



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE
FOLATOS, EN CLADODIOS DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*)

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

I.Q.A TANIA BRESHKOVSKAYA ORTIZ ESCOBAR

DIRIGIDO POR:

DR. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ

SINODALES:

Dr. Octavio Paredes López
Presidente

Dr. José Víctor Calderón Salinas
Secretario

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

Dr. Carlos Regalado González
Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Resumen

El nopal ha sido una fuente alimenticia en México desde la antigüedad, tiene gran importancia ecológica, económica y nutrimental; sin embargo, los estudios sobre sus beneficios a la salud y aspecto nutrimental son limitados. El análisis sobre la composición de alimentos de consumo cotidiano como el nopal puede proporcionarnos información valiosa sobre los efectos que se puedan tener al ser consumidos, tal es el caso del papel que juegan algunos compuestos en el tratamiento o prevención de enfermedades, como la fibra dietaria, antioxidantes, fitoquímicos y ácido fólico. En el caso del ácido fólico o folato se ha puesto especial atención por los efectos que se tienen si no hay una ingesta adecuada de este metabolito y la aparición de enfermedades como los defectos del cierre del tubo neural, cáncer, anemia megaloblástica, y de tipo cardiovascular. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la concentración de folatos en cladodios de nopal (*Opuntia ficus indica*) e identificar enzimas que participan en su biosíntesis, mediante análisis bioquímico y molecular. La determinación de folatos se efectuó por ensayo microbiológico y por ELISA. La identificación de las secuencias genéticas que codifican para las enzimas guanosin trifosfato ciclohidrolasa (gtpch1), aminodeoxicorismato sintasa (adcs), 6- hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfocinasa/ 7,8- dihidropteroato sintasa (hppk/dhps) se determinó por PCR, secuenciación, alineamiento y comparación. Mediante el análisis microbiológico empleando tres enzimas se cuantificó el contenido de folatos alcanzando una concentración de 5.094 ng/g. Por ELISA se obtuvieron valores de 5.5 a 5.6 ng/g, lo que sugiere la coincidencia de ambos métodos. Para comprobar la existencia de los genes en nopal se realizaron análisis tipo Southern blot. Se lograron identificar las secuencias genéticas de las enzimas adc sintasa y gtp ciclohidrolasa 1. En el análisis Southern blot se lograron detectar señales positivas para las enzimas gtp ciclohidrolasa 1 y hppk/dhps.

Palabras clave: ácido fólico, folatos, nopal, enzimas

Summary

Nopal (*Opuntia ficus indica*) is an important food source in Mexico since ancient times, because its economical, ecological and nutraceutical value, however studies on its health benefits and nutritional aspects have been scarce. The analysis on the composition of staple foods such as nopal can provide valuable information of the benefits of this crop on human health. Some of the compounds found in nopal, such as dietary fiber, antioxidants, folic acid and phytochemicals are used in the treatment or prevention of chronic diseases. Folic acid or folate is of great interest in human health since a low intake of this metabolite is related to defects in the neural tube, cancer, megaloblastic anemia and cardiovascular diseases. The aim of this study was to identify the enzymes involved in the biosynthesis route of folates in cladodes of nopal by molecular and biochemical analysis. The identification of the genetic sequences that codifying for Guanosine triphosphate gtp cyclohydrolase (gch1), aminodeoxychorismate synthase (adcs), 6-hidroxymethyl-7,8-dihydropterine pyrophosphokinase/7,8- dihydropteroate synthase (hppk/dhps) enzymes were determined by sequencing, alignment, comparison and PCR. Southern blot analysis was done to assess the presence of genes in nopal. The folate assessment was made by folate microbiological assays and by ELISA. The microbiological assays showed that folate levels were of 5.09 ng/g and those by ELISA were 5.5 to 5.6 ng/g, wich demonstrated the coincidence of both techniques. In this study the genetic sequences of adc synthase and gtp cyclohydrolase 1 enzymes were identified. Southern blot analysis showed the positive signals for gtp cyclohydrolase 1 and hppk/dhps enzymes.

Keywords: folic acid, folates, nopal, enzymes



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Octavio Paredes López

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al PROPAC, que me permitieron realizar mis estudios de maestría en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de posgrado.

Al CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, por haberme permitido realizar todo mi trabajo de investigación.

Al Dr. Octavio Paredes López, gracias por la confianza para la realización de este trabajo, por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación y por todas las sugerencias.

A la Dra. María Elena Valverde González, por su apoyo para la culminación de este trabajo, gracias por la confianza, consejos y todas las sugerencias.

Al Dr. Andrés Cruz Hernández, por el ánimo, apoyo constante y consejos que me brindó desde el inicio, gracias por haber compartido parte de su conocimiento y paciencia para la realización de este trabajo.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, gracias por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial, por las sugerencias y apoyo que me brindo durante la realización de este trabajo y por estar siempre dispuesto a ayudar. Gracias.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho, por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial, por sus aportaciones y consejos para mejorar este trabajo. Gracias.

Al Dr. Carlos Regalado González, por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial, por su confianza y ánimo desde el inicio de este trabajo. Gracias.

Al Dr. José Víctor Calderón Salinas, por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial, por toda su ayuda. Gracias

A las secretarias del DIPA: Carmelita y Laurita, gracias por toda la ayuda que me brindaron.

A la Sociedad Cooperativa Productores Nopaleros de Valtierra, S.C (PRONOPVAL) del municipio de Salamanca, por proporcionar el material vegetal para la realización de esta investigación.

A Talía, gracias por el material proporcionado para la culminación de este trabajo

A todos mis compañeros de laboratorio de Biotecnología de Alimentos pero de forma especial a los amigos que hicieron agradable mi paso por el CINVES: Damaris, Fabiola, Martha, Edith (Chabelita), Maribel, Gladys, Xavier y el Sanx, gracias por todos los buenos momentos que pasamos tomando cafecito y arreglando el mundo echando ciencia, además de aplicar el plan DNA 4 a los mal portados.

Dedicatorias

A mi mamá, por ser mi ejemplo de persistencia y tenacidad ante los momentos más difíciles, por todo el apoyo incondicional que me has brindado toda la vida, por tu amor, confianza y comprensión, gracias por ser mi mamá y creer en mí.

A Juan Manuel, gracias por todo el amor, por los momentos de felicidad y tristeza que hemos pasado juntos y de los días interminables que pasamos planeando el futuro, por todo el apoyo y comprensión.

A mis enanitos, Juan Manuel y Angel Alejandro, son las personitas más importantes para mí y les agradezco formar parte de mi vida, gracias por ser tan fuertes y por los momentos que me alentaron con su sonrisa para seguir adelante.

A Dios, por permitirme llegar a la meta y sobre todo por darme esta bonita familia.

Índice

	Página
Resumen.....	ii
Summary.....	iii
Agradecimientos.....	v
Dedicatorias.....	vii
Índice.....	viii
Índice de cuadros.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
A. NOPAL.....	3
1. Historia.....	3
2. Taxonomía.....	5
3. Fisiología.....	6
4. Hábitat.....	8
5. Importancia del cultivo del nopal.....	8
5.1 Aprovechamiento.....	8
5.2 Aplicaciones.....	9
5.2.1 Sustrato para la obtención de pigmentos.....	9
5.2.2 Materia prima para la industria.....	10

5.2.3 Cultivo frutal.....	11
5.2.4 Cultivo forrajero.....	11
5.2.5 Cultivo hortícola.....	11
5.3 Composición química del nopal.....	12
5.3.1 Agua.....	14
5.3.2 Carbohidratos.....	14
5.3.3 Minerales.....	15
5.3.4 Proteínas, vitaminas y aminoácidos.....	15
5.4 Potencial nutracéutico.....	15
B. FOLATOS.....	17
1. Definición.....	17
2. Estructura y funciones de los folatos.....	18
2.1 Estructura química.....	18
2.2 Funciones bioquímicas.....	20
3. Ruta de biosíntesis de folatos en plantas.....	23
3.1 Síntesis de hidroximetildihidropterina.....	25
3.2 Síntesis de ácido p-aminobenzoico.....	25
3.3 Formación de tetrahidrofolato.....	25
4. Ciclo de la fotorrespiración.....	26
5. Importancia del consumo de folatos.....	29
5.1 Absorción y metabolismo.....	29
5.2 Enfermedades causadas por la deficiencia de folatos.....	31
5.3 Deterioro del metabolismo de folatos inducido por fármacos.....	35

