mayoría de los pacientes son mayores de 50 años.



Gráfica 3. Nivel de estudios

Tanto los pacientes como los controles sanos cuentan con un grado escolar (gráfica 3) en su mayoría de nivel de licenciatura completa/terminada (n=12); cabe recalcar que la mayoría de los sujetos de estudio son pacientes atendidos en el Hospital Universitario de Puebla, donde se atiende en su mayoría a trabajadores de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla o a derecho habientes que cumplen con ciertos requisitos y cuentan con los recursos socioeconómicos para cubrir sus gastos no incluidos en el hospital. Se denota que algunos sujetos cuentan con especialidad médica (n=3) o maestría (n=3).

Tabla 4. Lugar de residencia de los sujetos en el estudio.

		<i>Lugar de residencia</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Lugar de residencia</i>	<i>San Andrés Cholula</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
	<i>Puebla</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>19</i>
<i>Total</i>		<i>10</i>	<i>11</i>	<i>21</i>

El lugar de residencia en común que tuvieron fue en Puebla centro (n=19), mientras que la minoría se encuentra residiendo en el municipio de San Andrés Cholula (n=2), esto puede ser debido ya que el Hospital está cerca de Puebla centro y por comodidad o facilidad de transporte, la mayoría se atiende alrededor del centro de Puebla.

El paso inicial para el estudio fue la investigación y análisis *in silico*, donde se obtuvieron 6 estudios de NCBI de metagenomas humanos del bacterioma en el intestino de personas sanas e individuos con enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa crónica inespecífica (tabla 2), para su uso en la misma plataforma posteriormente y poder blastear el biomarcador molecular del gen de pirroloquinolina quinona dentro de estos metagenomas; se descargó una máquina virtual “VM Workstation” que permitió instalar el SRA toolkit, habilitando el descargar los documentos en SRA de los estudios metagenómicos y también convertirlos a formato fasta; en estos estudios se usaron únicamente a los pacientes con Cuci e individuos sanos; se eliminaron a pacientes con Crohn u alguna otra enfermedad crónica.

Tabla 5. Estudios de metagenomas humanos de EI y sanos

SRA nombre	Estudio	Muestra	Instrumento	Organismo	Fuente
SRX3139489	Metagenoma humano y metatranscriptoma en enfermedades inflamatorias intestinales (iHMP/HMP2)	Muestra Fecal	Illumina HiSeq 2000	Metagenoma del intestino humano	Metagenomico
SRX001447	Microbioma central del intestino en obesos	Muestra generica de metagenomica de humano	454 GS FLX	Metagenoma del intestino humano	Metagenomico
SRX2816761	El rol de microbiota humano en Colitis ulcerosa, metagenomica de genes funcionales	Metagenoma humano	Illumina HiSeq 1000	Metagenoma humano	Metagenomico
ERX470345	Catalogo integral de genes de referencia en el microbioma del intestino humano	Muestra fecal de chinos	Illumina HiSeq 2000	Metagenoma del intestino humano	Metagenomico
SRX6097437	Secuenciacion metagenomica del microbiota intestinal en mujeres	PN-5	Illumina HiSeq 2500	Metagenoma del intestino humano	Metagenomico
ERX629148	Potencial del microbiota fecal	DE-069C	Illumina MiSeq	Homo Sapiens	Metagenomico

Las secuencias obtenidas en el blastado se utilizaron en el software "MEGA11"; donde se analizan los lados conservados de todas las secuencias que se tiene en un solo documento mediante los programas Muscle y Mafft", primero se realizó una revisión a todas las secuencias donde se eliminaron gaps que pudieran afectar al análisis, se arreglaron los nombres de cada secuencia y se acomodaron tratando de que estas secuencias estuvieran lo más escalonadas posible.

2. gn SRA SRR5548989.9879658.1.1-154/1-154.9879658	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
3. gn SRA SRR5548989.9879658.1.2-154/1-153.9879658	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
4. gn SRA SRR5548989.9879658.1.14-154/1-141.9879658	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
5. gn SRA SRR5548989.9879658.1.14-117/1-104.9879658	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
6. CP050054.1.3340345-3341940/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain LIUYANG-A chromosome	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
7. CP053028.1.3341187-3342782/1-1596 Pseudomonas aeruginosa PAO1 chromosome complete	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
8. CP060703.1.3373366-3374961/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain NRD619 chromosome c	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
9. CP003149.1.3404541-3406136/1-1596 Pseudomonas aeruginosa DK2 complete genome	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
10. CP027857.1.3340708-3342303/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain MPAO1 chromosome c	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
11. CP074424.1.980758-982353/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain 88A chromosome	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
12. CP080007.1.3390143-3391738/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain S-1 chromosome compl	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
13. CP064403.1.3439424-3441019/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain WTJH12 chromosome c	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
14. CP007399.1.6063367-6064962/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain F22031 complete genom	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
15. LN870292.1.3320715-3322310/1-1596 Pseudomonas aeruginosa DK1 genome assembly Pseud	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
16. CP017149.1.3340710-3342305/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 15692 chromosom	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
17. CP013478.1.3319253-3320848/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain SCVJan complete genom	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T
18. CP032126.1.3341075-3342670/1-1596 Pseudomonas aeruginosa strain PAO1161 chromosome	TGTCGTTGAGCTTGACCATGCC TTCGGGGTAGAGCAGCACA T

Figura 10. Alineamiento de secuencias.

Se muestran las secuencias con sus claves y nombres; remarcado en colores están los nucleótidos, los cuales tienen un color específico según sea timina, adenina, guanina y citocina. Al alinearse en el software los nucleótidos similares quedan en las mismas filas y por eso se llama “alineación”.

El resultado del análisis filogenético con las secuencias se presenta en las figuras 11 y 12, en el cual se usó un método de máxima verosimilitud, esta herramienta da una medida precisa de la distancia para valorar parentesco de secuencias.

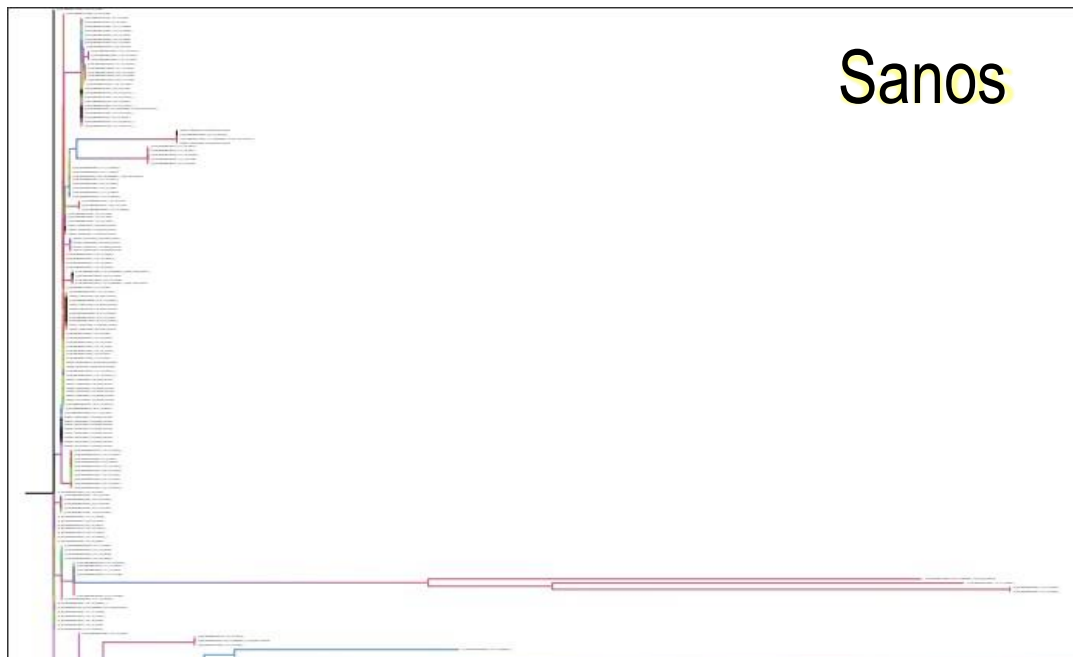


Figura 11. árbol filogenético de individuos sanos.

Se observa una vista previa y extendida del árbol filogenético de los géneros bacterianos encontrados en los estudios metagenómicos de los individuos sanos.

En los árboles filogenéticos se pueden observar las secuencias que tienen algo en común entre los diferentes clados (grupos) que se forman en cada árbol, que contengan el biomarcador molecular. Para poder observar con mayor detenimiento se tomaron diferentes grupos de clados de ambos árboles (fig 11 y 12); esto para determinar la similitud entre grupos, esto tomando una secuencia de los diferentes clados y blasteándole para conocer con qué bacteria tiene similitud esa secuencia y meterla en el clado para ver si entra dentro de éste.

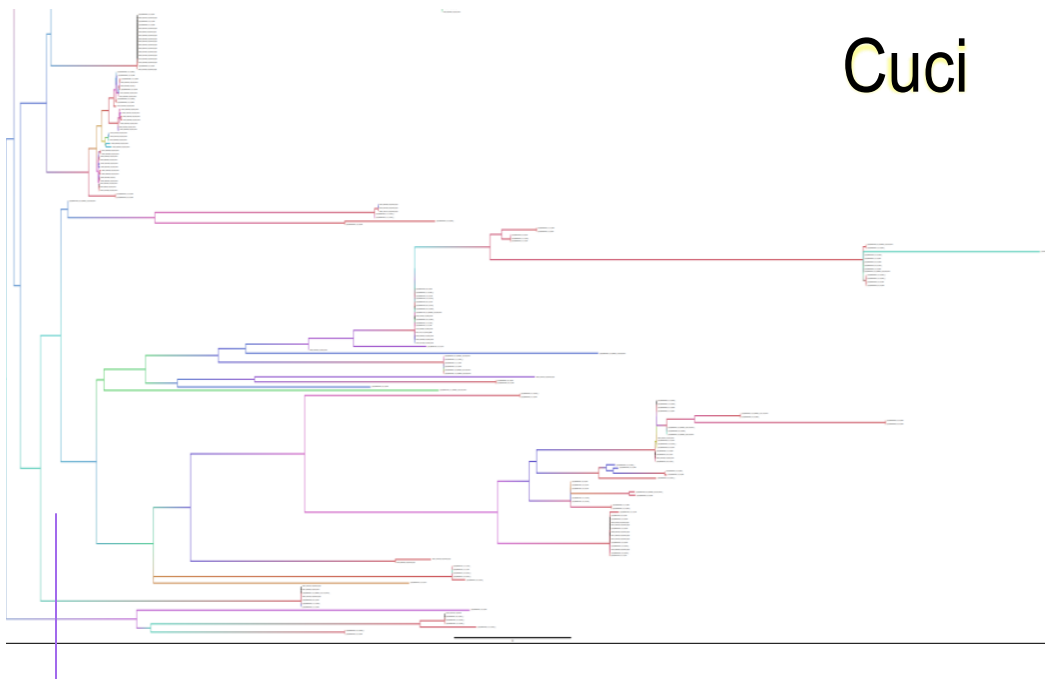


Figura12. Árbol filogenético de pacientes con Cuci. Se muestra la vista extendida del árbol filogenético de todos los géneros bacterianos que se encontraron en los estudios metagenómicos de los pacientes con Cuci, ordenados en diferentes clados dependiendo su similitud entre cada uno de estos con el marcador molecular.

