



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

Facultad de Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOCCIDIANA DE UNA  
PROTEÍNA DE LA LEVADURA *Meyerozyma guilliermondii*

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**Marilú Mass Sánchez**

**DIRECTOR:**

**DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**JUNIO 2023**

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A mi tutor, el Dr. Edgar Dantán, quién me permitió ser parte de su equipo de trabajo; todo fue posible gracias a su paciencia y enseñanzas. Gracias infinitas por la confianza que me ha brindado, por siempre creer en mí y darme la oportunidad de seguir aprendiendo. Más que mi tutor, se ha convertido en un gran amigo y mentor.

A la Dra. Rosa Estela Quiroz y la Dra. María del Carmen Gutiérrez quienes me brindaron su apoyo siempre.

Agradezco especialmente a la Dra. Rosalba Salgado y a la M.C. Magdalena Hernández por su paciencia infinita y todo el apoyo que me brindaron para poder culminar esta etapa en mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Estudios Ecogenómicos quienes hicieron amena mi estadía en todo este tiempo, por los momentos, las enseñanzas y el apoyo que me brindó cada uno de ellos.

## **AGRADECIMIENTOS FAMILIARES**

Doy gracias a la vida por permitirme seguir hasta concluir esta meta a lado de las personas más importantes para mí.

Dedico este trabajo de forma especial a mi madre Blanca Estela Sánchez Cortés, que a pesar de los obstáculos hemos salido adelante y por la que hoy concluyo satisfactoriamente una meta muy importante en mi vida.

No tengo manera de agradecerte todo lo que me has dado. Gracias por estar siempre en todas mis locuras y decisiones. Te amo.

A mi abuela Ricarda Cortés quien con su amor y apoyo me impulsa a ser mejor persona cada día y a mi abuelo Alberto Sánchez quien fue una persona especial en mi vida y sé que estaría orgulloso de mí por haberlo logrado.

# ÍNDICE

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>I.</b>    | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>II.</b>   | <b>MARCO TEÓRICO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1.         | Producción de carne avícola.....   | 2         |
| 2.2.         | Coccidiosis en la industria avícola .....  | 4         |
| 2.3.         | Phylum Apicomplexa .....   | 5         |
| 2.4.         | Género <i>Eimeria</i> .....  | 7         |
| 2.5.         | Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> spp. ....  | 8         |
| 2.6.         | Alternativas contra la coccidiosis aviar.....  | 10        |
| 2.6.1.       | Vacunas: .....   | 10        |
| 2.6.2.       | Ionóforos: .....   | 11        |
| 2.6.3.       | Antioxidantes:.....  | 12        |
| 2.6.4.       | Aceites esenciales:.....   | 13        |
| 2.7.         | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> .....   | 14        |
| <b>III.</b>  | <b>ANTECEDENTES</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>IV.</b>   | <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>V.</b>    | <b>HIPÓTESIS</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>VI.</b>   | <b>OBJETIVO</b> .....  | <b>17</b> |
| 6.1.         | Objetivo general .....   | 17        |
| 6.2.         | Objetivos específicos.....   | 17        |
| <b>VII.</b>  | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>18</b> |
| 7.1.         | Mantenimiento de la cepa de <i>M. guilliermondii</i> .....   | 18        |
| 7.2.         | Obtención de las células de <i>M. guilliermondii</i> .....   | 18        |
| 7.3.         | Lisis celular y cuantificación de proteínas .....  | 19        |
| 7.4.         | Precipitación de la fracción soluble con acetona al 40% .....  | 19        |
| 7.5.         | SDS-PAGE .....   | 20        |
| 7.6.         | Bioensayos.....  | 21        |
| 7.7.         | Precipitación con sulfato de amonio .....  | 21        |
| <b>VIII.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>24</b> |
| 8.1.         | Cuantificación de las proteínas de la fracción soluble y la pastilla precipitada al 40% y SDS-PAGE.....                          | 24        |
| 8.2.         | Precipitación con Sulfato de Amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 40% y 80% y realización de SDS-PAGE ..... | 26        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 8.3.        | Bioensayos para corroborar la actividad anticoccidiana de las fracciones del 40 y 80% de sulfato de amonio..... | 28        |
| 8.4.        | Precipitación con sulfato de amonio al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%, SDS-PAGE y bioensayos.....                    | 29        |
| 8.5.        | Gel de poliacrilamida y bioensayo de las muestras concentradas.....   | 33        |
| 8.6.        | Análisis de espectrómetro de masas MS/MS.....   | 36        |
| 8.7.        | Posibles candidatos responsables de la actividad anticoccidiana.....  | 37        |
| <b>IX.</b>  | <b>DISCUSIÓN.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>X.</b>   | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>XI.</b>  | <b>PERSPECTIVAS.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>XII.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>50</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estados Productores de Pollo. Indicadores económicos. Tomado de Unión Nacional de Avicultores (2018). .....  | 3  |
| Figura 2. Dibujo esquemático de un ooquiste coccidiano típico. ....  | 6  |
| Figura 3. Localización de las partes del intestino que parasita Eimeria en el ave. Tomado de Selecciones Avícolas (2014). ....   | 8  |
| Figura 4. Un ciclo de vida generalizado para parásitos del género Eimeria. Tomado y modificado de Blake y Tomley, 2014. ....   | 10 |
| Figura 5. Comparación de las actividades anticoccidiales del cultivo completo de M. guilliermondii 01 .....  | 15 |
| Figura 6. Bioensayos realizados con digestión de tripsina. Tomado de Rodríguez, 2017. ....   | 16 |
| Figura 7. Bioensayo de pastilla precipitada con acetona al 40% y cultivo de M. guilliermondii como control positivo .....  | 26 |
| Figura 8. Comparación de las fracciones precipitadas con acetona y sulfato de amonio en gel de poliacrilamida. ....  | 27 |
| Figura 9. Bioensayo realizado con la pastilla precipitada en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40 y 80% utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS al 1x..... | 28 |
| Figura 10. Gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.....  | 30 |
| Figura 11. Bioensayo realizado con 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS 1x...               | 32 |
| Figura 12. Comparación de las fracciones precipitadas en gel de poliacrilamida. Carril 1: MP. Carril 2: P40%. Carril 3: PSA 40%. Carril 4: PSA1. Carril 5: PSA2...           | 34 |
| Figura 13. Bioensayos de la actividad anticoccidiana de la fracción centrifugada con amicones de 50 kDa. ....  | 35 |
| Figura 14. SDS-PAGE del contenido total de proteínas de la muestra analizada por espectrometría de masas. ....   | 36 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Avance mensual de la producción pecuaria (2018). Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Tomada y modificada de SIAP <a href="http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp">http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp</a> ..... | 3  |
| Tabla 2. Concentración de la Precipitación de la pastilla al 40% de acetona y fracción soluble .....   | 25 |
| Tabla 3. Cuantificación de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio en distintos porcentajes.....   | 29 |
| Tabla 4. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....  | 33 |
| Tabla 5. Posibles candidatos seleccionados por abundancia responsables de la actividad anticoccidiana. ....  | 38 |
| Tabla 6. Posibles candidatas responsables de la actividad anticoccidiana de acuerdo con su función. ....   | 42 |

## I. INTRODUCCIÓN

En México, la industria avícola juega un papel importante ya que las personas incluyen en su dieta carne de pollo con frecuencia, esto se debe al fácil acceso en alimentos por ser un producto que se puede encontrar a bajo costo.

No obstante, la industria avícola se ve afectada por problemas económicos causados por enfermedades de gran importancia, una de ellas es la coccidiosis aviar, afectando el desarrollo del ave y por ende la producción acelerada de carne.

La coccidiosis aviar es una enfermedad causada por parásitos del género *Eimeria*, ocasionando en el ave daños en el epitelio intestinal, pérdida de nutrientes y peso corporal, pero solo en casos extremos causa mortalidad. Esta enfermedad se ha tratado de controlar con diferentes agentes anticoccidiales tales como, ionóforos, extractos naturales, vacunas, entre otros (Abbas *et al.*, 2019), (Fatoba & Adeleke, 2018).

Sin embargo, todos estos métodos no aseguran efectividad completa contra la infección por estos parásitos, ya que corren el riesgo de causar regresión de patogenicidad además de que pueden estar fuera del alcance de los productores por los elevados costos. Es por esto, que se siguen buscando alternativas eficientes y económicas para reducir las pérdidas significativas para los productores.

En el Centro de Investigaciones en Biotecnología (CeIB), se aisló de una vacuna comercial una levadura que posee actividad anticoccidiana en contra del



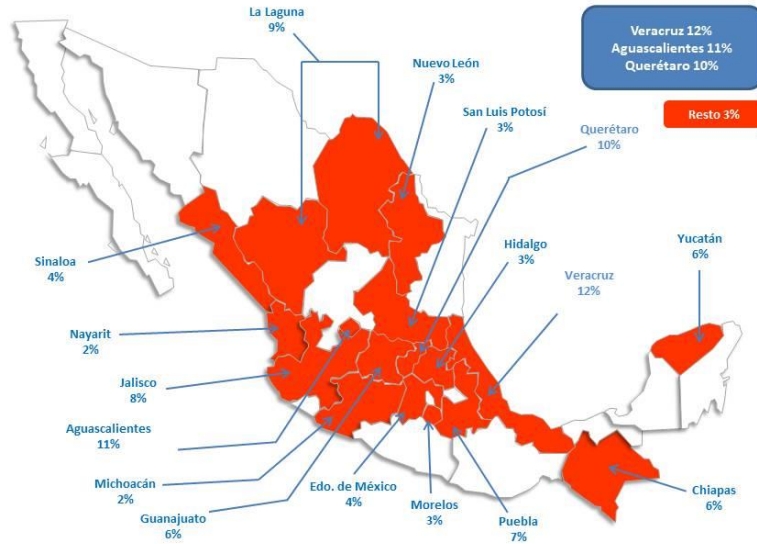
protozoario responsable de la coccidiosis, identificada como *Meyerozyma guilliermondii* (Dantán-González *et al.*, 2015). Esta levadura secreta una proteína que daña la pared del ooquiste, la estructura más resistente del protozoario (Sabina *et al.* 2006) importante para continuar con el proceso de infección.

En este estudio se pretende identificar y caracterizar la proteína de la levadura *M. guilliermondii* responsable de la actividad anticoccidiana.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Producción de carne avícola**

Se estima que en la década actual la producción de carne de pollo a nivel nacional ha crecido ininterrumpidamente, pudiendo observar este aumento cada año desde el 2006. Esta perspectiva es favorable para seguir con el aumento en los próximos años. La participación de la avicultura en la producción pecuaria en el año 2015 fue del 63 %, siendo el 34 % la cantidad neta de carne de pollo, superando la producción de otros productos pecuarios como la carne de res con un 20 %, y de cerdo con el 14 %. (Panorama agroalimentario, 2016). En la figura 1 podemos observar los estados con mayor producción de carne de pollo, entre ellos Veracruz, Aguascalientes y Querétaro.



**Figura 1.** Estados Productores de Pollo. Indicadores económicos. Tomado de Unión Nacional de Avicultores (2018).

<http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>

**Tabla 1.** Avance mensual de la producción pecuaria (2018). Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Tomada y modificada de SIAP [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecResumen.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp)

| PESO EN TONELADAS |         |         |         |
|-------------------|---------|---------|---------|
| Producto/especie  | ENERO   | FEBRERO | TOTAL   |
| <b>BOVINO</b>     | 156,736 | 158,493 | 315,229 |
| <b>PORCINO</b>    | 119,191 | 119,308 | 238,499 |
| <b>OVINO</b>      | 4,903   | 4,865   | 9,768   |
| <b>CAPRINO</b>    | 3,153   | 3,129   | 6,281   |
| <b>AVE</b>        | 259,054 | 262,320 | 521,374 |

Entre los meses enero-febrero del año 2018, la producción de carne de bovino y ave incrementó en comparación de los demás productos de carne donde su aumento es mínimo demostrando que la industria avícola sigue teniendo prioridad de consumo (Tabla 1).

De esta manera, se observa que la producción masiva de carne de pollo aumenta considerablemente, pero no todo marcha de manera adecuada ya que la producción se ve afectada por agentes infecciosos que dañan a el ave en las camas aviares.

## **2.2. Coccidiosis en la industria avícola**

Una de las enfermedades de gran importancia en la industria avícola es la coccidiosis aviar. Se considera un problema grave para los productores a nivel mundial, debido a los altos costos en los tratamientos para el control y prevención de la enfermedad.

Una de las principales causas del bajo rendimiento que confiere esta enfermedad en la producción avícola, se asocia al poco espacio de crianza en el que conviven las aves, propiciando que la enfermedad se propague de manera acelerada. Debido a que todas están susceptibles a esta enfermedad, se ha tratado de generar un control mediante una cuidadosa crianza acompañada de medicamentos anticoccidiales por medio de vacunas atenuadas y vivas (Blake & Tomley, 2014).

Sin embargo, aún existen brotes de coccidiosis y la transmisión de enfermedades por vía fecal/oral, siendo comunes debido a la resistencia generada a los medicamentos y las condiciones intensivas de cría donde las aves están expuestas continuamente.

Las pérdidas anuales económicas que se estiman en la industria al año a causa de la coccidiosis son de aproximadamente \$ 2.4 millones, esto incluye pérdidas de producción y gastos de los tratamientos para enfermedades (Dantán-González *et al.*, 2015).