6. Recomendaciones de la ingesta de folatos y fuentes principales.....	36
6.1 Ingesta diaria recomendada.....	36
6.2 Fuentes principales de folatos.....	40
7. Métodos analíticos para la determinación de folatos en alimentos.....	42
7.1 Ensayo microbiológico.....	42
7.2 Análisis por cromatografía.....	44
7.3 Prueba de ELISA.....	44
III. JUSTIFICACIÓN.....	45
IV. OBJETIVOS.....	46
A. GENERAL.....	46
B. ESPECÍFICOS.....	46
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
A. MATERIALES.....	47
1. Material vegetal.....	47
2. Cepas bacterianas.....	47
3. Enzimas de digestión.....	47
4. Controles.....	47
5. Vector de clonación.....	47
B. MÉTODOS.....	50
1. Análisis bioquímico.....	50
1.1 Evaluación de la presencia de folatos	
en nopal por ensayo microbiológico.....	50
1.1.1 Preparación de cultivos crioconservados	50
1.1.2 Determinación de la curva estándar.....	51

1.1.3 Tratamiento enzimático de las muestras.....	51
1.1.4 Incubación del microorganismo con las muestras y determinación del contenido de folatos.....	53
1.2 Determinación de la concentración de folatos en nopal por ELISA.....	53
1.2.1 Homogenización de las muestras.....	53
1.2.2 Determinación de la concentración de folatos.....	54
1.2.3 Curva estándar y análisis de la concentración de folatos...	55
2. Análisis molecular.....	56
2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
2.1.1 Amplificación de los fragmentos por PCR.....	56
2.1.2 Preparación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> TOP 10 F'.....	59
2.1.3 Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i>	60
2.1.4 Minipreparaciones para la extracción de DNA plasmídico.....	61
2.1.5 Digestión de los plásmidos recuperados en las minipreparaciones.....	62
2.1.6 Secuenciación, comparación y alineamiento.....	62
2.2 Análisis tipo Southern blot.....	63
2.2.1 Extracción de DNA genómico de tejido vegetal.....	63
2.2.2 Preparación, digestión y purificación de la sonda.....	64
2.2.3 Digestión de DNA genómico.....	65

2.2.4 Desnaturalización, neutralización y transferencia de DNA.....	66
2.2.5 Marcaje de sondas radiactivas.....	67
2.2.6 Hibridación y exposición.....	67
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
1. Análisis bioquímico.....	68
1.1 Evaluación de folatos por ensayo microbiológico.....	76
1.2 Determinación de folatos por ELISA.....	76
2. Análisis molecular.....	79
2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	79
2.1.1 Amplificación de los fragmentos por PCR.....	79
2.2 Comparación y alineamiento de las secuencias nucleotídicas.....	97
2.3 Análisis Southern blot.....	97
VII. CONCLUSIONES.....	101
VIII. PERSPECTIVAS.....	102
IX. LITERATURA CITADA	103

Índice de Cuadros

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica del nopal verdura.....	5
2. Valor nutrimental del nopal.....	13
3. Antecedentes de estudios clínicos sobre la importancia de los folatos en la prevención de cáncer.....	34
4. Ingesta diaria recomendada de folatos.....	37
5. Contenido de folatos en vegetales, frutas y algunos alimentos de origen animal.....	41
6. Componentes de la mezcla de reacción para PCR de las enzimas gtpch1, adcs, hppk/dhps.....	57
7. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para la enzima gtp ciclohidrolasa 1.....	57
8. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para la enzima aminodeoxicorismato sintasa.....	58
9. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para la enzima hidroximetildihidropterina pirofosfocinasa/ dihidropteroato sintasa.....	58
10. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima gtp ciclohidrolasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
11. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima adcs de <i>Arabidopsis thaliana</i>	87

12. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima hppk/dhps de <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
13. Comparación de la secuencias obtenidas de la enzima gtpch1 en nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	95
14. Comparación de las secuencias genéticas obtenidas de la adcs en nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	96

Índice de Figuras

Figura	Página
1. Composición química de los folatos.....	19
2. Suministro de unidades de carbono diversas rutas metabólicas mediante las diferentes especies de folatos.....	21
3. Ruta de biosíntesis de folatos en plantas.....	24
4. Ciclo de la Fotorrespiración.....	28
5. Mapa de las características del vector Pcr 2.1- TOPO y la secuencia circundante, así como el sitio de clonación.....	48
6. Esquema general de trabajo.....	49
7. Curva estándar para la cuantificación de folatos por ensayo microbiológico.....	69
8. Concentración de folatos en muestra de nopal y espinaca Tratamiento con una enzima.....	71
9. Concentración de folatos en muestras de nopal y espinaca Tratamiento doble con dos enzimas.....	73
10. Concentración de folatos en muestras de nopal y espinaca Tratamiento con tres enzimas.....	75
11. Curva estándar par la cuantificación de folatos en nopal y espinaca por ELISA.....	77
12. Comparación de los niveles de folatos en nopal y espinaca.....	78

13. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima gtpch1 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
14 . Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima adc sintasa en <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
15. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima hppk/dhps en <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
16. Clonación de los productos de la amplificación.....	84
17. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima gtpch1 en nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	90
18. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima adc sintasa en nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	91
19. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima hppk/dhps en nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	92
20. Clonación de los productos de la amplificación.....	93
21. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la enzima gtpch1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	98
22. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la enzima adcs de <i>Arabidopsis thaliana</i> y nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	99
23. Análisis tipo Southern blot de muestras de nopal.....	100

I. INTRODUCCIÓN

El nopal ha sido un alimento tradicional en la dieta del pueblo mexicano desde la antigüedad. Se ha considerado parte del desarrollo esencial de una agricultura estable entre los mexicanos. Es una buena fuente de ingresos para muchos agricultores que no cuentan con recursos económicos y que viven en zonas áridas y semiáridas, tiene gran resistencia a la sequía, altas temperaturas y adaptabilidad a suelos poco fértiles, debido a su gran eficiencia en el uso del agua (ASERCA, 2001).

El aprovechamiento de este cultivo es una de las contribuciones principales de la agricultura de México, para la producción de tuna, así como de los cladodios para consumo humano. Por otro lado, en regiones donde la agricultura es escasa, el nopal como alimento para ganado es un valioso recurso ya que presenta una buena fuente de forraje y sobre todo muy barato (Corrales-García, 2000).

La demanda de nopal en México es superior a los 6 kg per cápita; es la sexta hortaliza por consumo en el país, después de la papa, tomate, chile verde, cebolla y sandía (Flores-Valdez, 2001).

El contenido nutrimental del nopal ha sido sujeto de controversias, algunos autores han clasificado al nopal como una verdura de bajo contenido nutrimental, mientras que otros resaltan sus atributos alimenticios (Felker, 2002). Sin embargo, es de suma importancia analizar la composición química de frutas y hortalizas ya que hay evidencias de que contienen algunos nutrientes que al ser consumidos producen efectos benéficos a la salud (Feugang, 2006).

Tal es el caso de las vitaminas, que son esenciales para el desarrollo y funcionamiento de todas las células que componen el organismo humano, de ellas depende el mantenimiento de un estado de vida saludable. Las deficiencias presentan desórdenes clínicos, como el ácido ascórbico causa irritabilidad, anemia y susceptibilidad infecciones; la falta de tiamina puede causar beriberi que incluye: fatiga, irritabilidad, depresión, disturbios gastrointestinales y cardiovasculares (Guzmán-Maldonado, 1999).

Una de las vitaminas de gran importancia es el folato que pertenece al grupo B, concretamente la vitamina B9, incluye a los folatos alimentarios naturales y al ácido fólico. Son esenciales en el metabolismo al actuar como cofactores en las reacciones de transferencia de unidades de carbono en rutas metabólicas de importancia celular como el “ciclo de biosíntesis de DNA” y “ciclo de la metilación” (Scott y col., 2000).