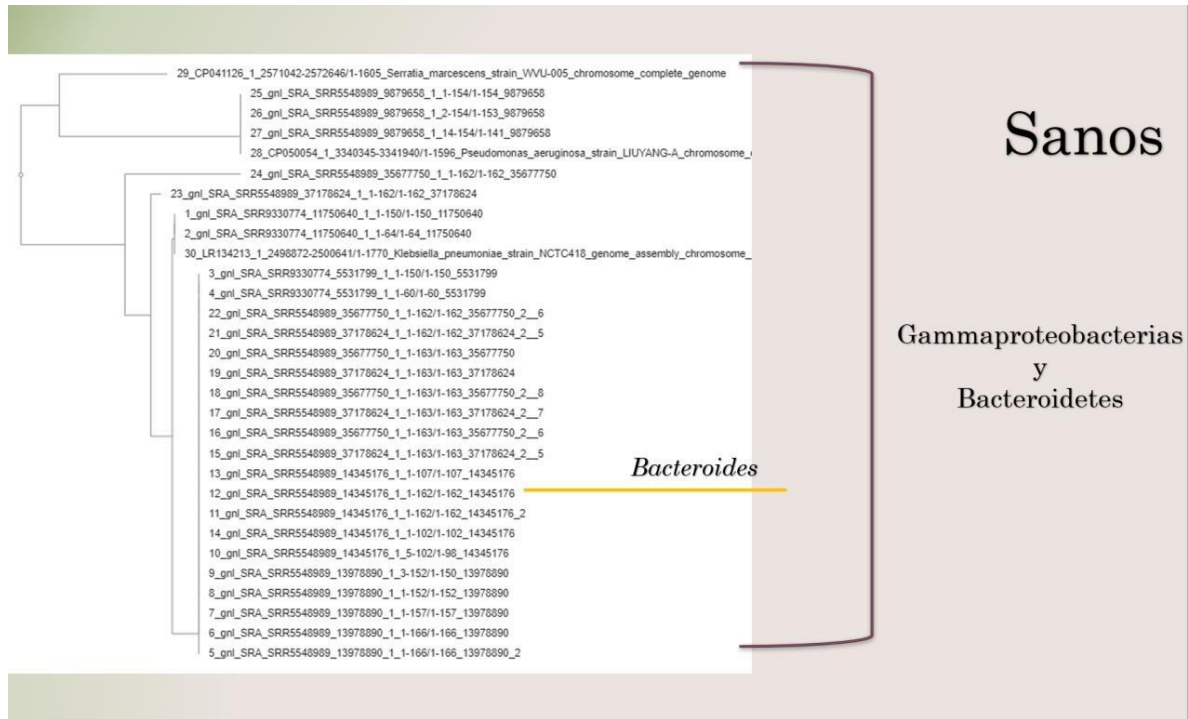


Figura 13. Clado de sanos.

Se observan diferentes clados de una parte del árbol filogenético de los individuos sanos, se muestran los nombres de los géneros bacterianos arreglados en claves y se señala con flecha amarilla un género llamado Bacteroidetes.

Dentro de los clados de los sanos podemos encontrar una cantidad variada y extensa de Bacteroidetes (figura 13); también encontramos diferentes Gammaproteobacterias como *Pseudomonas*, *Serratia* y *Klebsiella*; de estas diferentes Gammaproteobacterias no hay una inclinación hacia algún filo en lo particular, si no que se encuentran en diferentes cantidades, pero proporcionalmente equilibradas (figura 14).

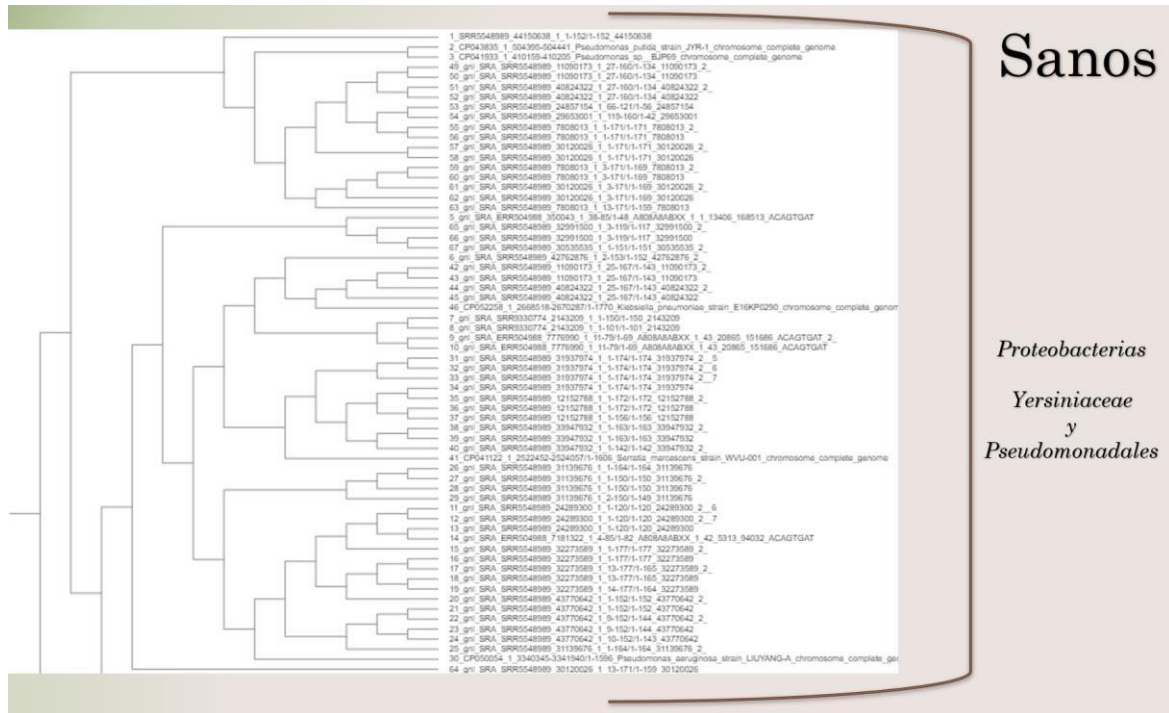


Figura 14. Segundo clados de sanos. Se muestran más clados de sanos donde se encuentran otros géneros bacterianos de filo Proteobacterias.

Mientras que en los clados de los pacientes con Cuci, podemos encontrar Gammaproteobacterias pero esta vez sin presentar algún filo de Bacteroidetes. Se encuentran en su mayoría de clados muchas secuencias de bacterias de filo Proteobacterias que son conocidas como patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae* (figura 15). También empezamos a encontrar a un género bacteriano llamado *Hylemonella gracilis*, que es un patógeno oportunista grande proveniente de los filios de Betaproteobacterias (figura 15).

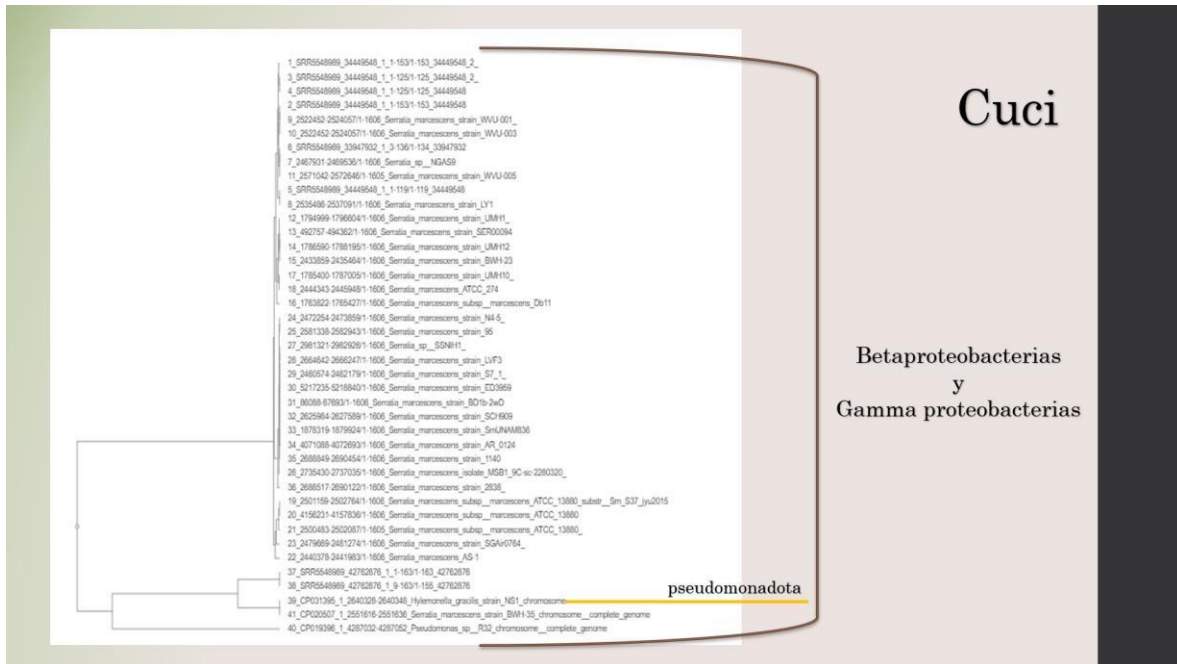


Figura 15. Clados de Cuci.

Se visualizan diferentes clados del árbol filogenético de los pacientes con Cuci donde se muestran los filos Betaproteobacterias y Gamma proteobacterias; dentro de los Betaproteobacterias se encuentra las pseudomonas la cual se encuentra remarcada con color amarillo.

En un clado de los pacientes de Cuci, se encontró un género bacteriano conocido como *Escherichia* (Figura 16), el cual no se encontraba dentro de las secuencias de un clado en específico, sin embargo, aparecía con una semblanza similar a estas secuencias en un porcentaje.

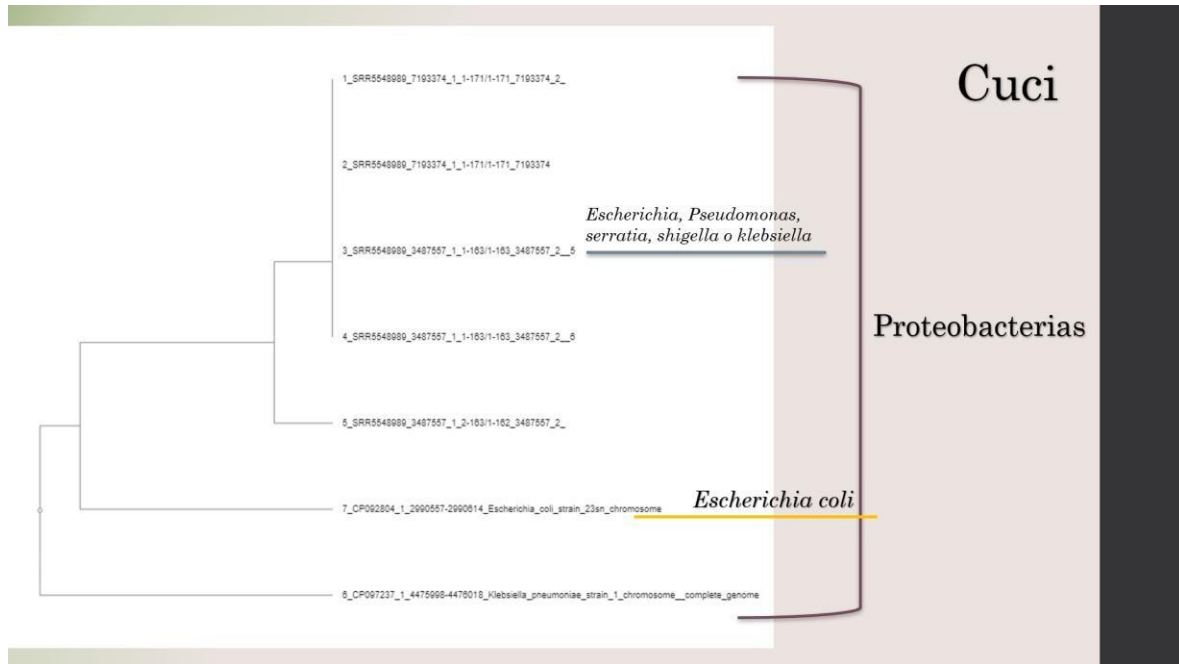


Figura 16. Clados de Cuci con Escherichia.