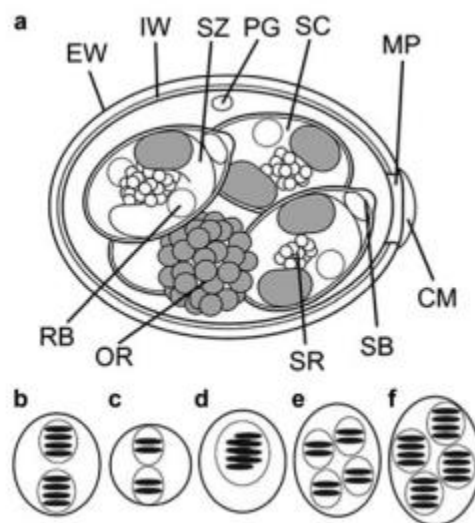
La coccidiosis aviar es originada por parásitos del género *Eimeria* que afectan diferentes sitios del intestino, así como el estado inmunitario del huésped (Das *et al.*, 2021)

Las infecciones por *Eimeria* se pueden propiciar debido al poco espacio de crianza e incluyen disminución en la absorción de nutrientes, por ende, supresión de la respuesta inmunitaria, disminución en la producción de huevos, diarrea acompañada con sangrado y en casos no tan evidentes puede causar la muerte (Lee *et al.* 2020).

### **2.3. Phylum Apicomplexa**

Es importante mencionar al filo Apicomplexa ya que los coccidios son parásitos eucariotas pertenecientes a éste, siendo patógenos intracelulares que infectan a grandes grupos de vertebrados, así como a humanos (Wallach *et al.*, 2012)

Los parásitos de este filo son organismos unicelulares que se caracterizan por poseer un complejo apical, característica peculiar que distingue a todos sus miembros. Este complejo tiene rhoptries, micronemas, gránulos densos y estructuras asociadas al citoesqueleto: conoide, anillos polares, apicales y protuberancias microtubulares (figura 2), que, además, ayudan al parásito a adherirse a las células epiteliales del intestino del ave (Mercier *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Dibujo esquemático de un ooquiste coccidiano típico.

*Eimeria* (a) CM capa del micropilo, IW pared interna del ooquiste, EW pared externa del ooquiste, MP micropilo, OR residuo del ooquiiste, PG granulo polar, SB cuerpo de Stieda, SC esporocisto, SR residuo del esporocisto, SZ esporozoito, RB esporozoito cuerpo refráctil. Se muestran varios tipos de organización interna de los ooquistes: (b) *Isospora* (dos esporocistos, cada uno con 4 esporozoítos), (c) *Glycospora* (dos esporocistos, cada uno con dos esporozoítos), (d) *Caryospora* (único esporocisto que contiene ocho esporozoítos) (e) *Eimeria* (cuatro esporocistos, cada uno con dos esporozoítos) (f) *Wenyonella* (cuatro esporocistos, cada uno con cuatro esporozoítos). Tomada de *Apicomplexa*, *Votycka et, al.* (2016).

Este filo incluye a los géneros: *Eimeria*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis*, siendo cada uno parásitos específicos para las especies de vertebrados a las que infectan (Bacciu *et al.*, 2014).

#### **2.4. Género *Eimeria***


















El parásito causante de la coccidiosis aviar está clasificado como *Eimeria* spp. Es un grupo de protozoarios parásitos específico de hospedero que se multiplica en el intestino ocasionando daños en el tejido epitelial interrumpiendo la absorción de los nutrientes, deshidratación, diarrea y en casos extremos mortalidad. Actualmente la taxonomía de *Eimeria* forma parte de la siguiente clasificación: clase Sporozoasida, subclase Coccidiosina, orden Eucoccidiorida, suborden Eimeriodina, familia Eimeriidae, géneros *Eimeria* e *Isospora*.

*Eimeria* entra al hospedero penetrando las células epiteliales del tracto intestinal gracias a la adhesión por medio del complejo apical causando cambios en la morfología del intestino (Yuño & Gorgoza, 2008). Se han reportado nueve especies de *Eimeria* causantes de la coccidiosis aviar, de las cuales solo cinco especies se consideran levemente patógenas: *E. acervulina*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox* y *E. hagani* (Dantán-González *et al.*, 2015). Las especies de *Eimeria* que se reportan como altamente patógenas son *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella* (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015).

Sin embargo, se ha reportado que siete especies son las más comunes y específicamente responsables de la coccidiosis: *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. tenella*,

*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* y *E. praecox* (Dantán-González *et al.*, 2015)

Cada una ataca a diferentes sitios en el intestino del ave (figura 3).

| CARACTERES               | <i>E. acervulina</i>  | <i>E. nivati</i>  | <i>E. maxima</i>  | <i>E. necatrix</i>  | <i>E. brunetti</i>  | <i>E. tenella</i>  | <i>E. praecox</i>   | <i>E. mitis</i>   | <i>E. hagani</i>  |
|--------------------------|---|---|---|---|---|--|---|---|---|
| ÁREA PARASITADA          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| MICRAS                   | 10 20 30  | 10 20 30  | 10 20 30  | 10 20 30  | 10 20 30  | 10 20 30   | 10 20 30  | 10 20 30  | no disponible   |
| ASPECTO DE LOS OOQUISTES |  |  |  |  |  |  |  |  | no disponible   |

**Figura 3.** Localización de las partes del intestino que parasita *Eimeria* en el ave. Tomado de Selecciones Avícolas (2014).

<http://seleccionesavicolas.com/avicultura/2014/02/coccidiosis-la-enfermedad-consecuencias-y-tratamiento>

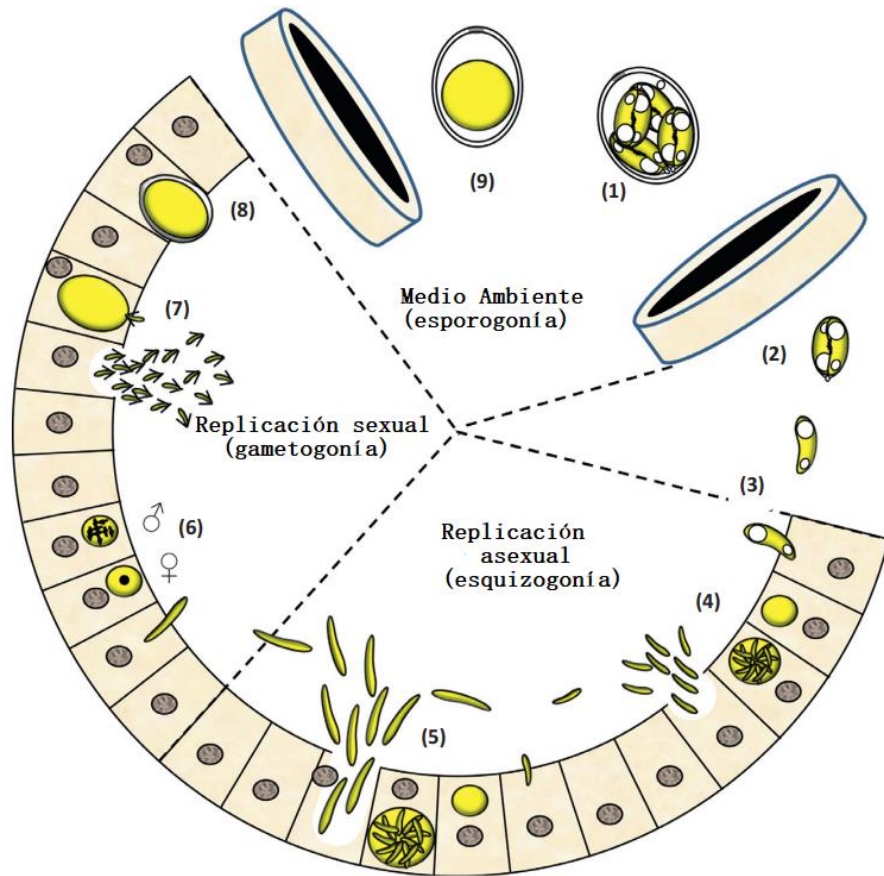
## 2.5. Ciclo de vida de *Eimeria* spp.

Como todos los Apicomplexanos, los Eimerianos tienen un ciclo de vida complejo (figura 4) caracterizado por divisiones asexuales y sexuales.

El ciclo de vida de *Eimeria* implica tres fases: la primera es la esporulación (esporogonía) ésta es la fase infecciosa ya que el ooquiste está esporulado y listo para la reproducción. Una vez que el ooquiste haya entrado al huésped se realiza la segunda fase que es esquizogonía, donde se lleva a cabo la reproducción asexual, a esta fase también se le conoce como merogonía. En *Eimeria* hay un número determinado de rondas de reproducción asexual (merogonía) que varía según la especie, aunque normalmente pueden ser tres o cuatro rondas en donde el parásito se multiplica en el intestino, dando lugar a la tercer fase que es

gametogonía, donde se producen los macrogametos y microgametos a partir de gametocitos, la fertilización de estos produce cigotos diploides llevando a cabo la meiosis formando el cigoto el cual se convierte en ooquiste pero no esporulado (Walker *et al.*, 2013). Para que la esporulación se lleve a cabo, el ooquiste debe tener las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y pH, posteriormente ocurre una división meiótica y mitótica que da como resultado la formación de cuatro esporoquistes, después, se produce la división mitótica dentro de los esporocistos que dan lugar a los merozoitos haploides. Después de la división meiótica en el ooquiste, todas las etapas en el ciclo de vida son haploides. La división mitótica que ocurre dentro del esquizonte da como resultado la formación de merozoitos haploides genéticamente idénticos (Chapman & Jeffers, 2014).





**Figura 4.** Un ciclo de vida generalizado para parásitos del género Eimeria. Tomado y modificado de Blake y Tomley, 2014.

## 2.6. Alternativas contra la coccidiosis aviar

Se han desarrollado fármacos anticoccidiales y coccidiostáticos de origen natural y químico como respuesta urgente para el control de la enfermedad. Los más comunes son los siguientes:

### 2.6.1. Vacunas:

Hay diferentes vacunas disponibles en el mercado, incluyendo vacunas virulentas, vacunas vivas atenuadas y vacunas de subunidades. Las vacunas virulentas no tienen ninguna alteración en su patogenicidad. Sin embargo, se corre el riesgo de

comprometer a la parvada si no son suministradas de forma correcta perpetuando infecciones posteriores (Peek, 2010).

El objetivo de las vacunas vivas atenuadas es disminuir la patogenicidad del parásito utilizando distintos métodos de atenuación como la selección por precocidad donde se eliminan una o más esquizogonias, dando lugar a un menor daño en el tracto intestinal, así como una menor producción de ooquistes conservando la inmunogenicidad (Jeffers, 1975). Pero cuenta con algunas desventajas como propagación de la enfermedad o regresión de patogenicidad haciéndolo un método poco favorable (Oz, 2017).

Hoy en día también existen vacunas de subunidades recombinantes, éstas se basan en la identificación de antígenos o genes responsables de la inmunidad protectora, la desventaja radica en la dificultad que confiere identificar estas moléculas (Blake *et al.*, 2017).

### **2.6.2. Ionóforos:**

Los ionóforos son antimicrobianos polietéres que forman complejos con cationes reversibles y liposolubles que facilitan el transporte iónico de las membranas. Estos se producen por la fermentación de *Streptomyces* spp.

Existen dos subclases de agentes ionóforos:

- Neutros: Altamente tóxicos por formar complejos catiónicos capaces de perturbar las membranas biológicas y potenciales de acción.

- Carboxílicos: Que forman con complejos zwitteriónicos promoviendo la difusión de intercambio catiónico neutro que es tolerado mejor por los organismos. Esta subclase es la utilizada como alternativa contra la coccidiosis aviar (Martínez-larrañaga, 1990).

La eficacia de estos fármacos depende de la exposición extracelular de los estadios del parásito provocando modificaciones iónicas y posteriormente la muerte celular. A pesar de esto, el uso de los ionóforos tiene desventajas, como la depresión que produce en el consumo de alimento ocasionando la pérdida de peso del ave (Zavala, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que el parásito puede desarrollar inmunidad (Jeffers, 2013). En los últimos años se observó resistencia en cepas de *E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella*, ante drogas del grupo de estos antibióticos (Yuño & Gorgoza, 2008), haciendo que el uso de esta alternativa sea poco rentable.

### **2.6.3. Antioxidantes:**

Normalmente el metabolismo genera radicales libres en menor concentración para llevar los procesos fisiológicos, pero cuando en las células hay una acumulación de estos radicales libres, los procesos fisiológicos se alteran. Cuando sucede esto a nivel celular y tisular el sistema de defensa antioxidante se encarga de controlarlos (Abdel-Tawab *et al.*, 2020). Pero a veces puede que los mecanismos de defensa no sean suficientes por la generación excesiva de radicales libres y es

en ese momento cuando aparecen síntomas clínicos de las enfermedades agravando la situación. Los antioxidantes en la industria avícola pueden ayudar a reducir el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y los efectos citotóxicos provocados por la concentración de los radicales libres (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015). Los tocoferoles y fenoles han presentado propiedades antibacterianas, coccidiostáticas, antihelmínticas, antivirales y antiinflamatorias, sobresaliendo entre éstas, la actividad antioxidante (Verano, 2011). Siendo útiles para prevenir o limitar los efectos de la infección por coccidiosis.

#### **2.6.4. Aceites esenciales:**

Los aceites esenciales están compuestos por hidrocarburos cíclicos y sus derivados que contienen componentes activos responsables de la actividad anticoccidiana y sus derivados.