El déficit grave de folatos se asocia con la aparición de enfermedades como anemia megaloblástica, riesgo de partos prematuros, lactantes de bajo peso al nacer y retardo del crecimiento. Las complicaciones más graves por la deficiencia son: los defectos del cierre del tubo neural conduciendo a la aparición de anencefalia y espina bífida (Mercereau, 2004); además de paladar hendido y labio leporino (Botto, 2004; CDC, 2006).

Por la importancia que tiene el consumo de folatos para la prevención y tratamiento de enfermedades, es necesario identificar alimentos disponibles y de fácil acceso para la población, que sean fuente de folatos y se puedan manipular genéticamente para incrementar la síntesis de esta vitamina, por lo cual, en este trabajo nos propusimos cuantificar la concentración de folatos en cladodios de nopal (*Opuntia ficus indica*) e identificar enzimas que participan en su biosíntesis.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. NOPAL

El nopal es una planta de la familia de las cactáceas, originario del Continente Americano. Nuestro país es considerado como centro de la biodiversidad y muchos consideran que las zonas áridas y semiáridas son su centro de origen (Paredes y col., 2006).

1. Historia

El nopal es esencial en el desarrollo del pueblo y cultura de México; junto al maíz y maguey se consideraron la base de una agricultura estable entre los mexicanos (Betancourt y col., 2006).

El nopal se utilizó en nuestro territorio, desde hace 7,000 años, principalmente las semillas, cáscaras de tuna y fibras de pencas. Dentro de la historia de México, el nopal es un elemento fundamental para la fundación de la cuna de la civilización azteca ya que es una imagen ligada a su desarrollo (ASERCA, 2001).

El inicio del cultivo del nopal para consumo humano es desconocido; sin embargo, numerosas tribus errantes concurrían durante la época de fructificación a lugares donde abundaban poblaciones silvestres de la planta para recolectar partes reproductivas y vegetativas. Los cladodios jóvenes, las flores y los frutos eran utilizadas como alimento por los indígenas, también se tienen evidencias del aprovechamiento del nopal como planta medicinal (Pimienta-Barrios, 1993).

Los primeros conquistadores percibieron la importancia del nopal en las culturas prehispánicas y diseminaron la planta en América y Europa. Fue plantado en Portugal y el sureste de España, de ahí se distribuyó a distintas partes del mundo. La expansión de esta planta no fue por motivos económicos, sino por su aspecto peculiar, que llamó la atención de los colectores botánicos europeos. Su dispersión fue muy grande y rápida, para 1552 ya se localizaban en jardines botánicos y mansiones aristocráticas (Muñoz de Chávez y col., 1995).

Actualmente se le encuentra cultivada y silvestre en Italia, Argelia, Marruecos, Túnez, Grecia, Israel, India, Filipinas, Colombia, Estados Unidos, entre otros. En Chile el nopal fue introducido durante la Colonia y desde entonces ha desempeñado en papel importante en zonas semiáridas y marginadas. A Brasil llegó como forraje, una de las más grandes contribuciones a la economía de las zonas semiáridas de ese país (Mondragón y Bordelon, 2002).

Por otro lado, el nopal en algunas partes ha sido contraproducente debido a su agresividad, al grado de combatirlo biológicamente con enemigos naturales como *Cactoblastis coctorum* y *Dactilopius opuntia* (Granados y Castañeda, 2003).

En la actualidad sólo en tres países se cultiva de nopal con propósitos comerciales, México, Chile y el Sur de los Estados Unidos. Para el cultivo de tuna sobresale Italia y sólo México produce cladodios para consumo humano (SEMARNAP, 1997). La superficie cultivada en nuestro país es superior a las 50000 hectáreas y de material silvestre es de 3 millones (Paredes y col., 2006).

2. Taxonomía

En nuestro país se han identificado diversas especies de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*. El género *Opuntia* en México presenta cinco subgéneros, 17 series y 104 especies. El género *Nopalea* presenta 10 especies, de las cuales *Nopalea cochenillifera* se utiliza como nopal verdura. De las especies de *Opuntia* y *Nopalea* se utilizan para forraje 15 especies, 5 cinco para fruta y tres para verdura (Paredes y col., 2006). La clasificación taxonómica del nopal verdura se puede observar en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nopal verdura

REINO	Vegetal
SUBREINO	Embryophyta/Siphonogama
DIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Dicotyledonea
SUBCLASE	Dialipétalas
ORDEN	Opuntiales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Opuntioideae
TRIBU	Opuntieae
GÉNEROS	Opuntia y Nopalea
SUBGÉNERO	Platyopuntia

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorado, 1991)

El género *Opuntia* comprende plantas bien definidas, presenta hojas convertidas en espinas, la flor es hermafrodita, hemicíclica, con el eje floral frecuentemente largo, su color es variable, el fruto de este género es una baya carnosa, normalmente jugosa y comestible (Granados y Castañeda 2003).

Entre las características más sobresalientes del género *Opuntia* y en particular la *Opuntia ficus-indica* se pueden citar: el éxito que tiene en los sistemas donde los agricultores no cuentan con recursos necesarios y viven en zonas áridas y semiáridas así como una alta resistencia a la sequía, a las altas temperaturas y adaptabilidad a suelos poco fértiles, debido principalmente a su gran eficiencia en el uso del agua por la apertura estomatal nocturna que evita la pérdida de agua, reducción o pérdida total de las hojas y presencia de espinas (Guzmán y Chávez, 2007).

3. Fisiología

El nopal está formado por un tallo globoso, erecto y/o rastrero, cilíndrico y las ramas son aplanadas, conocidos comúnmente como raquetas o pencas (Esparza y col., 2003). La forma y grosor es variable, así como su color, el mismo que varía del verde claro hasta el gris o ceniza, según la edad de la planta (Guzmán y Chávez, 2007), carece de hojas, el tallo posee una epidermis provista de una cutícula gruesa y cerosa con areolas espinosas. Tiene un parénquima abundante con clorofila que le permite capturar la energía solar, existe un parénquima esponjoso y grueso donde almacena agua y nutrientes de reserva que le permite soportar largos meses de sequía (Wallace y Gibson, 2002; Sáenz y col., 2004). La epidermis tiene tres funciones principales: 1) regular el movimiento del bióxido de carbono hacia el interior y del oxígeno hacia el exterior del cladodio 2) retener el agua dentro del cladodio 3) proteger al cladodio del ataque de hongos, bacterias, insectos y plagas (Granados y Castañeda, 2003).

Las raíces del nopal son pivotantes gruesas y sus dimensiones aumentan en relación proporcional al crecimiento de la parte aérea de la planta; dependiendo de la especie de nopal y las condiciones del suelo en el que crece, las raíces llegan a medir hasta 8 metros de largo. La raíz es el órgano por el cual las plantas absorben del suelo los nutrientes y el agua, al inicio de las lluvias el nopal desarrolla raíces secundarias y pelos que absorben el agua con rapidez, al iniciar la sequía las raíces se enjutan (secan) y desprenden, al igual que las hojas; en muchas especies se han transformado en espinas, con lo cual la planta pierde menos humedad. Las espinas protegen al nopal del consumo por los animales y atenúan el efecto secante del viento, con lo cual disminuye la pérdida de humedad (Flores-Valdez, 2002).

Las flores del nopal brotan a partir de las areolas que se localizan en el lomo y en los bordes de la parte superior de las pencas. En la época de la floración (marzo, abril y mayo) de cada areola puede brotar una flor. En general las flores son grandes (7-10 cm de largo) de color siempre vivo y brillante, rojo, salmón, rosa, anaranjado o amarillo. Posee una gran cantidad de estambres y sus pétalos presentan colores muy atractivos. El fruto es una baya seca o jugosa con semillas rodeadas de un hilo grueso (Feugang y col., 2006).