Se observa unos clados de Cuci con escherichia coli en el remarcado en amarillo, todos los filios de estos clados son Proteobacterias como lo señala la imagen.

Como resumen de los resultados se obtiene respuesta en parte a los objetivos del estudio de conocer los diferentes géneros bacterianos potencialmente productores de PQQ en los individuos sanos y en los pacientes con Cuci. Tomando en cuenta que en los sanos hay una característica que en pacientes de Cuci no; esta es la existencia de Bacteroidetes uniformes. Mientras que en pacientes Cuci se encontraron varias secuencias pertenecientes a Gammaproteobacterias oportunistas y Betaproteobacterias patógenas; sin encontrarse algún Bacteroidete uniforme en los clados.

Con la finalidad de relacionar los resultados *in silico* de los posibles géneros bacterianos potencialmente productores de PQQ con los datos clínicos de los pacientes y sus hábitos alimenticios, se aplicó una encuesta con preguntas de opción múltiple vía *online* (Google forms); los resultados del análisis estadístico indicaron que los sujetos de estudio contaron con una edad promedio de 45.62 ± 18.0

años. Las gráficas y tablas que se mostrarán a continuación forman parte de las respuestas del cuestionario.

Tabla 6. Tipo de actividad física

	<i>Actividad física: Tipo</i>		<i>Total</i>
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	
<i>Nada</i>	2	1	3
<i>Caminar</i>	3	7	10
<i>Corre o Cardio</i>	2	1	3
<i>Gimnasio</i>	2	2	4
<i>Futbol</i>	1	0	1
<i>Total</i>	10	11	21

La actividad física (tabla 5) de los sujetos en el estudio demuestra que la mayoría tiene una actividad física de caminata (n=10) con un tiempo alrededor de 30 min al día que en semanas son 150 min (n=5); algunos pacientes prefirieron no decir cuánto tiempo caminaban o refirieron que no contaban el tiempo total de caminata. El ejercicio en gimnasio (n=4) forma parte también de los hábitos diarios de sujetos sanos con aproximadamente 120 (n=3) y 60 (n=1) min a la semana referenciado en la tabla 18.

Tabla 7. Tiempo a la semana en minutos de la actividad física.

	<i>Actividad física: tiempo a la semana (min)</i>		
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>0</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>5</i>
<i>30</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
<i>40</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
<i>60</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>120</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>150</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>5</i>
<i>180</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>300</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>420</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
<i>Total</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>21</i>

Otro hábito importante y resaltado en la encuesta que entra dentro de los factores de riesgo es el tabaquismo. En el cual se observa que la mayoría de los sujetos de estudio no consume ningún cigarro o tabaco en la semana; mientras que 5 sujetos tanto pacientes con Cuci como individuos sanos, esto resalta a la vista ya que el tabaquismo juega un papel importante de riesgo en la enfermedad; de los sujetos que consumen tabaco en alguna forma todos son sanos. Los pacientes con Cuci declararon no fumar ya sea por complicaciones, gustos o hábitos.

Tabla 8. Tabaquismo en los sujetos de estudio

	<i>Tabaquismo</i>		
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Ninguno</i>	<i>10</i>	<i>6</i>	<i>16</i>
<i>A veces (2 a la semana)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>5</i>

Tabla 9. Enfermedad extra de los sujetos en estudio

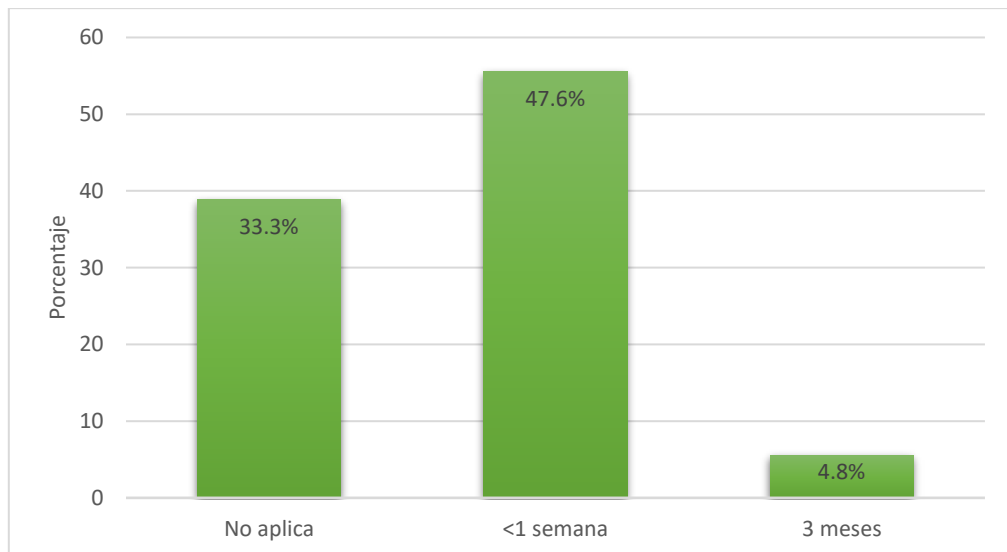
<i>Enfermedad</i>	<i>Presenta</i>		<i>No presenta</i>	
	Sano	Cuci	Sano	Cuci
<i>Estrés o estar bajo presión</i>	5	6	5	5
<i>Síndrome del Intestino Irritado (SII)</i>	0	5	10	6
<i>Enfermedades crónicas (diabetes y cáncer)</i>	0	2	10	9
<i>Hipertensión</i>	0	4	10	7
<i>Triglicéridos</i>		2		
<i>Gastritis</i>	0	2	10	9
<i>Dismenorrea</i>	1	2	9	9
<i>Problemas del riñón</i>	0	3	10	8
<i>Colesterol</i>	0	2	10	9
<i>Hígado graso</i>	0	1	10	10
<i>Total</i>				

A estos mismos, también se les pregunto en la encuesta si contaban con alguna enfermedad o comorbilidad aunada con el diagnostico de Cuci y en los cuales resaltaron comorbilidades importantes como diabetes (n=2), cáncer (n=1), triglicéridos (n=2) e hipertensión (n=4).

Tabla 10. Presencia de estreñimiento

	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>No</i>	10	5	15
<i>Sí</i>	0	6	6

También se reportó en la encuesta la presencia de estreñimiento, donde la mayoría de los sujetos no presenta estreñimiento (n=15); pero quienes si presentan (n=6) 4 de los sujetos son pacientes con Cuci donde uno refiere que presenta mayor estreñimiento cuando la enfermedad esta activa y que su duración es de alrededor de 3 meses (grafica 4); mientras que de los demás pacientes con estreñimiento recalcan que la duración es menor a 1 semana.



Gráfica 4. Ausencia/presencia y tiempo de estreñimiento

Tabla 11. Horas de sueño, deposiciones al día y a la semana

	<i>Media ± Desv, Estándar Sanos</i>	<i>Media ± Desv, Estándar Cuci</i>
<i>Horas de sueño en promedio (día)</i>	6.52±0.981	3.44±0.892
<i>Número de deposiciones (día)</i>	1.81 ± 1.167	1.08 ± 1.237
<i>Número de deposiciones (semana)</i>	0.19 ± 0.873	0.33 ± 0.150
<i>Duración de estreñimiento</i>	1.81 ± 1.662	2.03 ± 1.034

Las horas de sueño promedio al día son importantes como factor para la enfermedad y el número de deposiciones al día y a la semana según la escala de truelove-Witts y la de Mayo: la temperatura axilar, numero de deposiciones (día y semana) y el sangrado a la hora de defecar ayuda a saber el grado de gravedad de la colitis ulcerosa. En la tabla se denota la media y desviación estándar de cada una de estas variables.

Tabla 12. Sangrado en heces de sujetos en estudio

		<i>Sangrado en heces</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>presenta sangrado en heces?</i>	<i>No</i>	<i>8</i>	<i>7</i>	<i>15</i>
	<i>Si</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>6</i>
<i>Total</i>		<i>10</i>	<i>11</i>	<i>21</i>

Como se mencionó arriba, el sangrado en heces ayuda a saber en qué grado de enfermedad está el paciente; algo que resaltó fuera de lo normal es que de los 6 sujetos que dijeron si tener sangrado al defecar es que 5 de los 6 son pacientes con Cuci y un individuo sano señalo ser estreñida y también tener hemorroides y por lo tanto a veces presentar sangrado en heces.

Tabla 13. Duración del sangrado en heces

		<i>Duración del sangrado</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>¿cuántas veces presenta sangrado?</i>	<i>Nunca</i>	9	7	16
	<i>1 vez a la semana</i>	1	0	1
	<i>Esporadicamente</i>	0	2	2
	<i>1 vez al mes</i>	0	1	1
	<i>Todos los días cuando esta activa</i>	0	1	1
Total		10	11	21

La duración del sangrado también es importante para saber la activación y gravedad de la enfermedad; de 5 pacientes que respondieron tener sangrado, 2 declararon tener el sangrado esporádicamente, queriendo decir que no es continuo y no es en abundancia el sangrado; mientras que otro paciente mencionó tener sangrado 1 vez a la semana esto repercute en el nivel de gravedad de la enfermedad; otro paciente recalco que 1 vez al mes presentaba sangrado lo cual refiere a algún periodo de estreñimiento; mientras que un último paciente refirió sangrado todos los días cuando esta activa la enfermedad lo cual refleja un grado medio en la escala de truelove Witts y de Clínica Mayo.

Tabla 14. Presencia o ausencia de hemorroides

		<i>Presencia hemorroides</i>		
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Presencia de hemorroides</i>	<i>No</i>	8	6	14
	<i>Si</i>	2	5	7
Total		10	11	21

Los sujetos de estudio con hemorroides se reportaron en la tabla 13, donde se observa que 7 de 21 sujetos presenta hemorroides; en sanos se observaron 2 sujetos que padecen esporádicamente de hemorroides; mientras que en pacientes

Cuci son 5 los sujetos que normalmente padecen de hemorroides y más cuando la enfermedad esta activa o llegan a tener síntomas más remarcados o agravados. El medir o saber de las hemorroides también ayuda con la gravedad de la enfermedad, ya que las hemorroides muchas veces conllevan a sangrados a la hora de defecar.

Tabla 15. Presencia o ausencia de dolor abdominal

<i>Dolor abdominal</i>				
		<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Dolor abdominal</i>	<i>No</i>	10	9	19
	<i>Si</i>	0	2	2
<i>Total</i>		10	11	21

El dolor abdominal comúnmente significa que la enfermedad esta activa ya que es un síntoma de la enfermedad de Cuci; 2 de los 21 sujetos de estudio presentaron dolor abdominal esporádico o cuando la enfermedad esta activa, ambos sujetos fueron pacientes con Cuci.