Algunos ejemplos de estos aceites esenciales son: Tomillo (*Thymus*), Clavo (*Syzygium aromaticum*), Artemisia (*Artemisia vulgaris*), Ajo de sociedad (*Tulbaghia violácea*), el cual ha presentado actividad anticoccidiana en la pared oquistica.

A pesar de presentan actividad anticoccidiana contra *Eimeria* spp pueden ser una alternativa como coccidiostaticos y no como anticoccidiales debido a la toxicidad, eficacia deficiente de la dosis y su escaza respuesta protectora en comparación con los coccidiostaticos químicos. También imparte efectos citotóxicos en los animales utilizados para la experimentación dañando las membranas celulares y estructuras de la pared celular, además de ser costosos en su elaboración (Idris *et al.*, 2016).

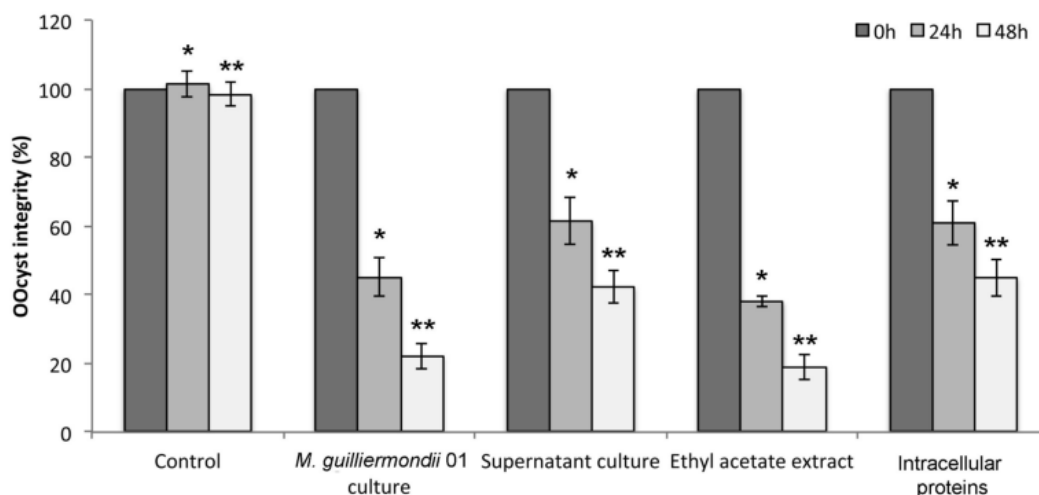
## **2.7. *Meyerozyma guilliermondii***

*M. guilliermondii* pertenece al clado Saccharomycotina (de Marco *et al.*, 2018). Está presente en la microflora de la piel en humanos sanos, en muestras clínicas y en el ambiente además de ser ampliamente estudiado por su importancia clínica, biotecnológica, y por poseer un gran potencial para control biológico (Papon *et al.*, 2013), (Romi *et al.*, 2014). También, el género *Meyerozyma* representa un recurso microbiano utilizado en fermentación, biocontrol y producción de biocombustible (Petersson, 1995). Además, esta levadura se encuentra en diferentes ambientes como en bebidas y comidas fermentadas. De igual forma, se ha comprobado que *M. guilliermondii* posee un efecto inhibitorio en la germinación de las esporas del hongo patógeno del arroz *Magnaporthe oryzae* (Zhao *et al.*, 2010). Recientemente se comprobó que una cepa de *M. guilliermondii* posee actividad anticoccidiana sobre los ooquistes de *Eimeria spp* (Dantán-González *et al.*, 2015).

### **III. ANTECEDENTES**

En el laboratorio de estudios ecogenómicos del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la UAEM, se aisló una levadura proveniente de una vacuna anticoccidial identificada como *Meyerozyma guilliermondii*, posteriormente se evaluó la actividad con bioensayos *in vivo* con ooquistes obtenidos de una suspensión vacunal (Autocox) que contiene algunas de las especies causantes de la coccidiosis aviar (*E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella* y *E. praecox*), para determinar el daño ocasionado (Dantán-González *et al.*, 2015). Esta levadura

presentó actividad anticoccidiana en el cultivo, el sobrenadante del medio de cultivo, así como en el extracto del sobrenadante y en la fracción soluble intracelular (figura 5).

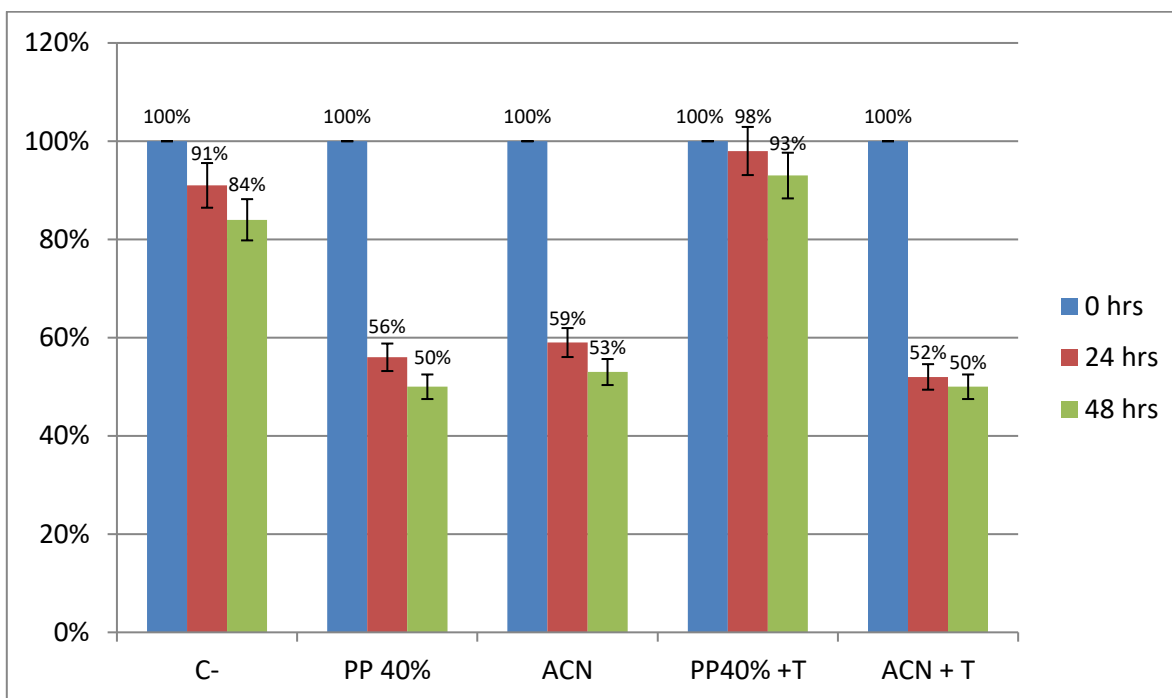


**Figura 5.** Comparación de las actividades anticoccidiales del cultivo completo de *M. guilliermondii* 01

El sobrenadante del cultivo, el extracto de acetato de etilo y las proteínas intracelulares sobre el ooquiste de *E. tenella*. Después de 48 h, se observó el daño más grave de la pared del ooquiste en los bioensayos con el cultivo de *M. guilliermondii* 01 y el extracto de acetato de etilo que mostraban 22.16 y 18.90% de integridad inicial, respectivamente. Las proteínas intracelulares de *M. guilliermondii* 01 y el cultivo del sobrenadante también mostraron una actividad anticoccidial sustancial, con 45 y 42.40% de integridad inicial después de 48 h, respectivamente. Este resultado sugiere que la actividad anticoccidial está relacionada con un producto excretado y también con un compuesto intracelular. Las diferencias significativas entre los tratamientos y el control a las 24 h se muestran con un asterisco y las diferencias significativas entre los tratamientos y el control a las 48 h se muestran con doble asterisco (umbral de significación,  $P < 0,05$ ). Tomado de Dantán y colaboradores (2015).

El daño causado fue en la pared del ooquiste, la parte más resistente del protozooario, reduciendo así la probabilidad de infección. Se ha demostrado que la causa de la actividad en la fracción intracelular se debe a un componente de

naturaleza proteica. Esto se demostró por medio de ensayos realizados con muestra de la fracción intracelular tratados con tripsina, mostrando pérdida de la actividad anticoccidiana de hasta 50% (figura 6).



**Figura 6.** Bioensayos realizados con digestión de tripsina. Tomado de Rodríguez, 2017.

La actividad anticoccidiana se presentó desde los 50 µg de proteína. El enfoque del siguiente trabajo será el estudio de la actividad causada por la molécula de origen proteico, así como determinar y caracterizar la molécula responsable de dicha actividad.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El intentar combatir la coccidiosis aviar se ha vuelto un reto ya que los avicultores al intentar proteger su producción han abusado de los anticoccidiales del mercado

generando la resistencia de algunas cepas, además, tienen un costo elevado y las pérdidas son significativas. Es por esto que se buscan métodos naturales a través de *M. guilliermondii* utilizando las moléculas de origen proteico con actividad anticoccidiana, considerándose como una nueva alternativa de bajo costo que tenga la eficacia correcta para atacar al parasito desde su estructura más resistente.

## **V. HIPÓTESIS**

La purificación de la proteína con actividad anticoccidiana de *Meyerozyma guilliermondii* permitirá realizar la identificación y caracterización de esta molécula.

## **VI. OBJETIVO**

Identificar y caracterizar una proteína de *Meyerozyma guilliermondii* con actividad anticoccidiana.

### **6.1. Objetivo general**

Caracterizar e identificar una proteína de *Meyerozyma guilliermondii* con actividad anticoccidiana.

### **6.2. Objetivos específicos**

- A.** Identificar la proteína de la levadura *Meyerozyma guilliermondii* responsable de la actividad anticoccidiana.



- B. Caracterizar la proteína purificada de la levadura *Meyerozyma guilliermondii* causante de la actividad anticoccidiana.
- C. Determinar la CL50 de la proteína con actividad anticoccidiana.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Mantenimiento de la cepa de *M. guilliermondii*

Para el estudio del presente trabajo, se utilizó la cepa aislada por Dantán *et. al.* 2015. Esta cepa fue inoculada en medio YPD sólido (compuesto por agar bacteriológico, peptona, dextrosa y extracto de levadura) incubada a 37°C por 16 horas para posteriormente conservarlas a -4 °C en el mismo medio para su uso en periodos cortos.

### 7.2. Obtención de las células de *M. guilliermondii*

Para la obtención de las células de la cepa en estudio se inocularon 4 matraces de 1 litro con 500 ml de medio YPD (Yest extract Peptone Dextrose), el medio de cultivo se preparó con 10 g. de dextrosa, 10 g. De peptona y 5 g. de extracto de levadura. La levadura se incubó en dicho medio a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, en una centrifuga refrigerada marca Beckman Coulter, Avanti J-26 S XPI con un rotor JA-10 a 17 700 xg durante 15 minutos a 4 °C se obtuvo la pastilla celular y se retiró el sobrenadante. Para retirar restos del medio de cultivo se realizaron dos lavados con acetona y se centrifugó en las mismas condiciones. La pastilla precipitada previamente lavada, se resuspendió en PBS 1x a pH 7.

### **7.3. Lisis celular y cuantificación de proteínas**

Para la obtención de las proteínas intracelulares se utilizó un protocolo de sonicación conocido (Dunn & Wobbe, 1993). La lisis celular se llevó a cabo con un sonicador marca Sonics Vibracell con pulsaciones de 20 s “on” y 40 s “off” durante 10 ciclos. Esto se realizó con hielo, tratando de no elevar la temperatura de la pastilla celular resuspendida. Posteriormente se centrifugó a una temperatura de 4 °C durante 15 minutos a 75 600 xg rpm. en un rotor JA-25.50

La concentración de proteínas se cuantificó utilizando NanoDrop 2000 Thermo scientific usando el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **7.4. Precipitación de la fracción soluble con acetona al 40%**

Para provocar la precipitación de las proteínas necesitamos un solvente que disminuya la constante dieléctrica. Los solventes orgánicos interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación, desplazando algunas moléculas asociadas a las proteínas y reduciendo la presencia de otras en la misma solución. Rodríguez, 2017 realizó la precipitación de estas proteínas en distintos volúmenes (20%, 40%, 60% y 80%), obteniendo como resultado una actividad mayor en la precipitación de las proteínas con acetona al 40 %, incubando a –20 °C durante por lo menos 60 minutos.

La fracción de las proteínas precipitadas en un volumen 3:2 de la fracción soluble intracelular en acetona se centrifugó nuevamente a 75 600 xg durante 15 minutos

a 4 °C. La pastilla celular se lavó con acetona al mismo volumen para eliminar sales y se centrifugo en las mismas condiciones para posteriormente dejar secar a temperatura ambiente.

Se resuspendió la pastilla celular en PBS al 1x con un pH de 7 a 7.5 para posteriormente cuantificar proteína por el método de Bradford (Thermo Fisher) y realizar bioensayos para corroborar la actividad de la proteína de interés.