El nopal sigue el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM), lleva a cabo la fotosíntesis y absorbe el bióxido de carbono (CO_2) durante la noche, aprovechando que sus estomas se encuentran abiertos. Durante el periodo de oscuridad, el almidón se degrada por glicólisis hasta fosfoenol piruvato. El CO_2 absorbido reacciona con el fosfoenol piruvato para formar oxalacetato, el cual posteriormente se reduce a ácido málico, este ácido se concentra en las vacuolas de las células epidérmicas y hace que los nopales puedan absorber agua y almacenarla (Anaya-Pérez, 2001).

La ventaja de este proceso es que el intercambio gaseoso se hace en horas del día en que la temperatura es más baja y el aire tiene mayor humedad; se minimiza la pérdida de agua y las obliga a desarrollar grandes masas de tejido no fotosintético para la acumulación diurna de moléculas con energía y nocturna de ácidos orgánicos, producto de la fijación del bióxido y la acumulación de agua en sus células (Paredes y col., 2006).

4. Hábitat

El nopal se localiza en la mayoría de las condiciones ecológicas de nuestro país, puede cultivarse en altitudes sobre el nivel del mar desde los 800 hasta los 2500 metros. Muestra adaptabilidad a condiciones adversas, crece en suelos pobres, sueltos, arenosos ligeramente alcalinos y de profundidad media. Esto ha provocado su distribución alrededor del mundo (García y col., 2007).

El nopal es sensible a las heladas, tolera los climas extremos de las zonas áridas, con temperaturas extremas de 10°C como mínimo y 50°C como máximo. Resiste periodos prolongados de sequía, pero requiere vivir en áreas en las que anualmente llueve. Durante el periodo de lluvia, el nopal absorbe y almacena la mayor cantidad de agua posible y cuando la sequía es prolongada, la planta dispone del líquido (Corrales-García, 2000).

5. Importancia del cultivo del nopal

5.1 Aprovechamiento

El aprovechamiento de este cultivo es una de las principales contribuciones a la agricultura que se practica en las zonas áridas de nuestro país y el mundo, la cual se inicio con el establecimiento de las primeras poblaciones donde se desarrolló el sistema de producción en los traspatios.

En estos solares el campesino acopió plantas nativas que le servían como alimento, forraje, medicina y ornamento. Al cultivarlo se creó una condición artificial que facilitó la cruce entre diversas especies, creando nuevas combinaciones. El proceso que empleaban los productores para formar nuevas variedades consistía en realizar una selección de fenotipos, considerando la calidad de los frutos (tamaño, color), fechas de maduración, capacidad de adaptación a las heladas durante la floración, sequía, vientos secos y sobrevivencia al daño, así como la resistencia y sensibilidad de los frutos durante la cosecha y el embalaje (SEMARNAP, 1997).

5.2 Aplicaciones

El nopal tiene diversas aplicaciones entre las que se encuentran: como sustrato para la obtención de pigmentos, materia prima para la industria de cosméticos, a nivel experimental se ha obtenido fructosa y pectina, también como cultivo frutal, planta forrajera, cercos para casa, jardín y parcelas agrícolas, protección del suelo y como cultivo hortícola (Corrales-García, 2000).

5.2.1 Sustrato para la obtención de pigmentos

El nopal ha tenido una gran importancia en la producción de pigmentos naturales a partir del cultivo de la grana o cochinilla (*Dactylopius coccus*), insecto utilizado como tinte desde la época prehispánica hasta nuestros días. Hoy tiene un amplio potencial de uso como colorante aditivo en alimentos, cosméticos, fármacos y otras aplicaciones especializadas (Stintzing y Carle, 2005). La creciente demanda de productos libres de aditivos sintéticos se debe a las alergias, e incluso cáncer, que producen los colorantes artificiales.

Por ello el uso de este colorante orgánico fue aceptado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América y por la comunidad Económica Europea, perfilando al insecto como una excelente alternativa para sustituir a los tintes sintéticos (Basile, 2001).

5.2.2 Materia prima para la industria

La forma más generalizada de industrializar el nopalito es en salmuera y en escabeche, aunque también se elaboran dulces, los más comunes son la mermelada de nopalito y los nopalitos cristalizados (Flores-Valdez, 2001).

En la industria de cosméticos se utiliza como base en la fabricación de jabones, cremas, shampoo y enjuagues (Sáenz, 2000; Sáenz- Hernandez, 2002). Así mismo, el mucílago se utiliza como fijador en la elaboración de pinturas y en la industria de la construcción para mejorar la durabilidad y resistencia de mezclas o morteros. También se ha empleado en la construcción de viviendas como adherente, se utiliza en el medio rural para mejorar el encalado en paredes de casas habitación, de bardas de piedra y troncos de árboles, existen experimentos a nivel laboratorio en la fabricación de pintura vinílica utilizando nopal. El uso de las pencas, como clarificante de agua, donde se aprovechan las propiedades de adsorción del mucílago y de las gomas de las pencas. (Corrales-García, 2000; Sáenz, 2000; Majdoub y col., 2001; Alvarado y Díaz, 2003; Hernández y Serrano, 2003).

El nopal también se utiliza como materia prima para la producción de artesanías, la fibra se utiliza en la manufactura de canastas y floreros, además es posible obtener papel de calidad y también pectina del nopal (Flores-Valdez, 2001).

5.2.3 Cultivo frutal

El cultivo de nopal para producir tunas es uno de los usos más importantes de esta planta en México y otros países. El valor nutritivo y alto contenido de vitamina C y azúcares se compara con la manzana, pera, naranja, chabacano, ciruela, fresa, frambuesa y durazno (Gallegos y Méndez, 2000; Gurrieri y col., 2000; Habibi y col., 2005).

5.2.4 Cultivo forrajero

Uno de los usos que se le ha dado al nopal en el país es como alimento para ganado. Aunque el forraje es tosco, rico en agua y pobre en materia seca, es un valioso recurso para los ganaderos para mejorar la calidad del producto lácteo, presenta una buena fuente de forraje y muy barato, principalmente para las regiones desérticas, semidesérticas o de una escasa agricultura (Nobel, 2001; Nefzaoui y Salem, 2002).

5.2.5 Cultivo hortícola

El uso de cladodios jóvenes o nopalitos como verdura se remonta a las culturas mesoamericanas, colectoras de brotes tiernos en plantas silvestres. Eran utilizados como alimento por los indígenas, los nopalitos eran cocinados, tostados en el comal y guisados con carnes de animales silvestres (venado, armadillo y conejo), o con otras verduras (SEMARNAP, 1997).

La explotación del nopal para usarlo como verdura en el consumo humano, tanto en fresco como en diversos guisados, constituye una parte importante en la economía familiar de los habitantes de ciertas regiones del país las cuales presentan condiciones ambientales propicias para el cultivo.

Por otro lado los hábitos alimentarios de la población han dado a los nopalitos cierta importancia dentro de la dieta (Granados y Castañeda, 2003). Los nopales han sido un alimento en México por cientos de años; actualmente su consumo se ha difundido en Estados Unidos y Europa, como vegetal y fruta. Se puede usar en ensaladas, sopas, guisos, la fruta se emplea en fresco, dulces y jaleas. (Paredes y col., 2006).

Todas las especies *Opuntia* son comestibles desde el momento en que no son tóxicas. Sin embargo, algunas especies son más fáciles de utilizar que otras y esto estriba básicamente en el contenido de espinas. Los nopales silvestres desarrollan más cantidad de espinas puesto que éste es su medio de supervivencia. Cabe resaltar que se ha trabajado exhaustivamente en cultivar una variedad sin espina que contenga menos mucílago y resista bajas temperaturas (Granados y Castañeda, 2003).

No obstante, se ha desarrollado también mucho trabajo acerca del mucílago como un suplemento dietético para incrementar la ingesta de fibra soluble, la cual aporta varios beneficios a la salud (Sáenz y col., 2004).

Recientemente se ha popularizado mucho el consumo del nopal licuado combinado con algún jugo de frutas. Sin embargo, a algunas personas les resulta un poco molesta la sensación que causa el mucílago que desprende el nopal (Feugang, 2006).

5.3 Composición química del nopal

La importancia del nopal comienza por que es una fuente variada de compuestos nutricionales (Granados y Castañeda, 2003). Tiene un valor nutricional entre la lechuga y espinaca (Betancourt y col., 2006). Cuadro 2.