Tabla 16. Sensación incompleta al evacuar

<i>Sensación incompleta al evacuar</i>			
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>No</i>	9	0	9
<i>A veces</i>	1	8	9
<i>Si</i>	0	3	3
<i>Total</i>	10	11	21

Tener sensación incompleta al evacuar también puede ser una señal de estreñimiento, puede ser por sangrado o por inflamación en el colon. Por lo tanto, se anexo una pregunta en la encuesta donde 9 sujetos de estudio dijeron que a veces presentaban esa sensación, de los cuales 8 fueron pacientes con Cuci y solo 1 fue un individuo aparentemente sano; mientras que los sujetos que si presentan totalmente sensación incompleta al evacuar fueron 3 pacientes con Cuci.

Tabla 17. Tipo de heces en los sujetos de estudio

	<i>Tipo de heces</i>		<i>Total</i>
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	
<i>Ligero estreñimiento</i>	4	2	6
<i>Normal</i>	3	2	5
<i>Ligera diarrea</i>	8	9	17
<i>No identificable</i>	2	6	8

Los tipos de heces de los sujetos también nos dicen mucho tanto de la enfermedad como de los hábitos alimenticios. Se tomaron en cuenta los números de la escala de Bristol y se pusieron imágenes de esa escala como ejemplo, y que los sujetos tacharan o marcaran a que tipo se relacionaban de la escala; como resultados, la mayoría de los sujetos de estudio (n=9) tuvieron un tipo de heces normal, sin embargo 6 sujetos (4 pacientes y 2 sanos) presentaron un ligero estreñimiento la escala de Bristol. En la tabla 16 está anotado como no identificable un apartado de la tabla ya que hubo 3 sujetos (todos pacientes con Cuci) en la encuesta que se identificaban con más de 4 tipos de heces; queriendo decir que variaba mucho la estructura de las heces en diferentes días de la semana. Esto parece llamar la atención ya que todos fueron pacientes con Cuci.

Tabla 18. Consumo de laxantes

<i>Consumo de laxantes</i>			
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Nunca</i>	9	7	16
<i>A veces</i>	1	4	5
<i>Total</i>	10	11	21

El consumo de laxantes fue un parámetro en la encuesta donde se obtuvo que 5 de 21 sujetos toman laxantes con frecuencia media; todos los que toman laxantes fueron pacientes con Cuci, esto debido a que la mayoría de ellos sufren de estreñimiento. No se obtuvieron datos de que los individuos sanos tomen laxantes.

Tabla 19. Tratamiento médico actual

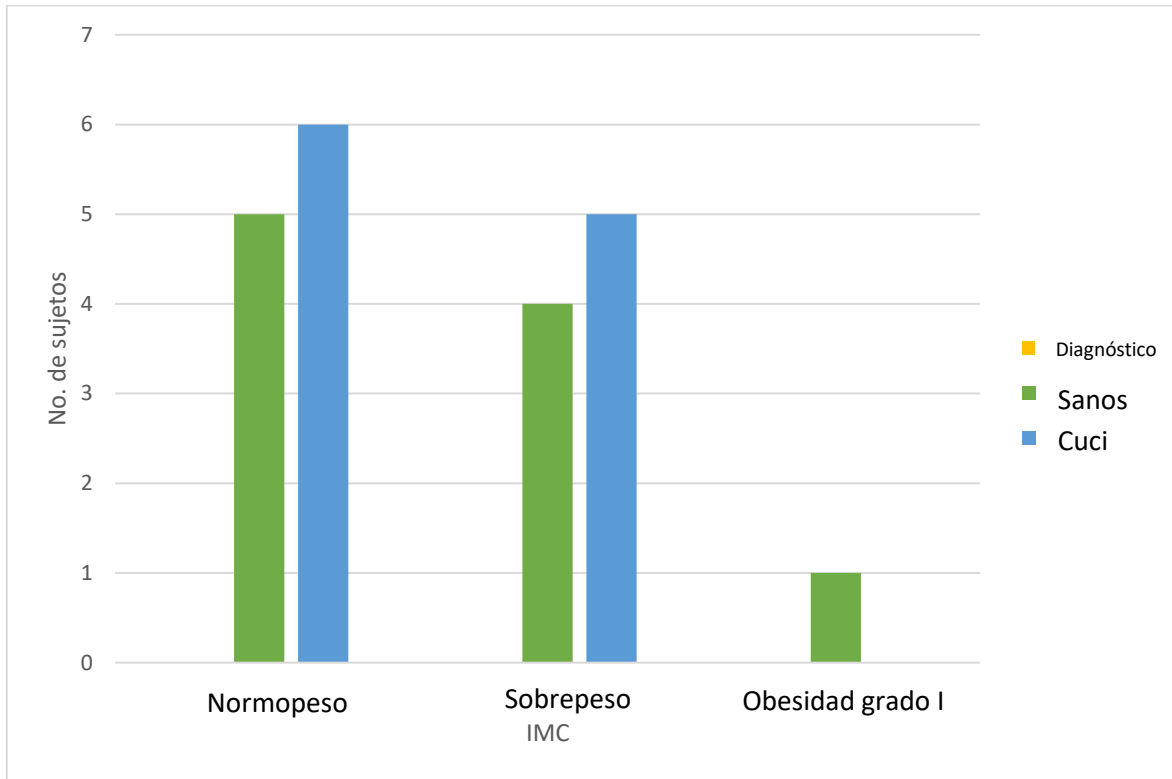
<i>Tratamiento médico actual</i>			
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>No</i>	6	0	6
<i>Sí</i>	4	11	15
<i>Total</i>	10	11	21

Como tratamiento médico actual se obtuvo que 15 sujetos de estudio están en tratamiento médico actual; 11 de los cuales son los pacientes con Cuci y llevan un seguimiento con la enfermedad, más allá del seguimiento también llevan otros tratamientos médicos de comorbilidades que tienen aparte de Cuci. De los individuos sanos, 4 presentan tratamiento médico por razones diferentes, como contracturas por ejercicio.

Tabla 20. Uso de mesalazina como tratamiento

	<i>Medicamento (CUCI)</i>	
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>
<i>Ninguno</i>	<i>10</i>	<i>0</i>
<i>Mesalazina</i>	<i>0</i>	<i>11</i>

El tratamiento para los pacientes con Cuci (n=11) es basado principalmente con mesalazina que actúa como inhibidor de prostaglandina y es catalogado como un tipo de antioxidante. De los 11 pacientes con este tratamiento solo 2 pacientes toman este medicamento una dosis tanto en vía oral como en vía rectal, esto solo se presenta ya que los cuadros/episodios de Cuci en esos pacientes son un poco más agudos. La mesalazina se tomó en cuenta para los resultados ya que como se describió arriba, puede ser tomado como un tipo de antioxidante que ayuda en los síntomas y agravaciones de la enfermedad y también porque se toma en cuenta para saber la cantidad de antioxidantes que consume el paciente en total.



Gráfica 5. Índice de masa corporal en los sujetos de estudio

El índice de masa corporal nos dice quiénes del estudio están por arriba del peso adecuado que deberían tener, el 57.14% donde entran la mayoría de los pacientes con Cuci que son normopeso (n=12), mientras que de sobrepeso hay un 38% que incluye pacientes con Cuci e individuos sanos (n=8), mientras que de obesidad grado I solo es 1 individuo sano. Esto nos ayuda a saber también tanto los hábitos alimenticios como las actividades físicas y el cuidado personal en la nutrición que tienen los sujetos de estudio.

Tabla 21. Tipo de alimento más consumible por los sujetos de estudio, dulce, salado o picoso

<i>Tipo de alimento más consumible</i>			
	<i>Sano</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Dulce</i>	2	2	4
<i>Salado</i>	5	4	9
<i>Picante</i>	3	5	8
<i>Total</i>	10	11	21

El tipo de alimento más consumido ayuda a saber qué tipo de comida con componentes fenólicos consume más los sujetos de estudio, en este caso la mayoría come alimentos salados (n=9) y picosos (n=8), mientras que dulce casi no comen (n=4).

Tabla 22. Suplementos alimenticios que consuman a la fecha

<i>Suplementos alimenticios</i>		
	<i>Sanos</i>	<i>Cuci</i>
<i>Ninguno</i>	7	5
<i>Suplementos</i>	3	6
<i>Total</i>	10	11

Los suplementos alimenticios o vitaminas ayudan a saber también en cantidades cuanto consume cada persona de compuestos antioxidantes ya que la mayoría de los suplementos incluyen variedades de vitaminas que son antioxidantes. En este estudio 12 sujetos no toman ningún suplemento; mientras que 9 personas de las cuales 3 son individuos sanos y 6 son pacientes con CUCI que si toman algún tipo de suplemento diario.

Tabla 23. Tratamiento nutricional

<i>Tratamiento nutricional</i>			
	<i>Sanos</i>	<i>Cuci</i>	<i>Total</i>
<i>Ninguno</i>	9	11	20
<i>Auriculoterapia</i>	1	0	1

Aunado con los suplementos diarios, se requirió saber si los sujetos contaban con alguna guía de planeación o tratamiento nutricionales; sin embargo, de los 21 sujetos solo 1 individuo sano estaba llevando a cabo tratamiento de Auriculoterapia donde le daban guías de alimentación al mes. Hay que recordar que la auriculoterapia es un tipo de medicina tradicional de china derivada de la acupuntura (Tabla 22).

Se realizaron correlaciones Rho Spearman dado que las variables no son normales ($p < 0.001$) de los alimentos ricos en compuestos fenólicos y los niveles de gravedad de la enfermedad, dando como resultado que, a mayor consumo de alimentos como avena, habas, brócoli, café, mayor dolor abdominal ($p < 0.001$) A mayor consumo de orégano mayor nivel de PUCAI ($p < 0.05$). A mayor consumo de guayaba, betabel, achiote las heces tienen inadecuada consistencia de las heces ($p < 0.05$). A mayor consumo de betabel, enfrijoladas, huazontles, mole rojo mayor cantidad de evacuaciones tendrá el individuo por el día ($p < 0.05$). A mayor cantidad de enchiladas, cilantro, orégano, epazote mayor cantidad de evacuaciones hay en la noche ($p < 0.05$).

En esta investigación se presentaron 21 muestras fecales (11 de pacientes con colitis ulcerosa y 10 de individuos aparentemente sanos) que se recibieron al tiempo que se hizo entrega de la encuesta, esto fue con el objetivo de encontrar en estas muestras el marcador molecular de una región del operón *pqqABCDEF* que en este caso fue el marcador molecular *pqqCDE*, para poder llegar a ese resultado se tuvo que hacer una extracción de DNA bacterial de las muestras fecales y del DNA se partió a correr ampliaciones del operón *pqqCDE* por PCR en punto final. Las

imágenes que se presentan a continuación muestran los resultados de las amplificaciones con los cambios hechos en cada una de ellas.

Se comenzaron corriendo los resultados de los amplicones en geles de electroforesis a 110 volts por 40 min, el primero pozo de izquierda a derecha es el marcador de peso molecular, donde se remarca en la imagen el número de pares de base que debería tener los amplicones (el marcador molecular *pqqCDE* mide aproximadamente 1790 pares de bases); en cada pozo se puso todo el tubo de PCR que contenía 20ul y 1ul de buffer de carga haciendo un total de 21ul en cada pozo del gel. Cada pozo contenía la siguiente condición: En el último pozo se cargó la muestra control que fue DNA extraído de bacterias *Pseudomonas*, las cuales ya se sabe que contienen este marcador molecular *pqqCDE* y las cuales salieron positivas en el primer gel.