## **7.5. SDS-PAGE**

Se realizó electroforesis con geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) al 12% para ello se agregó buffer Laemmli (1970) en una relación 1:1 en cada una de las muestras. Dicho buffer está compuesto por SDS al 4% para desnaturizar las proteínas y subunidades dando carga negativa en general, glicerol al 20% que aumenta la densidad de la muestra, 2-mercaptoetanol al 10% que reduce los enlaces disulfuro intra e intermoleculares, azul de bromofenol al 0.004% el cual tiñe a las proteínas haciendolas visibles durante la carga y trix HCl 0.125 M, pH 6.8 Esto se realizó en una cámara de electroforesis a voltaje constante de 120 V durante 2 horas. El marcador de peso molecular empleado fue PageRule™ Protein Ladder (de 10 a 250 kDa) (Thermo Fisher).

## 7.6. Bioensayos

Se realizaron conteos de los ooquistes que no presentaban alguna alteración en su pared celular en una cámara de Neubauer, colocando 10 µl de la suspensión previamente lavada, en un periodo de incubación de 0, 24 y 48 horas, arrojando así, el porcentaje de actividad.

Según Gama, 2015 para realizar los bioensayos se utiliza un aproximado de 100 000 ooquistes íntegros obtenidos de una suspensión, con 50 µg de proteína (Rodríguez, 2017) aforado con PBS 1x en un volumen final de 1 ml, incubando a 30 °C con oscilaciones de 250 rpm.

El número de ooquistes en la suspensión es calculado de acuerdo con:

$$\frac{\text{Número de ooquistes}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{Número de ooquistes observados}}{10} \right) \times 10,000$$

Se utilizaron 100,000 ooquistes de la suspensión vacunal para realizar los bioensayos (Gama, 2015).

## 7.7. Precipitación con sulfato de amonio

Una vez obtenida la pastilla de la precipitación que se realizó con 40% de acetona, se utilizó sulfato de amonio a diferentes porcentajes para evaluar la actividad anticoccidiana. Esto se realizó en frío agregando constantemente pequeñas cantidades de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de acuerdo con el porcentaje deseado. Las muestras se mezclaron suavemente para posteriormente incubar cada fracción mínimo una hora y centrifugar en tubos Eppendorf de 1.5 ml. La pastilla obtenida se

resuspendió en 400 µl de PBS al 1x y se dializaron las muestras en 2 L de PBS 1x durante dos días con la intención de retirar el exceso de sulfato de amonio.

### **7.8. Concentración de la muestra con actividad anticoccidiana**

Una vez obtenida la fracción con actividad anticoccidiana se utilizaron filtros para centrifuga Amicon Vivaspin TM de 50 kDa. Estas muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos como lo indica el protocolo de purificación de Merck Millipore y para desalinizar se utilizaron 2 litros de PBS al 1x con Spectra™ tubos de membrana de diálisis Spectra/Por™ en tubos Eppendorf de 2.0 ml (overnight). Para concentrar más la muestra se centrifugó en tubos Amicon de 50 kDa, posteriormente se realizó gel de poliacrilamida y bioensayos para corroborar la actividad anticoccidiana.

### **7.9. Espectrometría de masas**

Las células de la muestra se lisaron en SDS al 4%, DDT 0.01M, Tris 0.1 M con un pH de 8.6, luego se incubaron durante 1 minuto en buffer de lisis y se sonicaron brevemente en hielo (20 pulsos, 1 segundo cada uno). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 40 °C para reducir completamente los puentes disulfuro. Los residuos de cisteína libres se modificaron con yodoacetamida durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El contenido de proteínas se calculó en base a SDS-PAGE y tinción de plata azul de las muestras con ayuda del software QuantityOne.

Se precipitaron 100 µg de proteína con 9 volúmenes de etanol frío durante 12 horas a -20°C. La pastilla se lavó tres veces con una solución de etanol al 90% y luego se secó. La muestra se solubilizó en ABC (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50 mM, SDC (desoxicolato de sodio) al 0.5%. Se añadió tripsina en una proporción 1:50 (enzima, sustrato) y la muestra se incubó durante 16 horas a 37°C. El SDC se eliminó mediante extracción con acetato de etilo en condiciones ácidas (se añadió un volumen de acetato de etilo a la muestra y se acidificó con TFA al 0.5%). Después de un vigoroso vortex y centrifugación se descartó la fase orgánica. Se realizó una etapa de extracción con acetato de etilo sin TFA (ácido trifluoroacético). Finalmente, la mezcla de péptidos se desaló con cromatografía de fase inversa, se secó y se almacenó a -80°C hasta el análisis LC-MS / MS.

Los péptidos se resuspendieron en condiciones cromatográficas iniciales y se separaron en un sistema Dionex Ultimate 3000, RSLCnano UPLC acoplado en línea a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific). Las muestras se atraparon primero en una precolumna (C18 PepMap 100, 5 µm 10 A°, 300 µm de diámetro interno x 5 mm) y luego se separaron siguiendo un gradiente de elución de 140 min utilizando una columna capilar a 300 nl/m (EASY Spray Column, PepMap RSCL, C18, 3 µm, 100 A, 75 µm x 150 mm). Las fases móviles fueron las siguientes: a) ácido fórmico al 0.1% en agua y b) 90:10 (v/v) acetonitrilo: agua, ácido fórmico al 0.1%.

Los 10 iones más intensos se aislaron en el cuadrupolo y se fragmentaron bajo disociación de colisión de alta energía de colisión normalizada del 27%. Los

iones percusores se midieron a una resolución de 70,000 (a 200 m/z) y los fragmentos se midieron a 17,500. Solo los iones con estados de carga de 2 y superiores se fragmentaron con una ventana de aislamiento de 2 Th.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Cuantificación de las proteínas de la fracción soluble y la pastilla precipitada al 40% y SDS-PAGE

El cultivo de *M. guilliermondii* se inoculó en matraces con 500 ml de medio YPD a 37 °C con 250 rpm durante 14 horas. Posterior a esto, se realizó centrifugación, se retiró el sobrenadante para resuspender el paquete celular en 3 ml de PBS 1x, pH 7 y posterior a esto se sonicó con 20 segundos “on” y 40 segundos “off” y se centrifugó 15,000 rpm por 15 minutos.

Se cuantificó la fracción soluble por el método de Bradford (Thermo Fisher Scientific) dando como resultado una concentración de 390.122 µg/ml lo que nos permite saber cuántos µl de esta fracción se debe agregar para realizar el bioensayo y comprobar la actividad anticoccidiana.

La fracción soluble se precipitó con acetona al 40% como nos indican los antecedentes y se centrifugó al día siguiente obteniendo la pastilla que posteriormente se resuspendió en PBS.

Para cuantificar la pastilla precipitada también se utilizó el mismo método, arrojando una concentración de proteína de 401.494 µg/ml total (Tabla 2),

tomando de la muestra solo 124.53  $\mu$ l para obtener los 50  $\mu$ g requeridos para realizar bioensayos (Rodríguez, 2017).

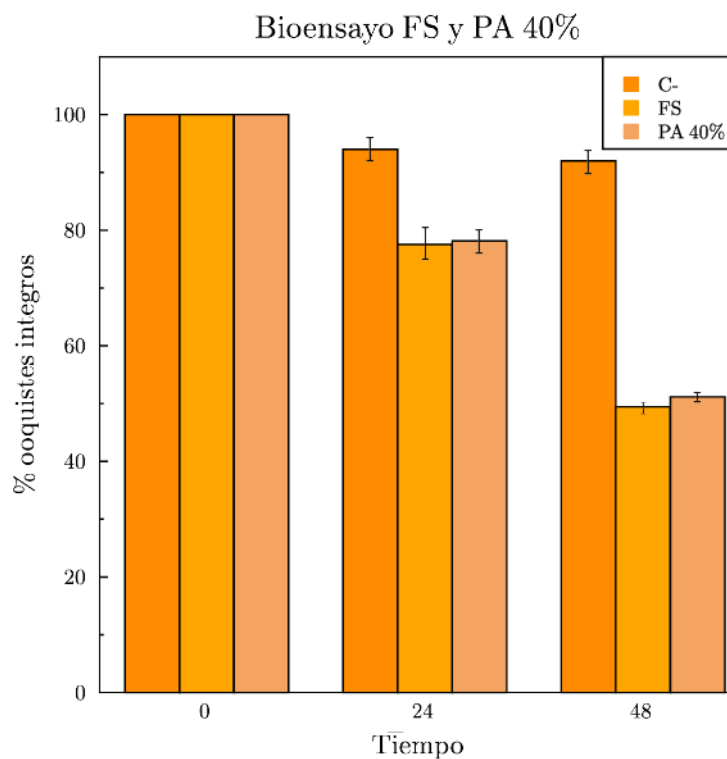
**Tabla 2.** Concentración de la proteína precipitada al 40% de acetona y fracción soluble

| Muestra              | Concentración de proteína |
|----------------------|---------------------------|
| Fracción soluble     | 390.122 $\mu$ g/ml        |
| Pastilla precipitada | 401.494 $\mu$ g/ml        |

Después se realizaron bioensayos para observar si la muestra presentaba actividad anticoccidiana.

Se evaluó, el porcentaje de actividad presente en 50  $\mu$ g de la fracción de 40% de acetona y de la fracción soluble a las 0, 24 y 48 horas utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS al 1x. En la figura 7 se muestra el porcentaje de ooquistes íntegros que se obtuvo en dicho bioensayo, se observa que a las 0 horas los ooquistes están totalmente íntegros para ambas condiciones, a las 24 horas la integridad de los ooquistes disminuyó, tanto con la fracción del 40% de acetona como en la fracción soluble, con un 83% y 77%, respectivamente, teniendo actividad constante a las 48 horas con una disminución del 51 % para la pastilla y 50% para la fracción soluble.



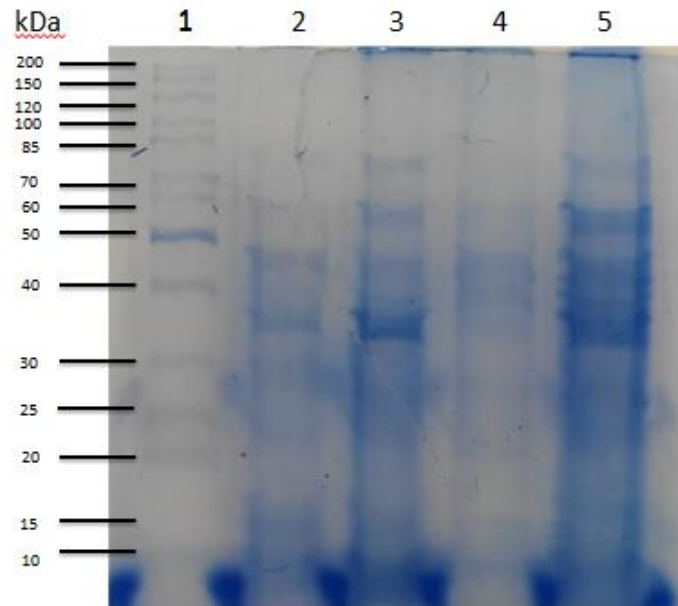


**Figura 7.** Bioensayo de pastilla precipitada con acetona al 40% y cultivo de *M. guilliermondii* como control positivo

## 8.2. Precipitación con Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% y 80% y realización de SDS-PAGE

La pastilla precipitada con acetona al 40% y resuspendida con PBS al 1x se precipito con Sulfato de Amonio para realizar otro corte y descartar otras proteínas, cuantificando nuevamente por el método de Bradford (Thermo Fisher Scientific) arrojando una concentración de 275.862  $\mu\text{g/ml}$  para el 40% y 477.846  $\mu\text{g/ml}$  para el 80%. Posteriormente se realizó un gel de poliacrilamida al 12% para observar los perfiles proteicos y la concentración de la muestra teniendo como resultado proteínas que van desde 10 hasta 85 kDa (figura 8). Esto resultado de cargar al gel 4.13  $\mu\text{g/ml}$  de la muestra para el 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 7.16  $\mu\text{g/ml}$

para el 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  teniendo como resultado la aparición de nuevas bandas de acuerdo con los cortes realizados.



**Figura 8.** Comparación de las fracciones precipitadas con acetona y sulfato de amonio en gel de poliacrilamida.

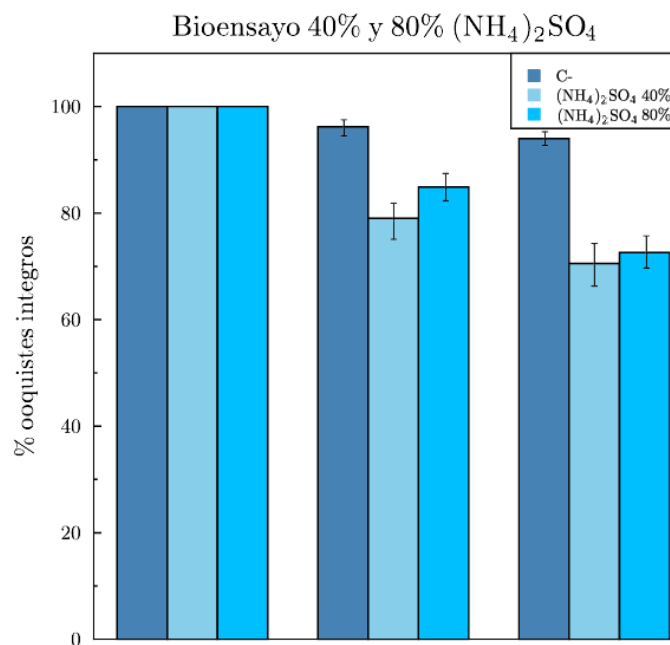
Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fracción soluble. Carril 3: Precipitación con acetona al 40%. Carril 4: precipitación con sulfato de amonio 40%. Carril 5: precipitación con Sulfato de amonio 80%.