Cuadro 2. Valor nutrimental del nopal

Componente	Cladodio (g / 100 g bh)
Agua %	88-95
Carbohidratos	3-7
Cenizas	1-2
Fibra	1-2
Proteína	0.5-1
Lípidos	0.2
Minerales	(mg / 100 g bh)
Calcio	93
Hierro	1.6
Sodio	2
Potasio	166
Vitaminas	(mg / 100 g bh)
Ácido ascórbico	7-22
Tiamina	0.14
Riboflavina	0.60
Niacina	0.46
Carotenoides	11.3-53.5 µg

(Stintzing y col., 2001; Stintzing y Carle, 2005; Stintzing y col., 2005; Tesoriere, y col., 2005)

Aunque algunos autores han clasificado al nopalito como una verdura de bajo contenido nutrimental, otros resaltan sus atributos alimenticios, principalmente si se considera que en zonas áridas y semiáridas del país se tiene poco acceso al consumo de cultivos básicos (Felker, 2002).

Se considera que el nopal está constituido principalmente por agua, cantidades bajas de carbohidratos, proteínas, fibras y un contenido moderado de vitaminas, minerales y calcio (López-García y col., 2001; Habibi y col., 2005).

5.3.1 Agua

Los cladodios jóvenes y en proceso de desarrollo pueden contener de 90 a 95% de agua, algunos de los tejidos de la planta con el tiempo se van endureciendo para darle la rigidez estructural necesaria que permita el crecimiento adecuado y por lo tanto contiene menos agua. La cantidad de agua en los nopalitos es similar a la encontrada en acelga, calabacita, jitomate, lechuga, romero y ejote (Pimienta-Barrios, 1990).

5.3.2 Carbohidratos

En el nopal los procesos fotosintéticos condensan y almacenan carbohidratos que se encuentran disponibles como energía de reserva. Están presentes en forma de polisacáridos, monosacáridos y pentosas, entre otros. Todas las especies contienen además celulosa, almidón y dextrinas. Una característica que sobresale del nopal es la gran cantidad de mucílago que contiene, esta sustancia es un conjunto de monosacáridos, complejo e indigerible, el cual ayuda a retener agua dentro de la planta (Habibi y col., 2002; Habibi y col., 2003; Habibi y col., 2005).

5.3.3 Minerales

La composición proximal del nopal en base seca muestra un alto contenido de cenizas y aquí se encuentran los minerales que varían de acuerdo al tipo de suelo y condiciones climáticas, en mayor proporción se encuentra el calcio, magnesio, sodio, potasio y hierro (Stintzing y Carle, 2005).

5.3.4 Proteínas, vitaminas y aminoácidos

El contenido de proteína es bajo, por lo que su consumo debe ser complementado con otras fuentes, como el amaranto o frijol. Sin embargo, a pesar del bajo contenido, el análisis de los aminoácidos revela que se encuentran en buena cantidad los esenciales para el ser humano, como la lisina, isoleucina y treonina (Paredes y col., 2006).

Los nopales de origen silvestre tienen las más alta proporción de proteína. También existen niveles altos de los aminoácidos prolina y taurina (Stintzing y col., 2005) así como de β -caroteno, luteína y criptoxantina (Betancourt y col., 2006). En frutos y nopalitas se encuentran las vitaminas C, niacina, tiamina y riboflavina (Feugang y col., 2006).

5.4 Potencial nutracéutico

Son pocos los trabajos científicos que se han realizado para determinar los efectos benéficos del nopal sobre la salud. Se le atribuye que su consumo acelera el metabolismo de la glucosa en la sangre debido a la estimulación de la secreción de insulina logrando con esto estabilizar y regular el nivel de azúcar sanguíneo evitando que no se sinteticen ácidos grasos ni colesterol (Cicero y col., 2004).

En México y Estados Unidos ha llamado la atención el contenido de fibra para el tratamiento de problemas digestivos y obesidad (Sáenz, 2000; Galati y col., 2003; Laurenz y col., 2003; Paredes y col., 2006). Se sabe que la fibra ayuda a la prevención de cáncer de colon y a disminuir ciertos trastornos digestivos como el estreñimiento (Zou y col., 2005). Las fibras insolubles que contiene, crean una sensación de saciedad y ayudan a una buena digestión. Por otro lado el nopal contiene 17 aminoácidos de los cuales 8 son esenciales por lo que deben ser ingeridos en los alimentos, estos proveen de mayor energía y ayudan al cuerpo a bajar el nivel de azúcar en la sangre, disminuyéndose la fatiga y el apetito, a la vez de que provee de nutrientes (Majdoub y col., 2001; Stintzing y col., 2005).

El fruto se utiliza como cataplasma, la pulpa hervida con agua y azúcar se utiliza para casos de tos severa; la fruta asada se emplea para curar la tos y la cáscara para enfermedades de los riñones, se ha encontrado que el mucílago en la pulpa del fruto tiene acción laxativa, en otros países se prepara un té de flores de nopal tunero para problemas renales y una pasta de flores secas para curar el sarampión. Las pencas para sanar heridas y los extractos de cladodios son útiles para el tratamiento de úlceras estomacales y micciones ardientes, En nuestro país se usa una bebida de agua y partes de cladodio para las mujeres con dificultades en el parto, (Flores-Valdez, 2001).

Los aspectos medicinales más recientemente dados al nopal incluyen: el tratamiento de celulitis y la aceleración del metabolismo de la glucosa en sangre debido a la estimulación de la secreción de insulina; por otro lado, debido al contenido de minerales, ayuda a la eliminación de toxinas presentes en el organismo y además el consumo de nopal provoca funciones antiestresantes (Paredes y col., 2006).

El gran número de nutrientes potencialmente activos y sus propiedades multifuncionales hacen que el nopal sea un perfecto candidato para la producción de alimentos saludables, así como de suplementos alimenticios, logrando que estas propiedades sean atributos de calidad que ayuden a incrementar su consumo en el futuro (Lee y col., 2005).

Sin embargo, son escasos los estudios de los efectos que causa el consumo de nopal en el metabolismo humano (Stintzing y col., 2005). Esto hace necesario la búsqueda de nutrientes que sean importantes para la salud humana. Tal es el caso los folatos, compuestos de suma importancia por su acción sobre el metabolismo celular así como en la prevención y tratamiento de enfermedades.

B. FOLATOS

1. Definición

Folato es un término que se ha utilizado en forma genérica para una vitamina hidrosoluble (del latín, *folium*, hoja) que incluye a los folatos alimentarios naturales y al ácido fólico de los suplementos y alimentos enriquecidos. Fue descubierta por Lucy Wills en 1931 como componente de la levadura, hígado y hojas verdes, capaz de curar la anemia perniciosa. Sin embargo, esto sucedió 15 años antes de elucidar la estructura del folato, este retraso en la identificación de la estructura del “factor Wills” se debió a la diversidad de las especies de folatos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada llamo al “factor” descubierto por Wills ácido pteroilglutámico; sin embargo, los nombres triviales ácido fólico y folato son los más comúnmente usados (Quinlivan y col., 2006).

Los folatos son vitaminas del grupo B, concretamente la vitamina B9, esenciales en el metabolismo al actuar como cofactores en las reacciones de transferencia de unidades de carbono en una serie de rutas metabólicas que son de extrema importancia celular, como el “ciclo de biosíntesis de DNA” y “ciclo de la metilación” (Scott y col., 2000).

2. Estructura y funciones de los folatos

2.1 Estructura química

Los folatos son moléculas bastante complejas compuestas químicamente de tres partes, un anillo de pteridina unido al ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA) y una cadena de glutamato con un número variable de residuos de glutamato. Figura 1.

La mayoría de los folatos naturales posee una cadena lateral que contiene de cinco a ocho residuos de glutamato unidos por enlaces γ -peptídico. El término ácido fólico se refiere, a la forma monoglutámica completamente oxidada de la vitamina. Se sintetiza en forma comercial para suplementos y alimentos enriquecidos, raramente existe en la naturaleza (Scott y col., 2000; Cook, 2001).