Se observa en el primer gel (figura 17) que los pozos donde se pusieron los amplicones de PCR aparecen sin mostrar bandas de amplificación, sin embargo, el último pozo que representa el control positivo con DNA de bacterias de *Pseudomonas* se logra ver una banda como amplicón de alrededor 1700 pb. Lo cual representó que, si hubo amplificación en el control, pero en las muestras fecales no hubo (todos los pozos contienen PCR de pacientes Cuci). Dado estos resultados se optó por cambiar oligos y otros reactivos de la PCR y también se usó un método de purificación con isopropanol para las muestras ya extraídas.

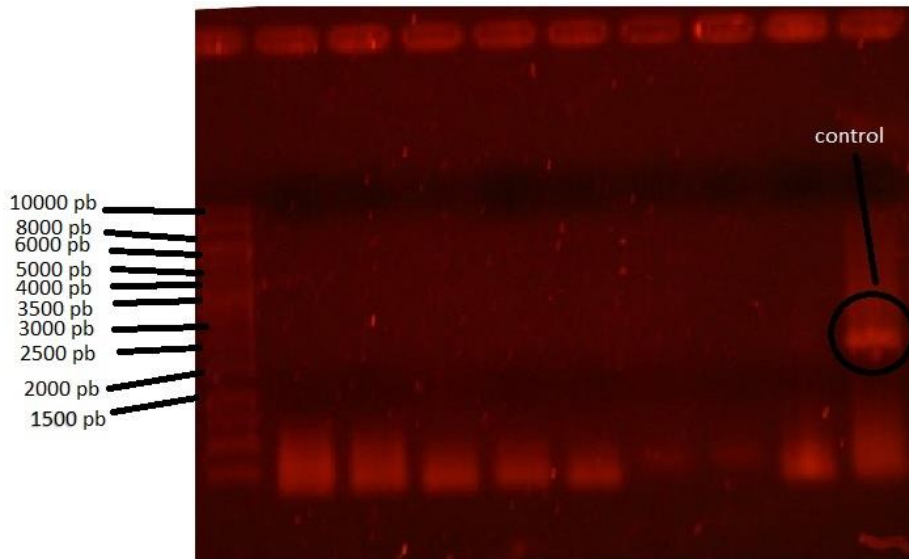


Figura 17. Gel 1.

Se muestra el primer gel de amplificación de DNA; el primer pozo contuvo el marcador de peso molecular, el segundo pozo contuvo el amplicón de la muestra 1 de los pacientes con CUCI, el siguiente pozo contuvo la muestra 2, en el tercero la muestra 3, en el cuarto la muestra 4 y así consecutivamente hasta llegar al décimo pozo el cual contuvo el control positivo que se usó para el estudio, en este caso es un género bacteriano conocido como *Pseudomonas* el cual se sabe perfectamente que contiene el marcador molecular que estamos amplificando.

En el siguiente intento de amplificación con los cambios ya actualizados a lo que se describió anteriormente, se obtuvo un gel de electroforesis que se corrió a 110volts por 45 min, en la figura 18 se ve en el primer pozo el marcador molecular, en el segundo pozo se cargó el control de *pseudomonas* que dio positivo y en los demás pozos restantes las PCRs de las muestras, todas de sanos en esa electroforesis. No se observaron bandas de amplificación en ninguno de los pozos de las muestras, sin embargo, si en el control, aunque la banda que se amplificó es de menor peso molecular de lo que se esperaba. Por lo tanto, se llevó a cabo un cambio en el protocolo con purificación de DNA no por isopropanol si no usando el kit Qiagen.

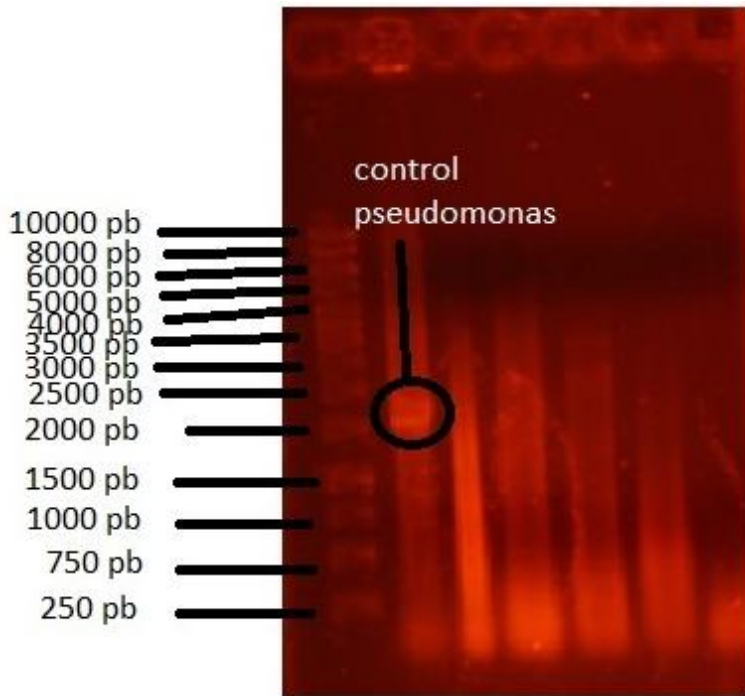


Figura 18. Segundo gel.

Se observa segundo gel de amplificación donde en el primero pozo se encuentra el marcador de peso molecular con flechas señalando donde tendría que quedar las bandas de los amplicones, en el segundo pozo se encuentra el control positivo que se usó de *pseudomonas*, en el tercer pozo se encuentra los amplicones de la muestra 7 de paciente con CUCI, en el cuarto pozo esta la muestra 1 de paciente con CUCI, en el quinto pozo la muestra 1 de sanos, en el sexto la muestra 3 de sanos y en el último pozo esta la muestra 5 de sanos.

Para las últimas pruebas de amplificación se usaron distintas extracciones de DNA de bacterias como: *Pseudomonas*, *Burkordelia* y *Klebsiella*, las cuales se cargaron en los pozos 4,5,6 y 7 del gel en la figura 19. Como se observa en el gel número 3, en el primer pozo se cargó el marcador molecular, en el pozo 2 y 3 se cargaron las PCR de 2 muestras (de la muestra 7 de paciente Cuci), las cuales no se ve ninguna banda de amplificación y se ve un ligero barrido hasta el fondo. Dando como resultado que los valores positivos de los controles dieron positivos, aunque se encuentran debajo de los pares de bases esperados, *Burkordelia* es la única bacteria que llegó a tener amplicones del tamaño esperado que es cerca de los 2000 pares de base.

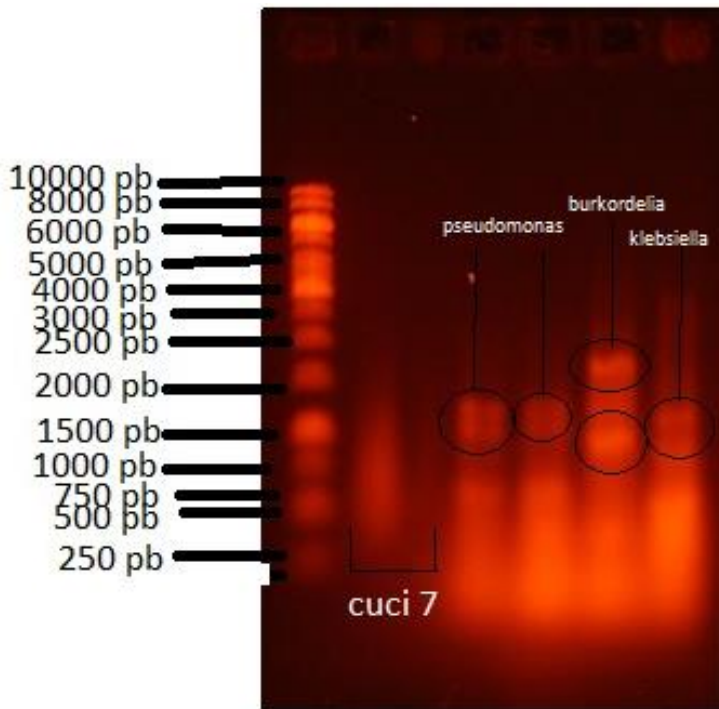


Figura 19. Análisis electroforético de amplicones derivados de la PCR con el marcador molecular *pqqCDE*.

Se muestra un gel donde en el primer pozo se encuentra el marcador de peso molecular señalando los pesos de las bandas, en el segundo y tercer pozo se encuentran los amplicones de las muestras 3 y 7 de CUCI, en el cuarto y quinto pozo están controles positivos de *Pseudomonas*, en el sexto pozo un control positivo de *Burkholderia* y en el último pozo otro control positivo de *Klebsiella*.

Como resumen de los resultados se obtiene respuesta en parte a los objetivos del estudio de conocer los diferentes géneros bacterianos potencialmente productores de PQQ en los individuos sanos y en los pacientes con Cuci. Tomando en cuenta que en los sanos hay una característica que en pacientes de Cuci no; esta es la existencia de *Bacteroidetes* uniformes. Mientras que en pacientes Cuci se encontraron varias secuencias pertenecientes a *Gammaproteobacterias* oportunistas y *Betaproteobacterias* patógenas; sin encontrarse algún *Bacteroidete* uniforme en los clados.

En las correlaciones de Rho Spearman dio como resultado con un $p < 0.05$ de que, a mayor consumo de alimentos como avena, habas, brocoli y café, hay mayor dolor abdominal; a mayor consumo de oregano hay mayor nivel de PUCAI; a mayor consumo de guayaba, betabel y achiote, las heces tienen inadecuada consistencia;

a mayor consumo de betabel y enfrijoladas hay mayor cantidad de evacuaciones por día y a mayor consumo de enchiladas, cilantro, oregano y epazote, será mayor la cantidad de evacuaciones por la noche.

9. Discusión:

En el presente estudio se analizó el bacterioma y los hábitos alimenticios de 21 sujetos, 10 sanos y 11 pacientes con diagnóstico de colitis ulcerosa crónica inespecífica. Todos provenientes de México, Puebla, Puebla y San Andrés Cholula, con edades entre 18 a 80 años; las edades concuerdan tanto con un artículo sistemático que habla de las diferencias en la microbiota en personas con y sin EII del autor Pittayanon en el 2020 (26); al mismo tiempo, concuerdan con cada uno de los artículos mencionados en el mismo, donde se recuperaron muestras de sujetos de edades desde niños, adolescentes, hasta adultos.

En el artículo de Wang, 2014 (45) no explica exactamente la edad de los pacientes, únicamente menciona que son personas adultas; tomando en cuenta que personas adultas tiene un rango de 18 en adelante, concuerda con las edades que se tomaron en cuenta en el presente estudio. En ningún estudio mencionan la ocupación y el grado de estudios de los sujetos; sin más, esto podría proporcionar una vista del tipo de vida y gastos en comprar para tener en cuenta en el tipo de alimentación que tienen estos.

Para el análisis *in silico*, no hubo como tal un estudio que hable acerca de las recolecciones de estos ni el análisis de árboles filogenéticos, los estudios más cercanos solamente hablan acerca de la diversidad de microbiota en las personas con EII, más no existen específicamente del bacterioma productor de PQQ, sin embargo, se puede discutir en el lado de los porcentajes de identidad que hubo dentro de estos metagenomas donde se buscó el biomarcador molecular *pqqCDE*, estos porcentajes fueron de entre 17 - 20%; esto indica que el tramo conservado o es muy pequeño para el biomarcador que se tiene como objetivo o no es muy específico, ya que tiene un peso de 1775 pb; estamos hablando de que el 20% de estos 1775 pb son 340 pb pudiéndose referir a solo una porción del marcador molecular *pqqCDE*. No obstante, no se supo que

porción de *pqqCDE* se encontró en ese 20%, por el tamaño de 340pb podría tratarse de la porción E que es pequeña.