### 8.3. Bioensayos para corroborar la actividad anticoccidiana de las fracciones del 40 y 80% de sulfato de amonio

Se realizaron bioensayos con las fracciones de sulfato de amonio para corroborar la actividad anticoccidiana equivalente a los 50 µg de proteína de la muestra. En este caso se agregaron 193.90 µl para el 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 104.63 µl del 80% del mismo.

La actividad se evaluó con el porcentaje de ooquistes íntegros a las 0, 24 y 48 horas utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS al 1x.

A las 24 horas en la fracción del 40% se obtuvo 79% de ooquistes íntegros y un 86% para la fracción del 80% de sulfato de amonio y a las 48 horas la fracción del 40% resultó con un 70% y el 80% de sulfato con un 73% de ooquistes íntegros en total, dando como resultado que la fracción del 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  obtuvo mayor actividad anticoccidiana (figura 9).



**Figura 9.** Bioensayo realizado con la pastilla precipitada en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40 y 80% utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS al 1x.

#### 8.4. Precipitación con sulfato de amonio al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%, SDS-PAGE y bioensayos

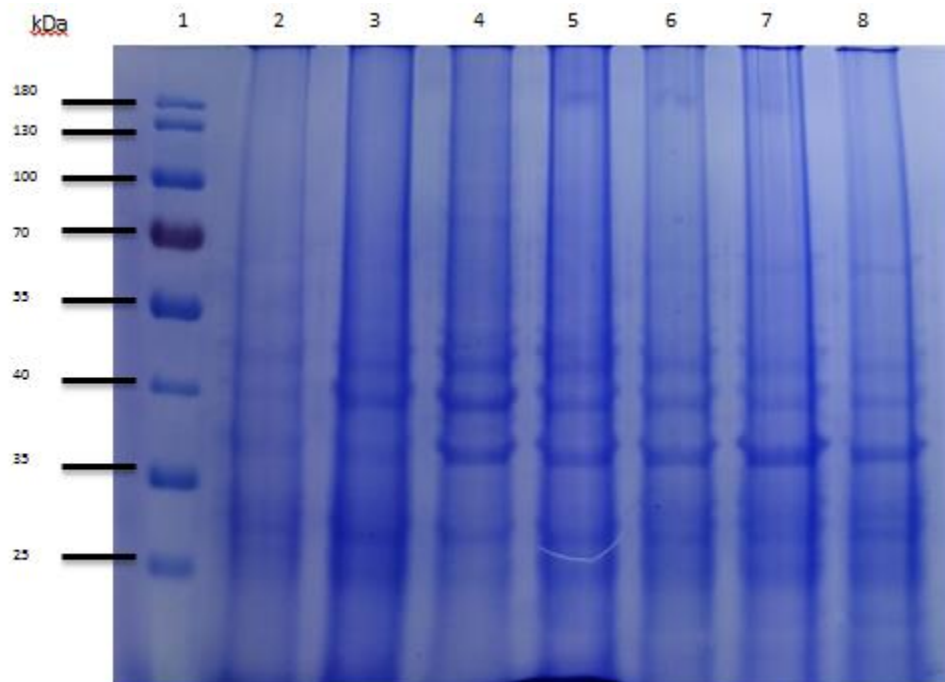
Posteriormente se dividió la pastilla de una muestra de precipitación con acetona al 40% y resuspendida en PBS al 1x en 20%, 40%, 60%, 80% y 100% con sulfato de amonio para purificar más la proteína que presenta actividad anticoccidiana. La pastilla fue resuspendida en 400 µl de PBS al 1x pH 7 para dializar las muestras y posteriormente cuantificar proteína por el método de Bradford y poder realizar un gel de poliacrilamida.

Se realizó la cuantificación por el método de Bradford donde se obtuvieron las siguientes concentraciones:

**Tabla 3.** Cuantificación de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio en distintos porcentajes

| Fracciones                                      | Cuantificación |
|---|----------------|
| Fracción soluble                                | 1487.36 µg/ml  |
| Pastilla precipitada 40% de acetona             | 1000.44 µg/ml  |
| Precipitación 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | 188.93 µg/ml   |
| Precipitación 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | 606.61 µg/ml   |
| Precipitación 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | 246.45 µg/ml   |
| Precipitación 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  | 279.35 µg/ml   |
| Precipitación 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 482.81 µg/ml   |

Se realizó un gel de poliacrilamida (figura 10) utilizando 15  $\mu$ l de las muestras lo que equivale a 22.31  $\mu$ g/ml de la muestra para la fracción soluble, 15  $\mu$ g/ml de la precipitación con acetona al 40% y respecto a las precipitaciones con sulfato de amonio se utilizó para el 20% 2.83  $\mu$ g/ml de la muestra, 9.09  $\mu$ g/ml para 60%, 4.19  $\mu$ g/ml para el 80% y 7.24  $\mu$ g/ml para el 100% obteniendo en las fracciones abundancia de bandas desde los 55 kDa aunque se pueden observar bandas desde los 180 kDa.



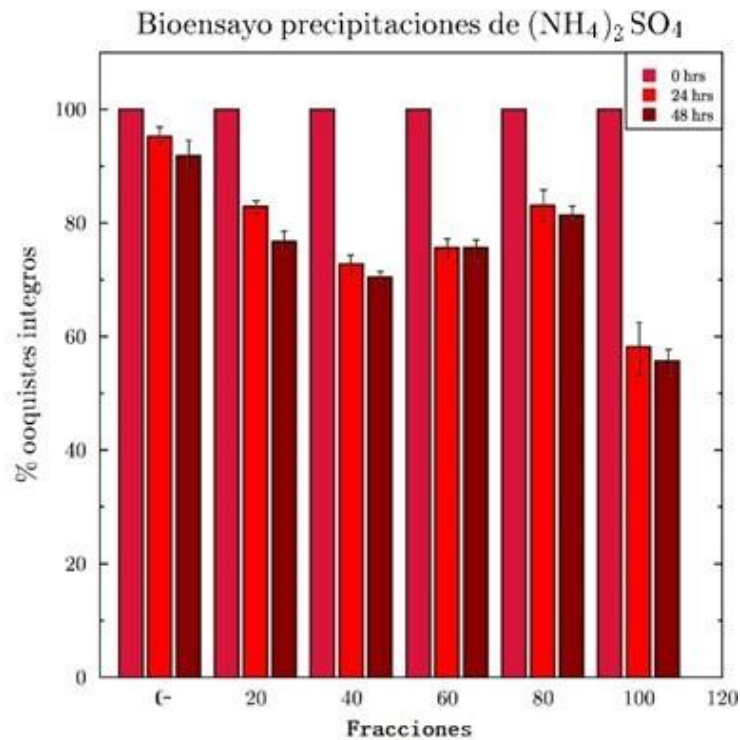
**Figura 10.** Gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: fracción soluble. Carril 3: precipitación con acetona al 40%. Carril 4: precipitación con sulfato de amonio al 20%. Carril 5: precipitación con sulfato de amonio al 40%. Carril 6: precipitación con sulfato de amonio al 60%. Carril 7: precipitación con sulfato de amonio al 80% y carril 8: precipitación con sulfato de amonio al 100%. Todas las precipitaciones son sin gradiente.

Una vez obtenido el resultado del gel de poliacrilamida y haber comprobado la concentración de las muestras se realizaron bioensayos con las fracciones precipitadas con sulfato de amonio en donde se contaron únicamente los ooquistes íntegros utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS al 1x esto se evaluó a las 0, 24 y 48 horas.

Obtuvimos como resultado en la fracción del 20% a las 24 horas el 84% de los ooquistes íntegros y a las 48 horas 78% de integridad. Así mismo en la fracción del 40% se obtuvo a las 24 horas el 72% de ooquistes íntegros, pero a las 48 horas el 70%, siendo la fracción con menos ooquistes íntegros. A las 24 y 48 horas, la fracción del 60% se mantuvo con 78% de ooquistes íntegros sin presencia de actividad mientras que en la fracción del 80%, se obtuvo el 82% de integridad a las 48 horas. En cambio, la fracción del 100% tuvo el 59% a las 24 horas y a las 48 horas obtuvimos 55% de los ooquistes íntegros.

Estos bioensayos se realizaron utilizando 100 µl de cada una de las muestras.



**Figura 11.** Bioensayo realizado con 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  utilizando como control negativo ooquistes expuestos en PBS 1x.

De acuerdo con los bioensayos (figura 11) las fracciones que presentan actividad anticoccidiana son las precipitadas con 20% y 40% de sulfato de amonio lo que indico realizar el siguiente corte desde el 40% de sulfato de amonio para posteriormente pasar esta fracción por filtros de 50 kDa y corroborar que la actividad anticoccidiana continúe.

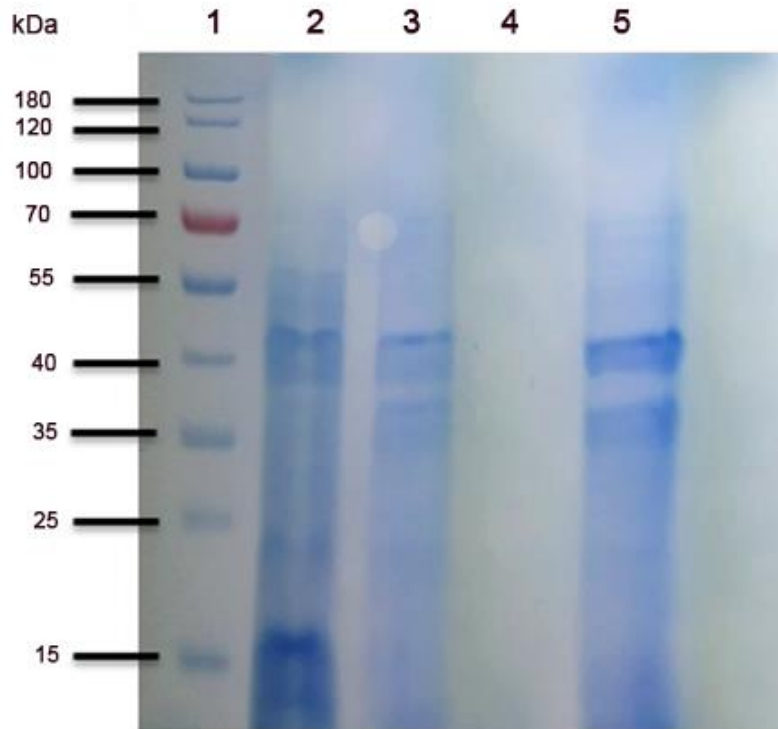
### 8.5. Gel de poliacrilamida y bioensayo de las muestras concentradas

Realizamos la cuantificación por el método de Bradford de las muestras precipitada con acetona al 40% (P40%), fracción precipitada con sulfato de amonio al 40% (PS40%) y de la fracción concentrada en filtros de 50 kDa (PSA<sub>2</sub>) (tabla 4) para posteriormente realizar los bioensayos.

**Tabla 4.** Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

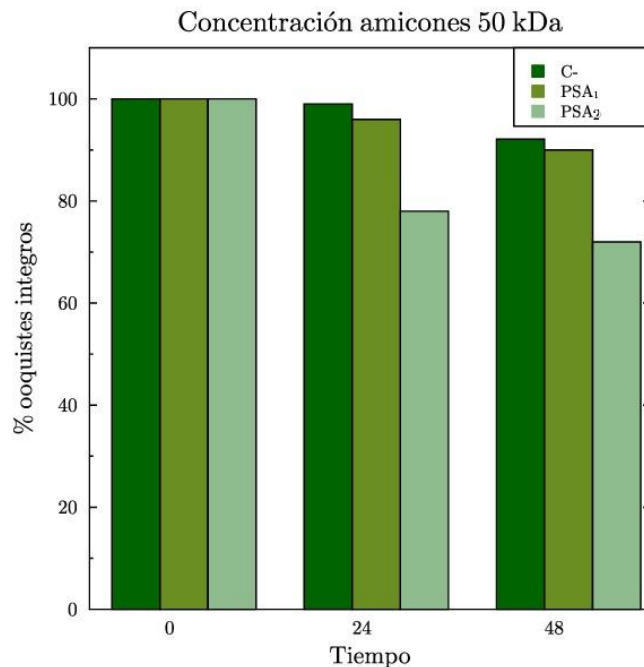
| Fracción | Cuantificación |
|----------|----------------|
| PA40%    | 401.49 µg/ml   |
| PS40%    | 506.73 µg/ml   |
| PSA40%   | 275.86 µg/ml   |





**Figura 12.** Comparación de las fracciones precipitadas en gel de poliacrilamida. Carril 1: MP. Carril 2: P40%. Carril 3: PSA 40%. Carril 4: **PSA<sub>1</sub>**. Carril 5: **PSA<sub>2</sub>**.

La presencia de proteínas se examinó mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 12) agregando 15  $\mu$ l de las muestras equivalente a 6  $\mu$ g/ml de la pastilla precipitada con acetona al 40%, 7.6  $\mu$ g/ml de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40% y 4.13  $\mu$ g/ml de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40% pasando por filtros de 50 kDa. Las bandas nos indican que obtuvimos una mejor concentración de nuestra muestra siendo visibles nuevas bandas en el carril 5. Aunado a esto se realizaron los bioensayos posteriores correspondientes.