Las formas naturales de folatos difieren en la longitud y estado de reducción del grupo pteroil, la naturaleza de los sustituyentes en el anillo de pteridina a ácido dihidrofólico y tetrahidrofólico, el número de residuos de glutamato unidos al grupo pteriol y la sustitución de unidades de carbono en las posiciones 5 y 10 formando puentes entre ambas (Olivares y col., 2005).

Estos folatos naturales incluyen 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, 10-formiltetrahidrofolato, 5, 10-metilentetrahidrofolato, 5,10-meteniltetrahidrofolato, 5-forminotetrahidrofolato, 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato y dihidrofolato (Rébeille y col., 2006).

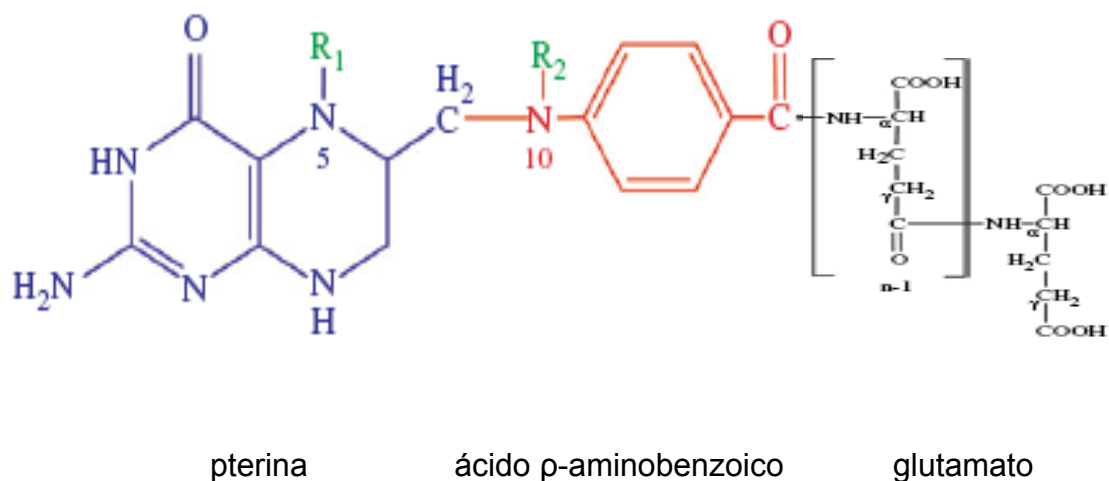


Figura 1. Composición química de los folatos

2.2 Funciones bioquímicas

Los folatos son intermediarios cruciales de una serie de reacciones y están directamente involucrados en la síntesis de ácidos nucleicos, metionina, pantotenato, glicina y serina e indirectamente a través del agente metilador básico la S-adenosil metionina en todas las reacciones de metilación (Rébeille y col., 2006).

En la Figura 2 se muestra la función central de la molécula aceptora de folatos, una forma poliglutamilo del tetrahidrofolato, en las vías dependientes de los folatos, sobre la síntesis de los nucleótidos y las reacciones de metilación.

Los folatos suministran unidades de carbono a rutas metabólicas de importancia celular: 10-formil tetrahidrofolato es necesario para la biosíntesis de purinas y formil-metionina-tRNA; el tetrahidrofolato se convierte en 5, 10-metilen tetrahidrofolato junto con la interconversión de serina y glicina, esencial para la síntesis de timidilato y pantotenato. La síntesis de pirimidina depende de la disponibilidad de 5, 10 metilen tetrahidrofolato, una coenzima necesaria para donar un carbono en la producción de desoxitimidilato monofosfato a partir de desoxiuridilato monofosfato. Este paso durante el ciclo celular permite que continúe la replicación del DNA. La transferencia incluye el grupo metileno y un hidrógeno de la coenzima. El producto oxidado del folato es el dihidrofolato, que posteriormente se regenera a tetrahidrofolato; 5-metil tetrahidrofolato suministra el grupo metilo requerido para la transformación de homocisteina en metionina (Hanson y Roje, 2001)

El folato es importante en la síntesis de purinas guanina, adenina, pirimidinas, timina, citosina y uracilo, necesarios en la formación de ácidos nucleicos. El folato es esencial para la formación de eritrocitos y leucocitos en la médula ósea y para su maduración (Li y col., 2003).

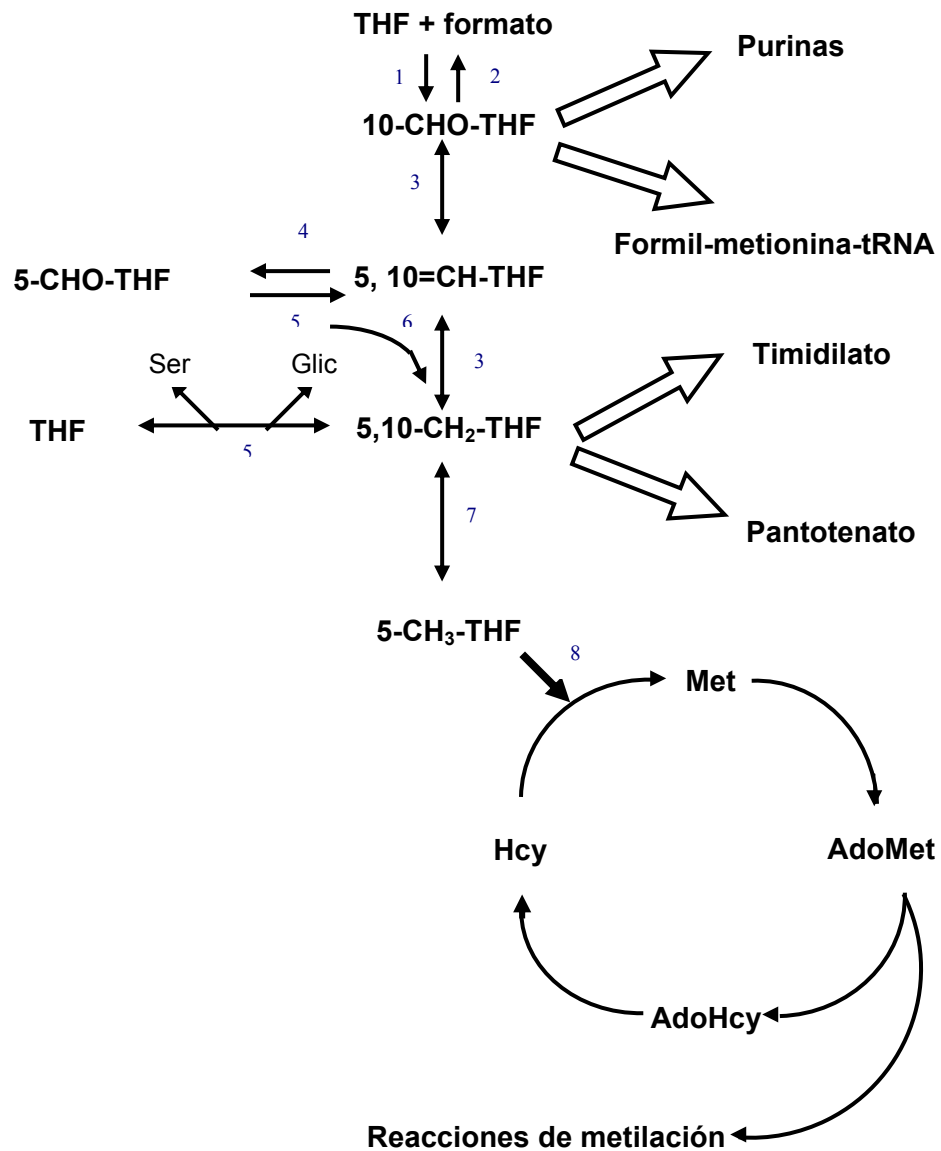


Figura 2. Suministro de unidades de carbono a diversas rutas metabólicas mediante las diferentes formas de folatos

- 1) 10-formil tetrahidrofolato sintetasa, 2) 10-formil tetrahidrofolato deformilasa,
- 3) 5, 10- metilen tetrahidrofolato dehidrogenasa / 5, 10-metenil tetrahidrofolato ciclohdroxilasa
- 4) 5-formil tetrahidrofolato ciclogasa, 5) serina hidroximetil transferasa 6) glicina decarboxilasa
- 7) 5, 10-metilen tetrahidrofolato reductasa, 8) metionina sintetasa

La función del folato en la producción de nucleótidos necesita de la forma 10-formil tetrahydrofolato del folato, la cual se emplea en dos pasos de la síntesis de purinas, con donación de grupos formilo para las posiciones C8 y C2 durante la síntesis del anillo purínico (Scott y col., 2000).