Con todo y estos resultados, no se debe dar por hecho que exista esa producción de PQQ gracias a las dichas secuencias metagenómicas del marcador *pqqCDE*, habiendo solo un porcentaje de 20% del biomarcador en ellas (38), ya que estos, como lo dice en el artículo Puehringer, 2008; PQQ al tener un operón conservado como *pqqCDE*, tiene la necesidad de que exista este operón no solo para la biosíntesis de PQQ, sino para su producción o excreción al medio, por lo cual no podemos asegurar que exista la potencialidad de sintetizar PQQ en los géneros bacterianos que surgieron del análisis, sin antes tener más estudios que lo demuestren.

A pesar de lo mencionado anteriormente se construyeron y analizaron los árboles filogenéticos de los metagenomas obtenidos y se identificaron cambios en algunos géneros de bacterias. En esta identificación de bacterias del estudio existieron varias similitudes con los resultados de Morgan y Col, 2012 (46); donde en un análisis metagenómico en pacientes con EII se observó disminución de Bacteroidetes y un aumento significativo de los filos Gammaproteobacteria junto con otros filos como Clostridium, Betaproteobacteria y Alfacaproteobacteria. En nuestro estudio filogenético se encontraron Bacteroidetes uniformes en sanos, pero en los enfermos con Cuci se erradicaron, además de que hubo aparición de Betaproteobacterias las cuales suelen ser clasificadas como bacterias oportunistas y que se presentan cuando hay una disbiosis marcada y alguna infección aguda como lo menciona el autor Morgan.

A posteriori, dentro de la encuesta dirigida por la Dra. Julia Alatorre, se observó que a mayor consumo de ciertos alimentos fenólicos como: orégano, betabel, achiote, enfrijoladas, guayaba y epazote; se iba a tener mayor inadecuada consistencia en las heces (guayaba betabel achiote), mayor índice PUCAI el

cual refiere mayor actividad en la enfermedad (orégano), mayores deposiciones al día hubieron (betabel, huazontle, orégano, mole rojo). No existen estudios específicamente parecidos con la búsqueda de alimentos fenólicos en pacientes con EII para contrastar estos resultados, sin embargo, existe un estudio de Narula N. En el cual tomaron como sujetos del 2003 al 2016, a personas de 7 diferentes regiones geográficas como América del norte, Asia, Europa, África y América del sur, en el cual midieron el factor de riesgo de EII con hábitos alimenticios alto en comidas ultra procesadas y donde se observó un aumento de riesgo en los países donde las personas tenían mayor consumo de estos y algunos de los lugares geográficos más afectados con aparición de Cuci fue América del norte y América del sur (47). Sin embargo, ningún otro estudio habla del porqué estos alimentos pueden llegar a potencializar la actividad o si existe un cambio en la producción de metabolitos en el ambiente del bacterioma.

En la parte experimental no se observaron bandas de amplificación de ninguna muestra fecal tanto de sanos como de pacientes con Cuci, en un principio se podría creer que algún reactivo de PCR pudiera estar interfiriendo en esto, así que se hicieron cambios de reactivos y se usaron controles positivos para verificar que se estuviera amplificando de manera correcta. Se utilizaron como controles positivos a *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Klebsiella*, los cuales amplificaban de manera correcta el marcador molecular *pqqCDE*, dando el peso molecular muy cercano al predicho de manera *in silico*. Por lo tanto, se puede indicar que no hay ningún problema con la técnica de PCR, reactivos y condiciones de amplificación. En este experimento no se encontró un artículo con el cuál comparar los resultados e incluso determinar que tipo de falla específica se podría estar teniendo; por lo tanto, se tiene en cuenta un seguimiento del experimento para poder analizar cambios que pudieran dar algún resultado positivo con las amplificaciones.

Otra posibilidad de que no amplificase el marcador molecular *pqqCDE* en los DNA provenientes de muestras fecales es la mala calidad del DNA o la

presencia de inhibidores de la PCR, los cuales se ha reportado ser variados, como polisacáridos, metales, grupo hemo proveniente de sangre y otros. En este sentido, gracias a la encuesta realizada a los pacientes sabemos que la mayoría de los pacientes presenta hemorroides y sangrado esporádico. El sangrado en heces podría estar dejando rastros de metales en las muestras y estas pudieran estar evitando la amplificación y el correcto funcionamiento de la PCR ya que suelen inhibirla. Sin embargo, aun haciendo limpiezas en las muestras tampoco mostraron resultados positivos.

10. Conclusión

El objetivo principal de este estudio fue identificar y caracterizar el bacterioma potencialmente productor de pirroloquinolina quinona en pacientes con diagnóstico de colitis ulcerosa crónica inespecífica y en individuos aparentemente sanos; esto se logró gracias al estudio *in silico* con las secuencias metagenómicas y los árboles filogenéticos, en donde se pudo determinar que hay una diferencia entre el bacterioma productor de pirroloquinolina en individuos sanos y en pacientes con colitis ulcerosa crónica inespecífica presentando cambios significativos en la presencia de patógenos oportunistas y en la inexistencia de géneros bacteroidetes dentro del bacterioma de los pacientes con colitis ulcerosa crónica.

Mientras que el segundo objetivo del estudio se cumplió con la encuesta, donde se pudo relacionar a la enfermedad, los parámetros bioquímicos y la dieta; así como saber el consumo promedio de alimentos fenólicos. Indicando que el consumo de ciertos alimentos se relaciona con la activación de la enfermedad por medio de la aparición de síntomas como dolor abdominal, consistencia de las heces, cantidad de evacuaciones y gravedad de la enfermedad (puntuación de PUCAI).

Capítulo 3

11. Sesgos y limitantes:

Lamentablemente y como en todos los estudios, existen varios sesgos y limitantes en este estudio, ya que al ser un campo nuevo y no haber otras investigaciones para corroborar y tener como respaldo la existencia del bacterioma productor de pirroloquinolina quinona tanto en individuos sanos como en pacientes con colitis ulcerosa crónica inespecífica, no se puede determinar si este estudio cuenta con verosimilitud suficiente; aun cuando los resultados tienen similitud con los resultados de otros artículos como Morgan, 2012; el cual afirma en su estudio como en este, la disminución de ciertos filos bacterianos y la aparición de otros siendo patógenos en la disbiosis de las enfermedades inflamatorias del intestino. Sin embargo, en ese estudio no se fijaron los resultados al bacterioma productor de PQQ.

Otra limitante en el estudio es el número de muestras usadas para este estudio que fueron 11 con Cuci; cuando se realizó un cálculo para el tamaño de muestra tomando en cuenta el número de habitantes que hay en Puebla y la incidencia de Cuci el total de muestras que se necesitaba para tener un poder estadístico bueno era de 363 pacientes de Cuci, sin embargo, debido a que sólo se reclutaron pacientes del Hospital Universitario de Puebla, no se pudo alcanzar esa cifra, por lo tanto, para el seguimiento de este estudio y sus posibles reproducibilidades, se tiene planeado obtener convenio o contactos con más centros de salud para poder tener un poder estadístico suficiente.

Aun cuando se comprobó la eficacia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el marcador molecular *pqqCDE* con controles, es necesario probar otros oligonucleótidos diseñados para el mismo marcador molecular con la finalidad de poder abarcar un repertorio más grande de bacterias.

12. Fortalezas

Este estudio indica una potencial área de investigación donde PQQ y el bacterioma productor de PQQ pueden ser una variante más entre los individuos sanos y los que padecen Cuci para la activación o agravamiento de los síntomas causados por la enfermedad, además de eso, ahora se conoce un poco más de las características del bacterioma de esta enfermedad.

13.Perspectivas

Se debe tomar en cuenta, que gracias a este estudio se tiene planeado darle seguimiento con más trabajos similares y buscando más específicamente a las características del bacterioma e investigar acerca de las interacciones del bacterioma productor de pirroloquinolina quinona en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, ya que no se sabe si a causa de la probable extinción de los bacteroidetes en pacientes con Cuci, puede haber una correlación con el desarrollo o agravamiento de la enfermedad o si tiene que ver con un factor principal para el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino de los enfermos, aumentando problemas de salud a estos o agravando los síntomas y aumentando el índice de PUCAI.

Sin duda alguna, aún quedan muchas dudas por resolver en este nuevo campo de trabajo y que tiene muchas interrogantes alrededor de las enfermedades inflamatorias intestinales y el factor importante de la porroloquinolina quinona y su papel en la enfermedad.

14. Aportaciones y Beneficios

Este campo de investigación ayudara a la innovación y desarrollo para encontrar nuevos tratamientos de las enfermedades gastrointestinales, particularmente en Puebla y en el área metropolitana. Al ser un nuevo campo de estudio, se toma como parteaguas, que abrirá más temas de estudio a partir del bacterioma productor de PQQ, ya sea para los mecanismos de este o para la composición y regulación en los pacientes tanto con Cuci como con Crohn y saber si es beneficioso o perjudicador la existencia de este bacterioma en los pacientes.

15. Bibliografía:

1. Hooper L v., Midwett T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:283–307.
2. Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* [Internet]. 2017;152(2):327-339.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.012>
3. Piewngam P, de Mets F, Otto M. Intestinal microbiota: The hidden gems in the gut? *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020;38(4):215–24.
4. Goodwin PM, Anthony C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. Vol. 40, *Advances in Microbial Physiology.* 1998. 1–80 p.
5. Kataoka K. . GENERAL FEATURE OF HUMAN INTESTINAL MI-CROBIOTA The intestinal microbiota and its role in human health and disease. *The Journal of Medical Investigation.* 2016;63:2016.
6. Bringiotti R. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(4):550.
7. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):996–1047.
8. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (1979). 2005;307(5717):1915–20.
9. Frank DN, st. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13780–5.
10. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;15(10):630–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>
11. Gutin L, Piceno Y, Fadrosch D, Lynch K, Zydek M, Kassam Z, et al. Fecal microbiota transplant for Crohn disease: A study evaluating safety, efficacy, and microbiome profile. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(6):807–14.
12. Al-Bayati L, Fasaei BN, Merat S, Bahonar A. Longitudinal analyses of Gut-associated bacterial microbiota in ulcerative colitis patients. *Arch Iran Med.* 2018;21(12):578–84.
13. Moret I, Cerrillo E, Navarro-Puche A, Iborra M, Rausell F, Tortosa L, et al. Estrés oxidativo en la enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014;37(1):28–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2013.01.008>
14. Al-Bayati L, Fasaei BN, Merat S, Bahonar A. Longitudinal analyses of Gut-associated bacterial microbiota in ulcerative colitis patients. *Arch Iran Med.* 2018;21(12):578–84.