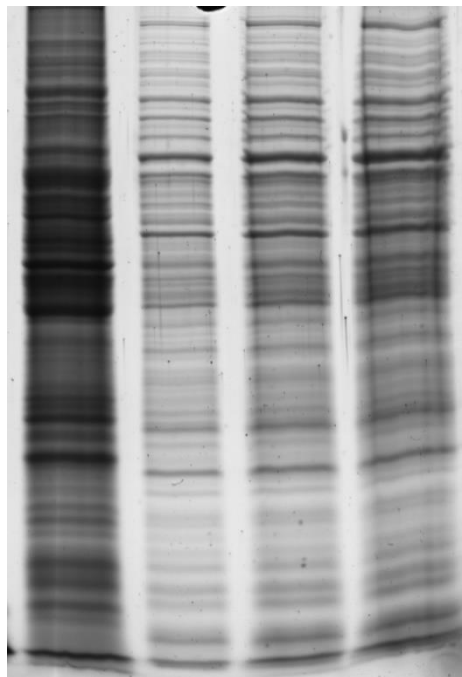
**Figura 13.** Bioensayos de la actividad anticoccidiana de la fracción centrifugada con amicones de 50 kDa.

La muestra se centrifugó con filtros de 50 kDa para posteriormente evaluar la actividad anticoccidiana, Los bioensayos (Figura 12) se evaluaron de la misma manera que los anteriores (0, 24 y 48 horas). Las moléculas no filtradas de la fracción precipitada con sulfato de amonio PSA<sub>1</sub> no obtuvieron actividad en 24 horas, de igual manera a las 48 horas los ooquistes se mantuvieron íntegros con un porcentaje de 95% mientras que las moléculas precipitadas con sulfato de amonio que si lograron pasar el filtro de 50 kDa PSA<sub>2</sub> disminuyeron a las 24 horas la integridad de los ooquistes, obteniendo un 78% de integridad y a las 48 horas un 72% de ooquistes íntegros.

## 8.6. Análisis de espectrómetro de masas MS/MS

En la figura 14 podemos apreciar un gel de poliacrilamida donde en el primer carril podemos visualizar la concentración de las proteínas de la muestra precipitada con sulfato; posibles candidatas de este estudio.

La proteómica de espectrometría de masas se identificó a través del software Max Quant (Tyanova *et al.*, 2016) comparando con Uniprot *Meyerozyma guilliermondii* fasta archivo descargado 2020-06-08. Los datos del análisis del MS/ arrojaron un total de 430 posibles proteínas que conforman las muestras analizadas.



**Figura 14.** SDS-PAGE del contenido total de proteínas de la muestra analizada por espectrometría de masas.

En el primer carril se encuentran las proteínas de la muestra de *Meyerozyma guilliermondii*. Los siguientes carriles contienen 5, 10 y 20  $\mu\text{g}$  de proteínas utilizadas como referencia para realizar la densitometría.

## 8.7. Posibles candidatos responsables de la actividad anticoccidiana

En el análisis se obtuvo 430 proteínas de las cuales descartamos las menos abundantes, considerando así 65 posibles candidatas por encima de  $1.05E09$  de abundancia ya que así podemos asumir con certeza que pertenecen a *M. guilliermondii*. Posteriormente se realizó un análisis individual *in silico* para considerar las funciones que ejerce cada proteína candidata dentro de la célula como puede apreciarse en los párrafos subsecuentes.

Se realizó una búsqueda *in silico* de cada proteína perteneciente a *M. guilliermondii* y de sus posibles funciones moleculares. Esto se identificó mediante la búsqueda en Uniprot y la identificación de péptidos señal, se llevó a cabo en el servidor SignalP-5.0 el cual predice la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas eucariotas.

En la tabla 5 se muestran las proteínas más abundantes en las fracciones analizadas, donde en primer lugar encontramos la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con una abundancia de  $2.4E+10$  reconocida por su participación en el metabolismo energético y la producción de ATP y piruvato a través de la glucólisis aerobia (Nicholls *et al.*, 2012).

**Tabla 5.** Posibles candidatos seleccionados por abundancia responsables de la actividad anticoccidiana.

| ID Proteína | Nombre de la proteína                 | Abundancia | Función  | Categoría funcional                |
|-------------|---------------------------------------|------------|--|------------------------------------|
| A5DDG6      | Gliseraldehido-3-fosfatodehidrogenasa | 2.4E+10    | Degradación de carbohidratos                               | Glucólisis/proteína multifuncional |
| A5DIS4      | Proteína no caracterizada             | 1.87E+10   | Unión de iones magnesio<br>Unión de pirofosfato de tiamina | Actividad descarboxilasa           |
| A5DKK7      | Fosfoglicerato quinasa                | 1.63 +10   | Proceso glucolítico<br>Glucólisis/gluconeogénesis          | Actividad catalítica               |
| A5DPN9      | Fructosa bifosfato aldolasa           | 1.22E+10   | Glucólisis<br>Degradación de carbohidratos                 | Actividad catalítica               |
| A5DDD0      | Proteína con dominio                  | 1.16E+10   | Oxidoreductasa   |                                    |

Después se obtuvo una proteína no caracterizada con una abundancia de 1.87E+10 con una posible función de descarboxilasa en la levadura, además la proteína posee 3 dominios y tiene sitios de unión a cofactores asociados al Magnesio y difosfato de tiamina. En las levaduras, la catálisis enzimática por piruvato deshidrogenasa eficiente en la glucólisis requiere la presencia adicional de difosfato de tiamina y Magnesio como cofactores (Kim *et al.*, 2016).

Con 1.63E+10 se obtuvo la Fosfoglicerato quinasa que está presente como una de las enzimas que cataliza la transferencia reversible del grupo 1-fosforilo del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, para producir ATP y 3-fosfoglicerato en el primer paso de generación de ATP en la glucólisis. Contiene los dominios C-Terminal y N-Terminal altamente conservados (Kumar *et al.*, 2019), donde la primera mitad del

dominio de la fosfoglicerato quinasa (PGK) es responsable de la unión de 1,3-fosfoglicerato/1,3-bisfosfoglicerato y la segunda mitad del dominio es responsable de la unión de nucleótidos (Biswas *et al.*, 2020).

También, se obtuvo la enzima glucolítica fructosa bisfosfato aldolasa con una intensidad de 1.22E+10 que cataliza la condensación aldólica de dihidroxiacetona fosfato (DHAP o glicerona-fosfato) con gliceraldehído 3-fosfato (G3P) para formar fructuosa 1,6 bisfosfato (FBP) (Gardberg *et al.*, 2011), en la gluconeogénesis y la reacción inversa en la glucólisis donde sintetiza D-gliceraldehído 3-fosfato y glicerona fosfato a partir de D-glucosa formando parte de la degradación de carbohidratos.

De acuerdo con la base de datos UniprotKB esta enzima tiene sitios de unión a cofactores uniendo 2 iones de  $Zn^{2+}$  por subunidad, uno es catalítico y el otro aporta una contribución estructural.

Acorde a estos datos, se obtuvo una proteína con dominios que presenta una intensidad de 1.16E+10 cumpliendo una función molecular de oxidorreductasa en nuestra levadura y consta de dos dominios: el primero es un dominio catalítico con estructura similar a GroEs de alcohol deshidrogenasa y el segundo es deshidrogenasa fijadora de Zinc. También presenta un 50% de identidad con la isoenzima Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) la cual pertenece a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta isoenzima cataliza la conversión de alcoholes primarios no ramificados en sus correspondientes aldehídos. Estos datos se tomaron del servidor Uniprot.

## IX. DISCUSIÓN

La coccidiosis aviar es una enfermedad causada por parásitos del género *Eimeria*, resistentes al daño mecánico y a la degradación proteolítica, ocasionando daño en el epitelio intestinal del ave y causando pérdidas económicas significativas incluyendo su tratamiento y prevención. Por esta razón, se busca una nueva alternativa de origen natural que ataque al parásito en su estructura más resistente como lo es la pared oquistica. El presente estudio fue planteado para evaluar la actividad anticoccidiana en los antecedentes antes mencionados como lo es la precipitación con acetona al 40% ya que Rodríguez en el 2017 evaluó la actividad anticoccidiana en cortes de 20% y 40% del solvente para poder descartar algunas moléculas asociadas con proteínas y así precipitar solo las que presentan dicha actividad de la levadura descrita por Dantán y colaboradores (Dantán-González *et al.*, 2015), identificada como *Meyerozyma guilliermondii*.

*M. guilliermondii* es una levadura haploide, osmotolerante y no patógena que utiliza varias fuentes de carbono para sobrevivir y crecer. Se han realizado estudios donde exhiben características fisiológicas que pueden utilizarse para la biorremediación de contaminación ambiental con metales (Ruas & Guerra-Sá, 2020).

En este estudio, se logró el enriquecimiento de las proteínas que presentan actividad anticoccidiana de dicha levadura precipitando con sulfato de amonio al 40%. Este método se ha utilizado anteriormente para la precipitación de proteínas con plasma sanguíneo siendo una estrategia sencilla y donde se han obtenido resultados exitosos (Jiang *et al.*, 2004), (Mahn & Ismail, 2011).

Una vez corroborada la actividad anticoccidiana la muestra se analizó por espectrómetro de masas. Para nuestro análisis solo tomamos en cuenta las proteínas más abundantes de acuerdo con su intensidad.

Entre las más abundantes obtuvimos la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima ampliamente estudiada ya que es muy abundante en los organismos siendo sensible a una variedad de condiciones celulares como lo es la entrada de calcio, hipoxia, progresión del ciclo celular, estados de crecimiento acelerados (White & Garcin, 2017), y protección de las células contra especies reactivas de oxígeno. Además de ser una enzima clave en la vía glucolítica, está involucrada en la apoptosis celular (Chuang *et al.*, 2005). Los organismos multicelulares eliminan las células dañadas por medio de apoptosis mientras que en los organismos unicelulares como lo son las levaduras, desaceleran el envejecimiento celular (Khan *et al.*, 2019). Asimismo, esta enzima ha sido reconocida por sus múltiples funciones dentro de la célula por lo que se clasifica como una proteína *Moonlight* o del pluriempleo (Silva *et al.*, 2011).

Las proteínas *Moonlighting* descritas por Jeffrey en 1999 son proteínas de una sola cadena de polipéptidos que tiene una función conservada pero que a la vez realiza funciones adicionales a través de interacciones con moléculas diana (Satala *et al.*, 2021).

Otra proteína considerada *Moonlight* es la Fructosa bisfosfato aldolasa (FBA) es una enzima importante en la vía glucolítica que puede facilitar la adhesión a células humanas o superficies abióticas además se considera una proteína inmunodominante (Elamin Elhasan *et al.*, 2021). Se ha reportado que las enzimas



GAPDH, Enolasa y FBA interactúan directamente con proteínas solubles del huésped y ligandos de superficie en bacterias y levaduras (Tunio *et al.*, 2010).

En este análisis hay varias proteínas del pluriempleo y otras que, aunque no hayan presentado mayor intensidad, son fundamentales para alguna ruta metabólica dentro de la célula. Por lo tanto, cabe mencionar la importancia de estas moléculas que llevan a cabo diferentes actividades pudiendo ser las responsables de dicha actividad (Tabla 6).

**Tabla 6.** Posibles candidatas responsables de la actividad anticoccidiana de acuerdo con su función.

| ID     | Nombre           | Abundancia | Función                                    |
|--------|------------------|------------|--|
| A5DCG0 | Fosfotransferasa | 4.14E+09   | Degradación de carbohidratos<br>Glucolisis |
| A5DM90 | Enolasa          | 3.02E+09   | Actividad catalítica<br>Glucolisis         |

La fosfotransferasa contiene dos dominios estructuralmente similares: Hexoquinasa 1 y hexoquinasa 2. La hexoquinasa (Hxk) es una enzima esencial para el metabolismo energético de la célula y para regular la transcripción de genes en el núcleo. Hxk lleva a cabo sus funciones entrando y saliendo del núcleo gracias a proteínas transportadoras y de unión (Vega *et al.*, 2016). Por su capacidad de interactuar de manera transitoria o estable con diferentes moléculas,

se considera una enzima *Moonlighting* siendo la detección de glucosa en los organismos su función más destacada (Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2021).

En los parásitos protozoarios esta enzima cumple su función en la vía glucolítica. Estudios revelan que la inhibición del crecimiento del parásito *Cryptosporidium* puede influir en la ausencia y presencia de glucosa como fuente de carbono (Eltahan *et al.*, 2019). También en las levaduras desarrolla funciones interesantes contra sus huéspedes aumentando los niveles de glucosa en condiciones adversas como *Candida albicans* que, durante las interacciones contra los macrófagos del huésped, se produce una reacción de defensa positiva en ambos lo que conduce a una competencia por la glucosa, por ende, al agotarse, *C. albicans* desencadena la muerte rápida de los macrófagos (Tucey *et al.* 2018). Lo que confiere que posiblemente *M. guilliermondii* esté desencadenando una reacción de supervivencia contra *Eimeria*.