La dependencia de la metionina-sintasa del folato y de la cobalamina explica porqué la simple carencia de alguna de las dos vitaminas lleva a las mismas alteraciones megaloblásticas en la médula ósea y en otros tejidos con células en división activa. En la deficiencia de cobalamina, el folato es atrapado en la forma 5-metiltetrahydrofolato y el tetrahydrofolato no es regenerado para la formación del 5,10-metilentetrahydrofolato, necesario para la síntesis de timidilato y por lo tanto de DNA (Lucock y col., 2003).

En el ciclo de la metilación, la reacción principal para la formación de metionina a partir de homocisteína requiere la producción de 5-metiltetrahydrofolato. La remetilación de homocisteína para producir metionina es la única reacción conocida de esta forma de folato. Se elimina un grupo metilo del 5-metiltetrahydrofolato y se lo transfiere sucesivamente primero a la coenzima cobalamina y luego a la homocisteína, con formación de metionina y reconversión del 5-metiltetrahydrofolato en tetrahydrofolato (Rebeillé y col., 2006).

La metionina producida a partir de homocisteína puede servir como donante de grupos metilo por la conversión en S-adenosilmetionina (SAM). Por lo tanto, se considera que el folato y la SAM son los principales transportadores de un carbono de las vías biosintéticas. La SAM es el donante de metilo en más de 100 reacciones fisiológicas, como la metilación de DNA y RNA y de fosfolípidos de membrana. La SAM se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH) por la actividad de varias metiltransferasas presentes en todas las células.

La SAH es hidrolizada a homocisteína y adenosina, una reacción reversible que regenera homocisteína, con una termodinámica que en realidad favorece la síntesis de SAH (Ravanel y col., 2004).

El reciclado de homocisteína a metionina por medio de grupos metilo obtenidos de novo de la serina es muy eficiente. Puesto que la metionina suele ser uno de los aminoácidos limitantes de la dieta, debe ser eficazmente reciclada. Varios puntos reguladores controlan la síntesis de grupos metilo de novo a partir del uso de metionina como SAM. En respuesta a un exceso de metionina, la SAM se une a un dominio regulador específico del metiltetrahidrofolato e inhibe la actividad enzimática. Por lo tanto, si el aporte alimentario de metionina es suficiente, la SAM controla la producción de 5-metiltetrahidrofolato a partir de metiltetrahidrofolato y en consecuencia, la regeneración de metionina (Scott y col., 2000).

Debe existir una regulación recíproca del metabolismo de unidades de carbono y de grupos metilo por SAM y 5-metiltetrahidrofolato, pero cuando el nivel de metionina es bajo, se produce menos SAM y esto atenúa la inhibición de la reacción del metiltetrahidrofolato, lo que produce el aumento de la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato, necesaria para remetilación de la homocisteína. La producción de 5-metiltetrahidrofolato promueve la remetilación de homocisteína para generar un aporte de metionina necesaria para las reacciones esenciales (Stover, 2004).

3. Ruta de biosíntesis de folatos en plantas

La ruta biosintética de folatos en plantas se han identificado completamente, se efectúa en tres compartimientos celulares. (Hanson y Gregory, 2002; Ravanel y col., 2004). Figura 3.

3.1 Síntesis de hidroximetildihidropterina

En el citosol la hidroximetildihidropterina es sintetizada de Guanosin Trifosfato (GTP) en tres pasos. La primera reacción es catalizada por la GTP ciclohidrolasa I (GTPCH1) para formar dihidroneopterina trifosfato, el grupo pirofosfato es removido por una nucleoside diphosphate linked tox (nudix hidrolasa) (Klaus y col., 2005), seguido por la acción de una fosfatasa no específica. Después una dihidroneopterina aldolasa se inserta en el lado lateral de la cadena de dihidroneopterina para liberar hidroximetildihidropterina (Goyer y col., 2004).

3.2 Síntesis de ácido p-aminobenzoico

En cloroplasto dos enzimas son requeridas para la conversión de corismato en ácido p-aminobenzoico, la primer enzima Aminodeoxicorismato sintasa cataliza la conversión de corismato en aminodeoxicorismato, la segunda enzima Aminodeoxicorismato liasa es responsable de la conversión de aminodeoxicorismato en ácido p-aminobenzoico (Basset y col., 2004)

3.3 Formación de tetrahidrofolato

La hidroximetildihidropterina y el p-ABA unidos con glutamato se combinan en la mitocondria para producir tetrahidrofolato, cuatro reacciones se requerieren para esta síntesis.

Primero la hidroximetildihidropterina es activada en su forma pirofosforilada para después combinarse con p-ABA y formar dihidropteroato, esas dos reacciones son catalizadas por medio de una enzima bifuncional hidroximetildihidropterina pirofosfocinasa/ dihidropteroato sintasa (HPPK/ DHPS) (Mouillon y col., 2002).

El siguiente paso es la fijación de ATP dependiente de glutamato a la parte carboxílica de p-ABA para formar dihidrofolato por medio de la enzima dihidrofolato sintetasa (Ravanel, 2001). Posteriormente el dihidrofolato es reducido a tetrahidrofolato por la enzima dihidrofolato reductasa usando NADPH como donador de electrones (Rébeille y col., 2006).

Después la cola de poliglutamato del tetrahidrofolato es formada por la adición secuencial de residuos de glutamato, reacción catalizada por la folilpoliglutamato sintetasa (Bekaert y col., 2007). En plantas, el citosol, mitocondria y cloroplastos contienen folatos predominantemente en la forma de derivados poliglutamilados (Cossins, 2000).

Los folatos están presentes en la mitocondria, citosol, vacuolas y cloroplastos, pero no son igualmente distribuidos. La mitocondria contiene cerca del 40%, citosol 30%, vacuolas 20% y cloroplastos 10% del total de los folatos (Jabrin y col., 2003; Orsomando y col., 2005). El contenido total de folatos varía mucho de una especie a otra; por ejemplo, los vegetales de hoja verde son los que tienen, seguido de las zanahorias y posteriormente frutas frescas (Scott y col., 2000). El contenido de folatos también puede variar con el proceso de maduración; por ejemplo como en el tomate decrecen cuando madura (Basset y col., 2004).

4. Ciclo de la fotorrespiración

En las plantas los folatos están involucrados en una ruta muy específica: la fotorrespiración, que es iniciada a nivel de ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa (Rubisco). Figura 4.

Esta es una enzima cloroplástica bifuncional que cataliza ambos procesos, carboxilación y oxigenación de la ribulosa 1, 5 bifosfato (RuBP), la reacción de carboxilación da lugar a la producción de dos moléculas de 3-fosfoglicerato y una molécula de 2-fosfoglicolato (Rébeille y col., 2006).

Esta reacción de oxigenación es el primer evento de la ruta metabólica de la fotorrespiración, asociada con la obtención de O₂ y la evolución del CO₂. Este ciclo se considera como el reciclado de dos moléculas de fosfoglicolato en 3-fosfoglicerato e involucra a tres partes diferentes de la célula: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria. Los pasos clave en esta ruta tienen lugar en el interior de la mitocondria, donde la glicina es oxidada y convertida a serina a través de dos reacciones folato dependientes que están íntimamente conectadas. Estas dos reacciones son catalizadas por la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) y el sistema de división de la glicina (GDC). En estas reacciones, GDC es el proveedor de metilentetrahidrofolato (CH₂-H₄FGLun) requerido para la actividad de la SHMT (Olivares y col., 2005).