15. Zhong W, Lu X, Shi H, Zhao G, Song Y, Wang Y, et al. Distinct Microbial Populations Exist in the Mucosa-associated Microbiota of Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome and Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53(9):660–72.
16. Baumgart D, Sandborn W. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Gastroenterology*. 1982;18(3):379–87.
17. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015;12(4):205–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
18. Ciapponi A, Virgilio SA, Berrueta M, Soto NC, Ciganda A, Illanes MFR, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health databases, mathematical modelling and a case-series study. *PLoS One* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 Nov 13];15(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6984728/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32811111/)
19. Yamamoto-Furusho JK, Bosques-Padilla FJ, Charúa-Guindic L, Cortés-Espinosa T, Miranda-Cordero RM, Saez A, et al. Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Rev Gastroenterol Mex* [Internet]. 2020;85(3):246–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2019.07.008>
20. Bosques-Padilla FJ, Sandoval-García ER, Martínez-Vázquez MA, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ. Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Rev Gastroenterol Mex*. 2011;76(1):34–8.
21. Lustrì BC, Sperandio V, Moreira CG. Bacterial chat: Intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions. Vol. 85, *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology; 2017.
22. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 321–35.
23. Sun M, Du B, Shi Y, Lu Y, Zhou Y, Liu B. Combined signature of the fecal microbiome and plasma metabolome in patients with ulcerative colitis. *Medical Science Monitor*. 2019;25:3303–15.
24. Galazzo G, Tedjo DI, Wintjens DSJ, Savelkoul PHM, Masclee AAM, Bodelier AGL, et al. Faecal Microbiota Dynamics and their Relation to Disease Course in Crohn's Disease. *J Crohn's Colitis*. 2019;13(10):1273–82.
25. Tomasello G, Tralongo P, Damiani P, Sinagra E, di Trapani B, Zeenny MN, et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18121–30.
26. Pittayanon R, Lau JT, Leontiadis GI, Tse F, Yuan Y, Surette M, et al. Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Gastroenterology*. 2020 Mar 1;158(4):930-946.e1.
27. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D v., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9).

28. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):521–33.
29. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(10):573–84.
30. Sheehan D, Shanahan F. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(1):143–54.
31. Silva F, Gatica T, Pavez C. Etiología Y Fisiopatología De La Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2019;30(4):262–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2019.06.004>
32. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*. 2007;52(9):2015–21.
33. Tüzün A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bağcı S, Yeşilova Z, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem*. 2002;35(7):569–72.
34. Toyama H. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ). *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*. 2016;367–88.
35. Adachi; Schmid RD, Urlacher VB. *Modern biooxidation : enzymes, reactions and applications*. Wiley-VCH; 2007. 299 p.
36. Flores-Encarnación M, Sánchez-Cuevas M, Ortiz-Gutiérrez F. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Rev Latinoam Microbiol* (1958). 2004;46(1–2):47–59.
37. Misra HS, Khairnar NP, Barik A, Indira Priyadarsini K, Mohan H, Apte SK. Pyrroloquinoline-quinone: A reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Lett*. 2004;578(1–2):26–30.
38. Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: A structural approach. *BMC Biochem*. 2008;9(1).
39. Fenn K, Strandwitz P, Stewart EJ, Dimise E, Rubin S, Gurubacharya S, et al. Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*. 2017;5(1):161.
40. Friedman JE, Dobrinskikh E, Alfonso-Garcia A, Fast A, Janssen RC, Soderborg TK, et al. Pyrroloquinoline Quinone Prevents Developmental Programming of Microbial Dysbiosis and Macrophage Polarization to Attenuate Liver Fibrosis in Offspring of Obese Mice. 2018;
41. Misra HS, Khairnar NP, Barik A, Indira Priyadarsini K, Mohan H, Apte SK. Pyrroloquinoline-quinone: A reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Lett*. 2004 Dec 3;578(1–2):26–30.
42. Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A. *Reactive Oxygen Species-Induced Gastric Ulceration: Protection By Melatonin*. Vol. 13, *Current Medicinal Chemistry*. 2006.

43. Fenn K, Strandwitz P, Stewart EJ, Dimise E, Rubin S, Gurubacharya S, et al. Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*. 2017 Dec 20;5(1):161.
44. Naveed M. The Life History of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ): A Versatile Molecule with Novel Impacts on Living Systems. *International Journal of Molecular Biology*. 2016 Dec 28;1(1).
45. Wang W, Chen L, Zhou R, Wang X, Song L, Huang S, et al. Increased Proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. [cited 2023 Jan 5]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1128>
46. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D v, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment [Internet]. 2012. Available from: <http://genomebiology.com/2012/13/9/R79>
47. Narula N, Wong ECL, Dehghan M, Mente A, Rangarajan S, Lanan F, et al. Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: Prospective cohort study. *The BMJ*. 2021 Jul 14;374.

16. Anexos

16.1. Carta de consentimiento informado:

Puebla, D.F. a _____ de _____ de 202__

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

Identificación y Caracterización del bacterioma productor de pirroloquinona quinona en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Crohn y CUCI

Sede donde se realizará el estudio: Hospital Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Nombre del participante:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregara una copia firmada y fechada.

Su participación consistirá en donar una muestra de heces, además de proporcionar datos generales relevantes para la investigación.

Nombre	
Edad	
Padece enfermedad: si, no, ¿Cuál?	
Etapa de tratamiento	Recaída: Si No
¿Desea ser contactado en un futuro para conocer los resultados de la investigación?	

Dirección de correo electrónico	
Teléfono celular	

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal tiene una incidencia global de 0.1% a 0.2%, las cuales incluyen Enfermedad de Crohn y CUCI. En México se avistado un crecimiento en escala de la incidencia de estas enfermedades en estas últimas décadas. La etiología y patogénesis de la Enfermedad de Crohn y de la Colitis Ulcerosa Crónica inespecífica sigue siendo no muy clara. Hoy en día se asume que estas ocurren en individuos genéticamente susceptibles con una respuesta inmune aberrante y que es detonado también por factores en el medio ambiente. es de importancia conocer la relación entre la disbiosis y la inflamación de la patología y su desarrollo. Ya que es primordial para poder crear un nuevo campo de estudio en beneficio de estas patologías y de los pacientes, poder desarrollar posteriormente un pronóstico rápido, tratamiento temprano y tratar de evitar la progresión agresiva de estas.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Identificar los géneros Bacterianos productores de PQQ en individuos sanos y pacientes con enfermedades de Crohn y CUCI.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Los beneficios de este estudio no podrán observarse en el corto plazo. Se espera que después de que se realice más investigación en este tema, se pueda identificar algún tratamiento terapéutico para la enfermedad de Crohn y CUCI.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, y se tomará una muestra de heces como participante a modo que se lo indiquen durante su consulta médica.

Esta investigación representa un riesgo mínimo debido a que no es perjudicial para el participante ni invasivo.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de las siguientes fases:

La primera implica la toma de datos generales como edad, sexo, etapa de tratamiento, que representa un riesgo mínimo.

La siguiente fase implica la toma de muestra de heces que representa al igual un riesgo mínimo.

En caso de que usted desarrolle algún efecto secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Testigo

1

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la

normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador.

Fecha

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadores Responsables:

Dra. Cheryl Zilahy Diaz Barrientos Tel. 2(22) 35 89 322

Ing. Sandra Jessica Olivera Hernández Tel. (222) 46 34 826

16.2. Bioética:

Las personas que colaboren en esta investigación, tendrán garantía de respeto a los principios de autonomía, beneficencia y justicia, ya que se solicitará personalmente la participación consciente e informada de los derechohabientes invitados, formalizando la inclusión de estos últimos en el estudio, firmando una carta de consentimiento informado, dando entendido de que podrá retirarse del estudio en el momento que desee y si sus intereses así lo convienen.

Además, de mantener con los participantes, un clima de respeto y cordialidad durante el desarrollo del estudio, se mantendrá en el anonimato la identidad de dichos participantes y se pondrán a la disposición de estos últimos los datos obtenidos.

El estudio cumplirá y trabajará de acuerdo a las pautas de la declaración de Helsinki, el informe de Belmont y seguirá las normas de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-012-SSA3-2007, además de los comités locales de investigación del Hospital Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

16.3. Registro protocolo en BUAP y en HUP



BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 039 /2021
ASUNTO: CONSTANCIA DE REGISTRO

DRA. CHERYL ZILAHY DIAZ BARRIENTOS
DR. RICARDO CARREÑO LÓPEZ
SANDRA JESSICA OLIVERA HERNÁNDEZ

PRESENTES

El Comité de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **CONSTAR** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- SANDRA JESSICA OLIVERA HERNÁNDEZ
- DRA. CHERYL ZILAHY DIAZ BARRIENTOS
- DR. RICARDO CARREÑO LÓPEZ

Titulado:
"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BACTERIOMA PRODUCTOR DE PIRROLOQUINOLINA QUINONA EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN Y COLITIS ULCEROSA CRÓNICA INESPECÍFICA"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 13 de abril de 2021.
Número de Libro: 2
Número de Hoja: 150
Número de Registro: 885
Vigencia: Inicio 13 de abril 2021 Termina 31 de diciembre 2022

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., A 13 DE ABRIL DE 2021.


D.C. INDIANA D. TORRES ESCOBAR
DIRECTORA



D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
c.c.p. archivo
c.c.p. minutarío
DC'ETR'

Facultad de Medicina | 13 Sur 2702, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C.P. 72419
01 (222) 229 35 03
Ext. 8047 y 8678



COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACION DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE PUEBLA

Sandra Jessica Olivera Hernández
Maestría en Ciencias Médicas e Investigación
PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **"Identificación y caracterización del bacterioma productor de pirroloquinolina quinona en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa crónica inespecífica."**, que fue sometido a evaluación de este Comité de Investigación y Ética de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ético y de investigación, por lo que el dictamen es **AUTORIZADO**, con el número de registro Institucional:

No. de Registro

CEIHUP	2021/001
--------	----------

Sin más por el momento, quedo de Usted.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de 20 a 17 de mayo de 2021


Dra. Viviane Josephine Magillet Sánchez
Subdirectora de Enseñanza, Investigación y Capacitación en Salud

Cep. Archivos
D. Y.M./vive

Hospital
Universitario
de Puebla

25 Poniente 1301, Col. Volcanes
Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6200 y 6162

16.4. Lógica

Recursos humanos:

Participaran Estudiantes de la licenciatura de Medicina, un médico experto en el área, un investigador experto en el área y una estudiante de Maestría.

Recursos Materiales:

Se contará con las infraestructuras necesarias tanto en el Hospital Universitario de la BUAP y en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la BUAP.

Recursos Financieros:

Los recursos financieros para la identificación, caracterización, toma de muestra, extracción de DNA bacteriano, compra de iniciadores y compra de enzima de restricción, estarán sustentados por el Hospital Universitario de la BUAP y el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la BUAP.