Como ya hemos vistos, las proteínas involucradas en la vía metabólica de las células son en su mayoría consideradas del pluriempleo, cumpliendo funciones cruciales de proteínas conservadas y otras rutas que aún no se han esclarecido como es el caso de la Enolasa, una metaloenzima que cataliza la conversión de fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato dentro de la glucólisis siendo una reacción reversible dependiendo de las condiciones ambientales (Didiasova *et al.*, 2019). En *Saccharomyces cerevisiae*, su función del pluriempleo depende de su localización celular pues también se encarga de entregar isoaceptores citoplasmáticos de lisina (tRk1) a la forma precursora de la sintetasa mitocondrial (preMk1p) (Entelis *et al.* 2006) que se sintetiza en la periferia de la membrana

externa mitocondrial. Esta proteína también se ha encontrado en la pared de *S. cerevisiae* y varios organismos patógenos. En los parásitos apicomplexanos, la enolasa de la superficie celular, participa en el proceso de invasión de tejidos pues es capaz de secretarse al entorno extracelular para intervenir en la degradación de los éstos (Brandina *et al.*, 2006).

Asimismo, parásitos protozoarios del género *Trypanosoma* dependen por completo de la glucólisis pues es el único proceso por el cual sintetizan ATP. La inhibición de esta ruta metabólica conduce a la muerte del parásito. Incluso, los amastigotes intracelulares del parásito *Leishmania* utilizan azúcares como fuente de energía y carbono, mientras que la gluconeogénesis es esencial para la absorción de hexosa, sintetizar glicoconjugados y  $\beta$ -manano, necesarios para su virulencia (Rodríguez & Landfear, 2006). En *Plasmodium spp.* la enolasa de la superficie de la célula, participa en la invasión de tejidos, aunque también se puede expulsar al entorno extracelular para intervenir con la invasión inmunitaria como se ha observado en *Aphidius ervi* (Fallabella *et al.* 2009), mientras que en *Entamoeba invadens*, la enolasa se expresa por señales ambientales, mostrando una asociación con vesículas citoplasmáticas que transportan la proteína a la pared del ooquiste (Segovia *et al.* 2010).

## X. CONCLUSIONES

En este trabajo se enriquecieron las proteínas por medio de algunas técnicas de precipitación como lo son acetona y precipitación con sulfato de amonio. Esto se llevó a cabo enriqueciendo la muestra con distintas concentraciones en cada fracción pues de esta manera las proteínas se precipitaron de forma adecuada en cada corte.

Se demostró la actividad anticoccidiana por medio de bioensayos evaluando el porcentaje de ooquistes íntegros desde la precipitación con acetona, cumpliendo con aproximadamente 40% de dicha actividad, agregando 100 µg de proteína de las muestras.

Una vez corroborada la actividad anticoccidiana, la muestra se analizó por espectrómetro de masas lo que condujo a 65 proteínas candidatas. Se realizó un análisis de cada proteína en base a su intensidad y éstas fueron respaldadas por la bibliografía para conocer su función dentro de la célula.

Tomando en cuenta lo anterior, proponemos a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y a la enolasa como las potenciales responsables de la actividad anticoccidiana ya que, por ser proteínas *moonlighting* no siguen la ruta de secreción clásica y, además, se han reportado en las paredes de levaduras y hongos (Cohen *et al.*, 2020).

Estudios nos muestran que GAPDH está involucrada en mecanismos de muerte celular apoptótica en varios organismos incluyendo *Eimeria tenella* donde el

parásito eleva considerablemente sus niveles de proteína GAPDH antes de la apoptosis (Wang *et al.*, 2013).

En bacterias también se ha detectado GAPDH como una proteína secretada o en la superficie de las células, aunque el mecanismo de su translocación sigue siendo un enigma abierto a discusión (Kopeckova *et al.*, 2020).

En levaduras, se ha demostrado que GAPDH juega un papel importante en la fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* pues resiste a las condiciones adversas en el proceso de fermentación, mientras que las levaduras no *Saccharomyces* mueren ante estos factores selectivos. Sin embargo, estudios demuestran que existen otros factores involucrados en el proceso de fermentación que inhibe el crecimiento de dichas levaduras (Renault *et al.*, 2013), (Branco *et al.*, 2014). Recientemente descubrieron que estos hallazgos se deben a la interacción célula-célula entre *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras no *Saccharomyces* como *Lachancea thermotolerans* en conjunto con los péptidos antimicrobianos derivados de gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Kemsawasd *et al.*, 2015). Estos péptidos son denominados como “sacaromicina” (Caldeira *et al.*, 2019).

Silva y col. (2011) reportaron que GAPDH en las levaduras es un sustrato específico de metacaspasas y que la división de células apoptóticas de GAPDH, origina fragmentos iguales a los péptidos antimicrobianos (AMP).

Los AMP son componentes conservados del sistema inmunológico y son la línea de defensa antimicrobiana para los organismos del reino eucariota, también están

involucrados en la respuesta inmune de diferentes organismos (Branco *et al.*, 2017).

Las metacaspasas son proteasas de cisteína presentes en plantas, levaduras y parásitos protozoarios como en el caso de tripanosomas donde las metacaspasas son un factor efector responsables de la muerte celular programada (Debrabant *et al.*, 2003). Estas activan la apoptosis y mantienen la viabilidad celular (Shrestha *et al.*, 2019). La metacaspasa de levadura es necesaria para llevar a cabo la apoptosis celular ante una amplia variedad de estímulos (Silva *et al.*, 2011).

Al igual que GAPDH, la enolasa es parte fundamental en la glucólisis, la gluconeogénesis y probablemente esté involucrada en la patogénesis causada por algunos parásitos (Avilán *et al.* 2011). Esta proteína se ha encontrado secretada en *E. tenella* (Labbé *et al.* 2006). Además, es relevante para la etapa del desarrollo anaerobio del parásito, pues es de gran ayuda en el metabolismo como enzima glucolítica (Zhang *et al.* 2017).

Marie y colaboradores (2005), compararon los efectos de reducción de las actividades enzimáticas en el flujo glucolítico de *T. brucei*, validando a la enolasa como diana farmacológica mediante interferencia de RNA. Tras la inducción de RNAi, la enolasa disminuyó gradualmente durante las primeras 24 h al 16% y después de dos días el parasito murió.

En *Eimeria tenella*, la enolasa se observó en la superficie, citoplasma y dentro del núcleo, lo que sugiere que está asociada a la adhesión e invasión del tejido del

huesped (Zhou *et al*, 2020). En *S. cerevisiae* también se ha encontrado en la pared celular (López *et al*. 2006).

Este estudio se enfocó en la búsqueda de un anticoccidiano capaz de romper la parte más resistente del ooquiste, desviándonos del enfoque convencional en el diseño de fármacos donde los inhibidores específicos de sitios activos pueden diferenciar entre proteínas del huésped y del parásito para provocar la inhibición específica de la enzima.

Aunque en este estudio la enolasa y GAPDH se han considerado las proteínas responsables de la actividad anticoccidiana contra los parásitos protozoarios del género *Eimeria*, no se desestiman a las candidatas adicionales, pues podrían ser un enfoque de estudio para poder descubrir sus funciones aún desconocidas y abrir nuevas expectativas en la elaboración de anticoccidianos eficaces para el mercado.

## **XI. PERSPECTIVAS**

- Aislar y clonar los genes de las proteínas candidatas.
- Expresión heteróloga de las proteínas candidatas.
- Determinar la CL 50 de dicha proteína con diferentes concentraciones.
- Caracterizar la proteína por medio de choques térmicos, diferente pH y temperaturas.



## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A., Abbas, R. Z., Raza, M. A., Khan, M. K., Saleemi, M. K., & Saeed, Z. (2019). In vitro anticoccidial activity of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) extract on oocysts of *Eimeria* species of Chicken. *Advancements in Life Sciences*, 7(1), 44–47.
2. Abdel-Tawab, H., Abdel-Haleem, H. M., Abdel-Baki, A. A. S., Al-Quraishy, S., & El-Mallah, A. M. (2020). Anticoccidial and Antioxidant Activities of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Murine Intestinal Eimeriosis. *Acta Parasitologica*, 65(4), 823–830. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00219-w>
3. Albert, M. A., Haanstra, J. R., Hannaert, V., Van Roy, J., Opperdoes, F. R., Bakker, B. M., & Michels, P. A. (2005). Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry*, 280(31), 28306–28315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502403200>
4. Avilán, L., Gualdrón-López, M. Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A., & Concepción, J. L. (2011). Enolase; a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme reaserch*, 2011, 932549. <https://doi.org/10.4061/2011/932549>

5. Bacciu, N., Bed'Hom, B., Filangi, O., Romé, H., Gourichon, D., Répérant, J. M., Le Roy, P., Pinard-Van Der Laan, M. H., & Demeure, O. (2014). QTL detection for coccidiosis (*Eimeria tenella*) resistance in a Fayoumi × Leghorn F2 cross, using a medium-density SNP panel. *Genetics Selection Evolution*, 46(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-14>
6. Biswas, S., Adhikari, A., Mukherjee, A., Das, S., & Adak, S. (2020). Regulation of *Leishmania major* PAS domain-containing phosphoglycerate kinase by cofactor Mg<sup>2+</sup> ion at neutral pH. *FEBS Journal*, 287(23), 5183–5195. <https://doi.org/10.1111/febs.15305>
7. Blake, D. P., Pastor-Fernández, I., Nolan, M. J., & Tomley, F. M. (2017). Recombinant anticoccidial vaccines - a cup half full? *Infection, Genetics and Evolution*, 55(July), 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.009>
8. Blake, D. P., & Tomley, F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*, 30(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003>
9. Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
10. Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., & Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology*

*and Biotechnology*, 98(2), 843–853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>

11. Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M. G., Caldeira, J., Arneborg, N., Prista, C., & Albergaria, H. (2017). Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 159–171. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7755-6>
12. Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., & Martin, R. P. (2006). Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.07.001>
13. Caldeira, J., Almeida, G., Macedo, A. L., Silva, J. P. M., & Albergaria, H. (2019). Saccharomycin, a biocide from *S. cerevisiae* that kill-off other yeasts. *Annals of Medicine*, 51(sup1), 94–95. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1562694>
14. Chapman, H. D., & Jeffers, T. K. (2014). Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.002>
15. Chuang, D. M., Hough, C., & Senatorov, V. V. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095902>

16. Cohen, M. J., Philippe, B., & Lipke, P. N. (2020). *Secretion*. 5(6), 1–11.
17. Dantán-González, E., Quiroz-Castañeda, R. E., Cobaxin-Cárdenas, M., Valle-Hernández, J., Gama-Martínez, Y., Tinoco-Valencia, J. R., Serrano-Carreón, L., & Ortiz-Hernández, L. (2015). Impact of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from chickens against *Eimeria* sp. protozoan, an in vitro analysis. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0589-0>
18. Das, Q., Shay, J., Gauthier, M., Yin, X., Hasted, T. L., Ross, K., Julien, C., Yacini, H., Kennes, Y. M., Warriner, K., Marcone, M. F., & Diarra, M. S. (2021). Effects of Vaccination Against Coccidiosis on Gut Microbiota and Immunity in Broiler Fed Bacitracin and Berry Pomace. *Frontiers in Immunology*, 12(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621803>
19. de Marco, L., Epis, S., Capone, A., Martin, E., Bozic, J., Crotti, E., Ricci, I., & Sassera, D. (2018). The genomes of four *Meyerozyma caribbica* isolates and novel insights into the *Meyerozyma guilliermondii* species complex. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(3), 755–759.  
<https://doi.org/10.1534/g3.117.300316>
20. Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., & Nakhasi, H. L. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International Journal for Parasitology*, 33(3), 257–267.  
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00008-0)
21. Didiasova, M., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2019). When place matters: Shuttling of enolase-1 across cellular compartments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(APR), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00061>

22. Dunn, B., & Wobbe, C. R. (1993). Preparation of Protein Extracts from Yeast. *Current Protocols in Molecular Biology*, 23(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1313s23>
23. Elamin Elhasan, L. M., Hassan, M. B., Elhassan, R. M., Abdelrhman, F. A., Salih, E. A., Ibrahim H, A., Mohamed, A. A., Osman, H. S., Khalil, M. S. M., Alsafi, A. A., Idris, A. B., & Hassan, M. A. (2021). Epitope-Based Peptide Vaccine Design against Fructose Bisphosphate Aldolase of *Candida glabrata*: An Immunoinformatics Approach. *Journal of Immunology Research*, 2021, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2021/8280925>
24. Eltahan, R., Guo, F., Zhang, H., & Zhu, G. (2019). The Action of the Hexokinase Inhibitor 2-deoxy-d-glucose on *Cryptosporidium parvum* and the Discovery of Activities against the Parasite Hexokinase from Marketed Drugs. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 66(3), 460–468.  
<https://doi.org/10.1111/jeu.12690>
25. Fatoba, A. J., & Adeleke, M. A. (2018). Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. *Journal of Parasitic Diseases*, 42(4), 483–493.  
<https://doi.org/10.1007/s12639-018-1048-1>
26. Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M. L., Stigliano, C., Varrichio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Grazini, F., Gigliotti, S., & Pennacchio, F. (2009). *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect biochemistry and molecular biology*. 39(11), 801-813.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.005>
27. Gama M. Y. 2015. Identificación molecular de microorganismos aislados a

- partir de sustrato de heces de aves y suspensiones vacunales para la evaluacion de actividad anticoccidiana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biologicas. Universidad Autonoma del Estado de Morelos. 58 Pp.
28. Gardberg, A., Sankaran, B., Davies, D., Bhandari, J., Staker, B., & Stewart, L. (2011). Structure of fructose biphosphate aldolase from *Encephalitozoon cuniculi*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(9), 1055–1059.  
<https://doi.org/10.1107/S1744309111021841>
29. Idris, M., Abbas, R. Z., Masood, S., Rehman, T., Farooq, U., Babar, W., Hussain, R., Raza, A., & Riaz, U. (2016). The potential of antioxidant rich essential oils against avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*, 73(1), 89–104. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000787>
30. Jiang, L., He, L., & Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1023(2), 317–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.029>
31. Jeffers, T. K. (2013). Examen de los coccidiostatos, con diferencias de la eficacia de campo. *Selecciones avícolas*, 85 (22), 10.
32. Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 362(14), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
33. Khan, Z., Nisar, M. A., Muzammil, S., Zafar, S., Zerr, I., & Rehman, A.