16.5. Tabla de variables

<i>Variable</i>	<i>Conceptual</i>	<i>Operacional</i>	<i>Unidad de medición</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Instrumento de medición</i>
Variable Demográficas					
Edad	Tiempo que una persona ha vivido	Años de vida cumplidos al momento de la toma de expediente.	Años	Cuantitativa/Discreta	Historial clínico
Sexo	Condición orgánica que distingue a	Persona que se define a sí misma	Femenino/Masculino	Cualitativa/Dicotómica	Historial clínico

	un hombre de una mujer	como Femenino o masculino			
--	------------------------	---------------------------	--	--	--

<i>Variable</i>	<i>Conceptual</i>	<i>Operacional</i>	<i>Unidad de medición</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Instrumento de medición</i>
Variables Metabólicas					
Proteína C Reactiva (PCR)	Proteína plasmática circulante, que aumenta en respuesta inflamatoria	Proteína que aumenta si hay alguna inflamación del organismo	Alta y Normal	Cualitativa/ Dicotómica	Inmunoanálisis
Velocidad de sedimentación	Mide la distancia que recorren los glóbulos rojos en una hora al descender en un tubo de ensayo.	Puede revelar actividad inflamatoria en el organismo	Alta y Normal	Cualitativa/ Dicotómica	Tubo de sedimentación
Klebsiella	Genero de bacterias inmóviles, gram negativas, anaerobias facultativas	Géneros de bacterias productoras de pqq presentes	Presente/ausente Alta/normal	Cualitativa/Dicotómica	Termociclador/cultivo celular
Pseudomona	Organismos ubicuos, gram negativa, del grupo proteobacterias	Géneros de bacterias productoras de pqq presentes	Presente/ausente Alta/normal	Cualitativa/Dicotómica	Termociclador/cultivo celular

Serratia	Genero gram negativo pertenece a enterobacteriaceae	Géneros de bacterias productoras de pqq presentes	Presente/ausente Alta/normal	Cualitativa/Dicotómica	Termociclador/cultivo celular
bacteroidetes uniformes	bacterias gramnegativas en el tracto digestivo de los animales.	Géneros de bacterias productoras de pqq presentes	Presente/ausente Alta/normal	Cualitativa/Dicotómica	Termociclador/cultivo celular

<i>Variable</i>	<i>Conceptual</i>	<i>Operacional</i>	<i>Unidad de medición</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Instrumento de medición</i>
Variables Clínicas					
Colitis ulcerosa crónica inespecífica	Una inflamación continua de la mucosa del colon	Inflamación del colon en personas con diagnóstico de CUCI	Presente/ausente	Cualitativa/Dicotómica	Historial clínico
Grupo control	Personas aparentemente sanas	Personas que al realizar el historial clínico resultaron ser aparentemente sanos	Presente/ausente	Cualitativa/Dicotómica	Historial clínico

16.6. Descripción de la técnica de medición de las variables

16.6.1. Manual de toma de muestras fecales

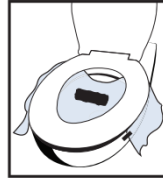


State of Illinois
Illinois Department of Public Health

Instrucciones para el paciente para muestra de heces Colección para el análisis de bacterias Usando un frasco de Cary Blair Vial

1. **Lávese las manos con agua y jabón** antes de iniciar la recolección de muestras de heces (o materia fecal).
2. Escriba el **nombre completo** del paciente, la fecha y hora de recolección de la muestra en la parte exterior del frasco de transporte. **Use letra de molde legible.**
3. Complete toda la información sobre la solicitud de prueba. **Use letra de molde legible. AVISO: El líquido rojo en el fondo del recipiente es venenoso. No beba ese líquido. Mantenga el recipiente fuera del alcance de los niños. En caso de ingestión, llame al médico inmediatamente. En caso de contacto del líquido con la piel o los ojos, enjuague con agua. Si la irritación persiste, consulte a un médico.**
4. **Para recoger una muestra de heces**, antes de usar el baño, levante la tapa del inodoro y coloque un pedazo de papel de cera o envoltura de plástico sobre la taza del inodoro que esté asegurado con cinta adhesiva para evitar que la muestra caiga

recolección de la muestra. Baje la tapa del inodoro y proceda a la expulsión de heces (muestra de heces). No expulse la muestra en el inodoro. **No se debe orinar en la muestra.** No pase (o expulse) la muestra directamente en el frasco.



6. Abra el envase; use la cuchara incorporada a la tapa del frasco para transferir pequeñas muestras de las áreas que aparecen con sangre, viscosas o acuosas. Si la muestra es sólida, tome muestras de los dos extremos y del centro. Continúe agregando las muestras hasta que el nivel del líquido llegue a la línea de llenado de color rojo.
7. Mezcle el contenido del frasco con la cuchara. No es necesario retirar la cuchara antes de volver a tapar el frasco.
8. Vuelva a tapar el frasco y asegúrese que la tapa esté bien cerrada. Agite el envase hasta que el contenido se mezcle bien.
9. Asegúrese de que el nombre de la persona y la fecha de la recolección se encuentren en la parte exterior del recipiente de la muestra.
10. Coloque el recipiente en la bolsa de plástico y ciérrela.
11. Coloque la bolsa de plástico sellada en una

plástico. Coloque esta bolsa en una bolsa de plástico. Cierre la bolsa de plástico con un lazo de torcedura y póngala en la basura.

13. **Lávese bien las manos con agua y jabón.**
14. Coloque el frasco de la muestra (envuelto en papel o en una bolsa de plástico) dentro del refrigerador hasta que la entregue al Departamento de Salud.
15. Entregue la bolsa con el frasco de la muestra tan pronto como sea posible dentro de las 24 horas de su recolección, a menos que se indique lo contrario, al siguiente establecimiento:

Nombre del establecimiento

Dirección _____

Teléfono _____

Horario _____

Para cualquier pregunta, por favor llame a:

Gracias por su tiempo y colaboración.

16.6.2. Extracción de DNA

Se siguieron los siguientes cambios en el procedimiento del kit de extracción; ya que esto ayuda a tener mejor eficiencia para el DNA de bacterias.

17. Se toma un raspado de 200mg de las heces (parte externa) y se deja en un tubo epenndorff en hielo.
18. Adiciona 1 ml de inhibitex
19. Se lleva a vortex por 5-10 segundos
20. Se incuba a 75°C por 10 min y luego a 95°C por otros 5 min
21. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto
22. Se le añade 15 ul de proteinasa K en un tubo nuevo
23. Se pipetea 200 ul de intermedio (sin nata)
24. Se adicionan 200 ul buffer de AL y se lleva a vortex por 15 seg

25. Se incubó por 70°C por 10 minutos y centrifugar, quitar sobrenadante
26. Adicionar 200 ul de etanol y mezclar, para después centrifugar
27. Agrega 600 ul de lisado a columna y centrifugar por 1 min
28. Adicionar 500 ul de buffer AW1 y centrifugar por 1 min
29. Adicionar 200 ul de AW2 y centrifugar por 3 minutos (Este paso se repite una vez más)
30. Eluir con 200 ul de buffer ATE e incubar 1 min en temperatura ambiente
31. Centrifugar 1 min y pasar a tubos finales

11.6.3. Electroforesis y buffer TAE 10x

1. Gel de electroforesis
2. Se tomaron .10g de agarosa grado molecular y se disolvieron en 90 ml de agua libre de RNAsas para tener un gel de agarosa al 1.5%.
3. Se dejó secar en la cámara de electroforesis con sus peines por 20 min
4. Posteriormente se tomó el buffer de TAE al 10x para llenar la cámara
5. Para la carga de muestras con el loading buffer (buffer de carga) se tomaron 0.5ul respectivamente.
6. La cámara de electroforesis se dejó correr por 20 a 30 min en cada corrida.

10x TAE buffer

Para la preparación de buffer TAE al 10x para la cámara de electroforesis se tomó una concentración de 1L de solución al 10x; donde se ocuparon 48.5 g de Tris, 11.4 mL de ácido actico glacial y 20 mL de EDTA a la 0.5 M con pH 8.0.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Disolver 127 gr de Tris en 50 mL de agua dionizada
2. Añadir ácido acético 5.7mL y EDTA 243gr
3. Añadir el agua dionizada hasta llegar a 100 mL
4. Resguarda a temperatura de ambiente

Se presenta a continuación una imagen de un ejemplo de cómo se verían los cortes de enzima:



15.6.3. Purificación de DNA

Para la purificación del DNA se usó acetato de Na a 3M con un pH de 5.5 e isopropanol, para las muestras que contenían 200ul se les adicionó 140ul de isopropanol y 20ul de acetato; mientras que para las muestras que tenían 100ul se les añadió 70ul de isopropanol y 10ul de acetato.

1. Adición de los 140 o 70ul dependiendo la cantidad de muestra en el tubo
2. Mezclar un poco con golpes suaves con un dedo al tubo
3. Centrifugación por 1 minuto a 12.3 rpm
4. Adición de isopropanol a la muestra
5. Sin mezclar, centrifugar por 1 min a 12.3 rpm
6. Decantar lentamente y sin llevarse el pellet que se encontrará en una esquina del tubo por la centrifugación
7. De ser necesario usar micropipeta para no llevarse los pellets a la hora de quitar el sobrenadante
8. Secar en incubación

15.7. Instrumentos de medición

Amplificación del marcador molecular

Se amplificó el marcador molecular *pqqCDE* mediante un par de oligonucleótidos específicos (siendo GGGTCGCCAACCGCTTCTACTATCA el iniciador y CTTCTAGTAGTCCGGGGTGACG para el reverso). Las muestras de DNA estuvieron en concentraciones de .20 ng/mg y .10 ng/mg; los oligonucleótidos en 50

pmol cada uno. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 3 min, 95°C por 1 min, 53.8°C por 45 segundos, 72°C por 2.5 min y 72°C por 5 min, todo esto se repitió por 40 ciclos y finalizó dejando los amplicones a 4°C para mantener las muestras estables. Esto se llevó a cabo en un termociclador marca Eppendorf.

La amplificación del marcador fue de la siguiente manera para todas las muestras:

1. 13.6 ul de agua libre de RNAsas
2. 2 ul de buffer
3. 1 ul de DNTPs
4. 1 ul de DNA (para todas las concentraciones)
5. 1 ul del primer reverse
6. 1 ul del primer forward
7. 0.4 ul de Taq Polimeraza

Nota: la Taq polimeraza siempre estuvo en rack de refrigeración según lo requerido para no aumentar su temperatura. En total se tomó en cuenta un volumen total en los tubos PCR de 20 ul.

Electroforesis:

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.7% voltaje constante 80 mvolts en buffer TAE Tris, acetato y EDTA 1X (Anexo 6). En las cámaras se realizaron los corridos de los amplicones obtenidos del termociclador; así como se visualizaron los cortes de restricción obtenidos. Estas imágenes de electroforesis tomadas desde un iluminador se encuentran mejor descritas detalladamente en los resultados.

Certificate of Completion

 **Sandra Jessica Olivera Hernandez_Tesis para firmas y sellos.pdf** 5c1d3246-8cfd-43b8-9558-69e640dc1732

SIGN REQUEST ISSUED:

Jan 31, 2023


08:28 PM UTC

REQUESTED BY:

IRMA ZAMORA GINEZ

mcmi.facmed@correo.buap.mx

STATUS:

 **Completed**

on 02 Feb, 2023, 06:34 PM UTC

Audit trail

Generated on Feb 2, 2023

31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has signed the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

187.212.38.26

31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has invited to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has invited to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**



31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has invited to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has invited to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

31 Jan, 2023, 08:36 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has invited to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

31 Jan, 2023, 09:36 PM UTC

Cheryl Zilahy Diaz Barrientos has signed the document

zilady.diaz@correo.buap.mx  **Verified**

200.68.170.33

31 Jan, 2023, 10:22 PM UTC

Maura Cardenas García has signed the document

maura.cardenas@correo.buap.mx  **Verified**

192.141.244.108



02 Feb, 2023, 04:46 AM UTC

Veronica Anuette Mayoral García has signed the document

veronica.mayoralg@correo.buap.mx  **Verified**

187.190.195.160

02 Feb, 2023, 06:01 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has sent reminder to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

02 Feb, 2023, 06:01 PM UTC

IRMA ZAMORA GINEZ has sent reminder to sign the document

mcmi.facmed@correo.buap.mx  **Verified**

02 Feb, 2023, 06:25 PM UTC

María Guadalupe Gonzalez Gonzalez has signed the document

mguadalupe_glez@hotmail.com  **Verified**

200.68.170.46



02 Feb, 2023, 06:34 PM UTC

Ricardo López Carreño has signed the document

tesistony@yahoo.com.mx  **Verified**

189.164.116.48