- (2019). Cadmium induces GAPDH- and- MDH mediated delayed cell aging and dysfunction in *Candida tropicalis* 3Aer. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7631-9>
34. Kim, J. W., Kim, J., Seo, S. O., Kim, K. H., Jin, Y. S., & Seo, J. H. (2016). Enhanced production of 2,3-Butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae* through fine-tuning of Pyruvate decarboxylase and NADH oxidase activities. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0677-9>
35. Kopeckova, M., Pavkova, I., & Stulik, J. (2020). Diverse Localization and Protein Binding Abilities of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Pathogenic Bacteria: The Key to its Multifunctionality? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00089>
36. Kumar, R., Ahmad, F., & Rathaur, S. (2019). Characterization of filarial phosphoglycerate kinase. *Biochimie*, 165, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.012>
37. Lee, K., Kim, D. H., Kim, Y. B., Jeong, S. B., Oh, S. T., Cho, S. Y., (2020). Vaccine-challenged Broiler Chickens. *Animals*, 10(481), 1 - 13. <http://doi:10.3390/ani10030481>
38. Labbé, M., Péroval, M., Bourdieu, C., Girard-Misguich, F., & Péry, P. (2006). *Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: a likely role in glycolysis and in others functions. *International journal for parasitology*, 36(14), 1443–1452. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.011>

39. Mahn, A., & Ismail, M. (2011). Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(30), 3645–3648. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.024>
40. Martínez-larrañaga, A. A. M. R. (1989). Interacciones tóxicas con ionóforos. 15-17.
41. Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., & Delauw, M. F. C. (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal for Parasitology*, 35(8), 829–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>
42. Nicholls, C., Li, H., & Liu, J. P. (2012). GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), 674–679. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>
43. Oz, H. S. (2017). Induced aberrant organisms with novel ability to protect intestinal integrity from inflammation in an animal model. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080864>
44. Papon, N., Savini, V., Lanoue, A., Simkin, A. J., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'H, N., Clastre, M., Courdavault, V., & Sibirny, A. A. (2013). *Candida guilliermondii*: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics.



- Current Genetics*, 59(3), 73–90. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0391-0>
45. Quiroz-Castañeda, R. E., & Dantán-González, E. (2015). Control of avian coccidiosis: Future and present natural alternatives. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/430610>
46. Renault, P. E., Albertin, W., & Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
47. Rodríguez-Saavedra, C., Morgado-Martínez, L. E., Burgos-Palacios, A., King-Díaz, B., López-Coria, M., & Sánchez-Nieto, S. (2021). Moonlighting Proteins: The Case of the Hexokinases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(June), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.701975>
48. Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., & Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-52>
49. Ruas, F. A. D., & Guerra-Sá, R. (2020). In silico Prediction of Protein–Protein Interaction Network Induced by Manganese II in *Meyerozyma guilliermondii*. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00236>
50. Saif, Y. M., Flady, A. M., Glison, J. R., Mc Dougal, L. R., Nolan, L. K., Swayne, D. E., (2008). *Diseases of Poultry.*, 12 ed Iowa-USA: Blackwell Publishing. 1068-1069.
51. Satala, D., Satala, G., Zawrotniak, M., & Kozik, A. (2021). *Candida albicans*

and *Candida glabrata* triosephosphate isomerase – a moonlighting protein that can be exposed on the candidal cell surface and bind to human extracellular matrix proteins. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–15.

<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02235-w>

52. Segovia-Gamboa, N. C., Chávez-Munguía, B., Medina-Flores, Y., Cázares-Raga, F. E., Hernández-Ramírez, V. I., Martínez-Palomo, A., & Talamás-Rohana, P. (2010). *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Experimental parasitology*, 125(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.019>

53. Shrestha, A., Brunette, S., Stanford, W. L., & Megeney, L. A. (2019). The metacaspase Yca1 maintains proteostasis through multiple interactions with the ubiquitin system. *Cell Discovery*, 5(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0071-9>

54. Silva, A., Almeida, B., Sampaio-Marques, B., Reis, M. I. R., Ohlmeier, S., Rodrigues, F., Vale, A. do, & Ludovico, P. (2011). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(12), 2044–2049. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.010>

55. Tucey, T. M., Verma, J., Harrison, P. F., Snelgrove, S. L., Lo, T. L., Scherer, A. K., Barugahare, A. A., Powell, D. R., Wheeler, R. T., Hickey, M. J., Beilharz, T. H., Naderer, T., & Traven, A. (2018). Glucose Homeostasis Is Important for Immune Cell Viability during *Candida* Challenge and Host Survival of Systemic Fungal Infection. *Cell metabolism*, 27(5), 988–1006.e7.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.019>

56. Tunio, S. A., Oldfield, N. J., Berry, A., Ala'Aldeen, D. A. A., Wooldridge, K.

- G., & Turner, D. P. J. (2010). The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: Surface localization and role in host cell adhesion. *Molecular Microbiology*, 76(3), 605–615.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07098.x>
57. Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, 11(12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
58. Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., & Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of mig1 protein repressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7267–7285.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>
59. Verano, D., (2011). Un aditivo funcional con amplio potencial de uso en la industria avícola., Colombia, Corpoica., 60 p.
60. Votýpka J., Modrý D., Oborník M., Šlapeta J., Lukeš J. (2016) Apicomplexa. In: Archibald J. et al. (eds) Handbook of the Protists. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6\\_20-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_20-1)
61. Walker, R. A., Ferguson, D. J. P., Miller, C. M. D., & Smith, N. C. (2013). Sex and Eimeria: A molecular perspective. *Parasitology*, 140(14), 1701–1717. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000838>
62. Wallach, M., Frölich, S., & Entzeroth, R. (2012). Comparison of protective immune responses to apicomplexan parasites. *Journal of Parasitology Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/852591>

63. Wang, C., Han, C., Li, T., Yang, D., Shen, X., Fan, Y., Xu, Y., Zheng, W., Fei, C., Zhang, L., & Xue, F. (2013). Nuclear translocation and accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase involved in diclazuril-induced apoptosis in *Eimeria tenella* (*E. tenella*). *Veterinary Research*, *44*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-29>
64. White, M. R., & Garcin, E. D. (2017). D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure and function. In *Sub-Cellular Biochemistry* (Vol. 83). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_15)
65. Yuño, M., & Gorgoza, L. (2008). Coccidiosis aviar, respuesta inmune y mecanismos de control. *Revista Veterinaria*, *19*(1), 61–66. <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/4304/3959>
66. Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., Wang, M., & Wang, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, *15*(11), 7961–7970. <https://doi.org/10.3390/molecules15117961>
67. Zhang, Z., Wang, S., Li, C., & Liu, L. (2017). Immunoproteomic analysis of the protein repertoire of unsporulated *Eimeria tenella* oocysts. Analyse immunoprotéomique du répertoire protéique des oocystes non sporulés d'*Eimeria tenella*. *Parasite (Paris, France)*, *24*, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017047>

## CITAS DE INTERNET

1. Dirección de investigación y evaluación Económica y Sectorial. Panorama agroalimentario. (2016). Avicultura Carne. 13 marzo del 2018 3:52pm  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200631/Panorama Agroalimentario\\_Avicultura\\_Carne\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200631/Panorama_Agroalimentario_Avicultura_Carne_2016.pdf)
2. Unión Nacional de Avicultores. Indicadores económicos. (2018) 16 abril 2018 2:05pm.  
<http://una.org.mx/images/yootheme/widgetkit/gallery/zoom/edospollo2018.jpg>
3. Cevallos Gordón, Ana Luisa Garces Gudiño, Jacobo Alexander. (2016). Correlación de parámetros productivos y sanitarios de pollos de engorde comercial con la concentración de ooquistes de *Eimeria* spp. en camas nuevas y rehusadas. 18 abril 2018, de Universidad del Ecuador. Repositorio digital 3:38 am. Sitio web:  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10231>

Cuernavaca, Morelos a 11 de octubre de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **MARILU MASS SÁNCHEZ**, con el título del trabajo: **Caracterización de la actividad anticoccidiana de una proteína de la levadura *Meyerozyma guilliermondii***.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación **por Tesis** como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
***Por una humanidad culta***

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ  
VILLAFUERTE

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN C. MAGDALENA HERNÁNDEZ ORTIZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN B. ROSALBA SALGADO MORALES

\_\_\_\_\_

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE** | Fecha:2021-10-11 15:57:24 | Firmante

ZV1PjINJG6PX/EBZHjAe7/t4VOT0itfoi3ddl/ll68iJp4GMquU8WEaUuv85+pTpYfssJNjKwjAOK4x+frhPR2hVF0EM+j0bTZkSrzdYUzXDgMw4uF6DmP/7LWVja0EnBGUztKsLvDH  
H+KLLHihztog9/a8LtlbUXE7edO5c75wZmEA/MyvYhDeRH85kS4bAGrtVCoDk6AVEQuHtP0TkK25cV4qFwc1jtZeoovVcrmAlkJZ9WMDj2jA5YuyBnWnkI7Hd8LjTCUfHByDvDrVdv  
Jr9fb580tAsm6e00+QzCc5l95HfC+clRg518m0emDjUI75ujCLST8/+jGu6MRnMKw==

**EDGAR DANTAN GONZALEZ** | Fecha:2021-10-11 18:35:06 | Firmante

H8BZZUvB/d6RoNsz6qhov7Vty6PbOIRwmCy+ZH2kQo5GUHauUBkw1JMVHRSe95E7NyLv/qL+oAMen5wWgN6sdzprxFOgjNmVRc0hwkMb59+XrNhykFOYurzfiuGy6xsMkZF  
wzi9U2DxobwCjITQrvbXtdfGrfYRZlxdjqYnxu5alvYT87HwPfnC0EFnNMuyTMmx0qjBTjdZmWfU1QSowpPZCYhCpYv7+axgpUHIgZ4QSeGq5Re9wJqAZZiYUppNKgSyLg3Fd6P6  
IYOUHPaeZ5GsB1a0lpw47CXWal17FwVTQvjp94D6G75bp149zJaNwABDLueQkwE9h7bGhuYdw==

**ROSALBA SALGADO MORALES** | Fecha:2021-10-12 10:34:03 | Firmante

OO4CMDHCd+rX8V673H0tckufwa6W31VkocXdaAo4MU3j5d9vN/IHcoxJzYcyMg89tg+TOS9NwRVqITWGANilZv3dQtT7klfVlGwgvvm6DvKQnzR9WKCmFDMj2bRVq/6c9aDXv1  
rz+MhPltLbt3MtlOnruHAQntN5l9rZY4WGDxpKW2XXyFrhk8slCQLYcZYmx0qTAl8vefd4ylyNjNrr79Bbvj8wZU3bJcKwBEKpNsSgRdb6w/E4CrQ8EV1f8C6adfbz5gGnAOFSlz/EwJ  
M038C9npb7Z9egyow0Z/1xhn24pm4hC7NK4lStaz7HZGPyB/uPhhKlwgCJJa25VZ++FYg==

**ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA** | Fecha:2021-10-18 10:00:13 | Firmante

qNIE/b0Yd3TAj+4M0FF3mJPTi5Ydv86qOvzHiuz57yvMTfuLjDGXVbM973/leoAeycXY5LpDAvRdS957fick1+q2Hq/3UL+CR6M5u7p2ki+RrhczOI5Bu4/CJMpYifFM0wmgYaLhgp  
7deFkojX7yF5nePkrgzqinWT9gNmFJfZBLzrH3reOGMBxxTkC1mX5P5Pm0Ap2s5dJRIhug3kWNQAQS2LOUxJIYqUivpfhnNGwBCa8RbKREBxkUtFYGHClLobnu4VthtloOLFzez  
7L8KgOzNdfitPbE6s2YvPeK+R7q2z1NjciTOWBZdecuulaHIN2uMRayt/q7iF6JEBzQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0QJ7M26IH

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hMLVrZakrJUiwVbLtl1SIJrtwQgCnsAky>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MAGDALENA HERNANDEZ ORTIZ | Fecha:2022-06-15 17:48:24 | Firmante**

HeF9Wm8GITIdC+WZYpGZz9dOxAmJFWx8/xaFQer/KSqFWDOPdls/vXv0iCi0iZYGdVUwmoCuuQLSWRFMtVdtUYP2eyXqdcz1i9Y9T671jvDN6kU79DV5Fab0QDKmZXhRkep  
tCz6zbMaUDtw0JxLzIAK1i0HdB+nwmNlxCXo+CiYH7Gh84qdoznVj8pHOk88B6ko7kSdE+UBQyKvUm6xNNRhJw8ao4UwYc0MiwDSLrSF+1153RSKHnHYdrAH4nK57ekwXepC  
udxisp5crR/dPOGKrm7lp9euwhzeHUPKVkUX0zZ30tRYdqBChIR3gweV5Jey9O5ZOABX0nAdVYBYyQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[tMdaPIW75](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Tjlvj6lodHy7TdOSe18zkPVz6RWnMnY1>