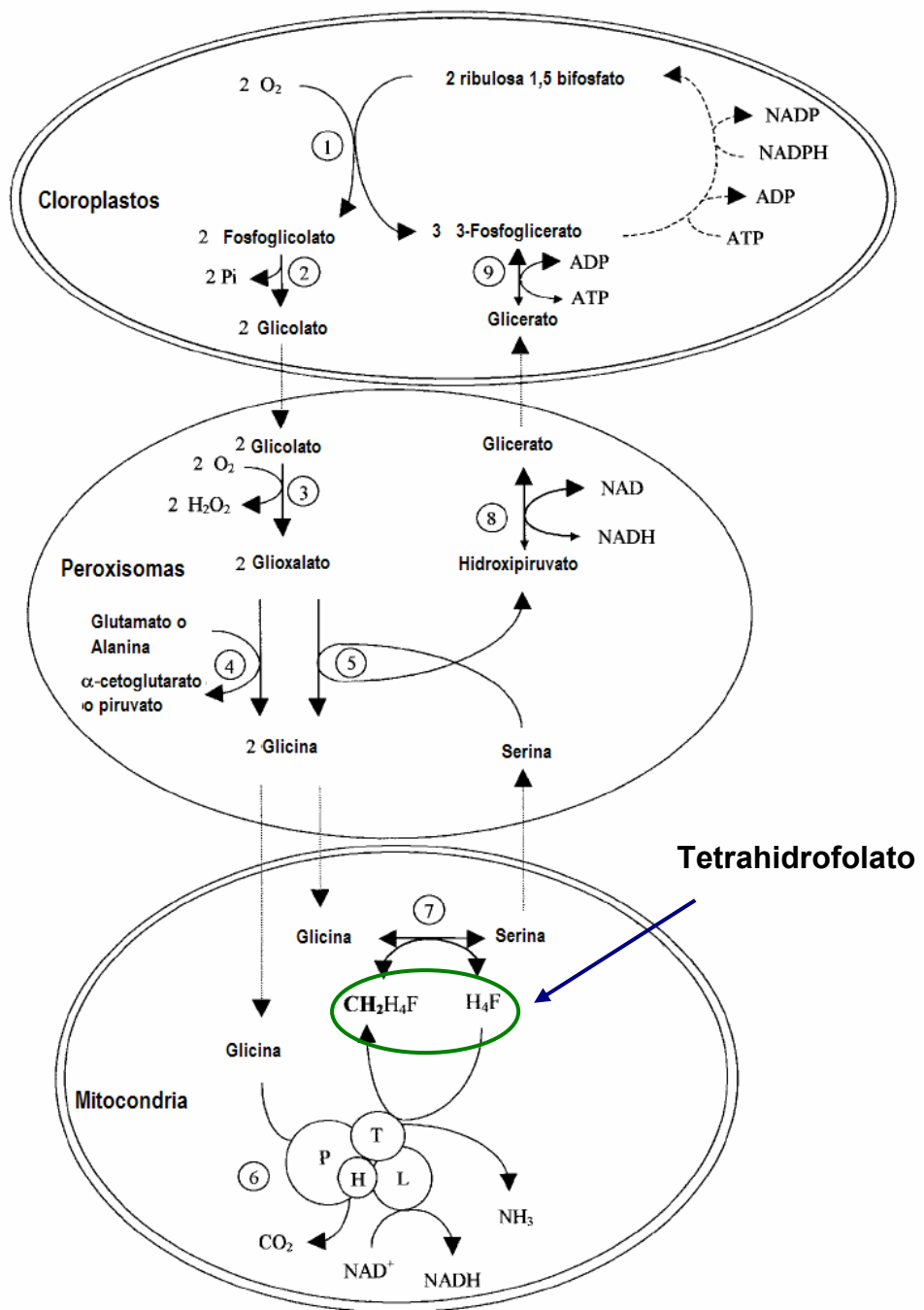


Figura 4. Ciclo de la fotorrespiración

5. Importancia del consumo de folatos

5.1 Absorción y metabolismo

Cuando se consumen folatos naturales de los alimentos, deben primero ser convertidos en la forma monoglutamato por la enzima pteroilpoliglutamato-hidrolasa, también conocida como folato-conjugasa o glutámico-carboxi-peptidasa que suele localizarse en la membrana del ribete en el cepillo del yeyuno (Suárez, 2003). El pH óptimo para la conjugasa es de 6.5 a 7.0 (Reisenauer y col., 1997). Después de la desconjugación a la forma monoglutamilo, el monoglutamilofolato es transportado a través de la membrana por un mecanismo de transporte dependiente del pH (Zimmerman y col., 1989).

Antes de ingresar a la circulación portal, el ácido fólico sufre una reducción a tetrahidrofolato y una metilación dentro de las células de la mucosa (Gregory, 1995). El transporte de folatos a través de las membranas hacia las células de determinados tejidos, como el riñón y la placenta, se produce a través de las proteínas ligadoras de folato asociadas a membranas que actúan como receptores de folatos y que; por lo tanto, facilitan la captación celular de estos mismos (Henderson, 1992; Selhub y Rosenberg, 1997).

En las células del túbulo proximal del riñón, las proteínas ligadoras de alta afinidad parecen transportar el 5- metiltetrahidrofolato en forma selectiva. El transportador de folatos reducidos se dirige de manera específica a los folatos reducidos para captarlos en la mayoría de los tejidos. Una vez en el interior de las células, el 5- metiltetrahidrofolato es desmetilado y convertido en forma de poliglutamilo por acción de la folipoliglutamato-sintetasa, antes de ser liberados de los tejidos hacia la circulación, la poliglutamato-hidrolasa reconvierte los poliglutamatos en monoglutamatos (Quinlivan y col., 2005).

Los tejidos tienen una capacidad limitada para almacenar folatos por encima de los requerimientos celulares. Se estima que el contenido corporal total del ser humano varía aproximadamente entre 34 y 68 μmol . La fracción de los folatos plasmáticos que no se asocia a proteínas se filtra libremente a nivel de los glomérulos y la mayoría de los folatos se reabsorben en los tubos proximales. La mayor parte del folato se excreta como productos de escisión y el folato urinario intacto representa sólo un pequeño porcentaje del folato alimentario. Las pérdidas fecales de folatos son difíciles de determinar debido a la contribución de la síntesis microbiana colónica, se estima que la excreción fecal de los folatos es similar a la urinaria y a la de los catabolitos de folatos (Caudill, 1998).

El conocimiento de la cinética *in vivo* de un nutriente ayuda a comprender cuáles son sus necesidades y aporta una perspectiva del diseño experimental, como las intervenciones que modifican el estado nutricional. Tal es el caso de los folatos, respecto de los cuales numerosos estudios de cinética *in vivo* han proporcionado importantes conocimientos sobre su metabolismo (Gregory, 1995).

La biodisponibilidad de los folatos provenientes de fuentes alimentarias naturales es variable y suele ser incompleta. Muchos aspectos de la dieta, situaciones fisiológicas y fármacos afectan la biodisponibilidad de los folatos alimentarios, como el atrapamiento de los folatos naturales en la estructura celular o la matriz insoluble de determinados alimentos, la inestabilidad de ciertos tetrahidrofolatos lábiles durante el pasaje por el medio digestivo, la inhibición directa de la desconjugación de los poliglutamilfolatos alimentarios, la inhibición directa de la absorción de folatos y la alteración indirecta de la desconjugación y de la absorción a causa de la modificación del pH yeyunal (Scott, 2007).

5.2 Enfermedades causadas por la deficiencia de folatos

El déficit grave de folatos se asocia con anemia megaloblástica, que se caracteriza por la presencia de eritrocitos anormalmente grandes y nucleados que se acumulan en la médula ósea (Li y col., 2003).

También disminuye el número de leucocitos y de plaquetas debido a la alteración general de la división celular relacionada con la función de los folatos en la síntesis de ácidos nucleicos. Las mujeres embarazadas presentan un riesgo más elevado de sufrir anemia megaloblástica por la deficiencia de folatos a causas de las mayores necesidades de esta vitamina para la síntesis de DNA y otras reacciones de transferencia de un carbono (Cikot y col., 2001).

Puesto que la mucosa intestinal se regenera en forma permanente y reemplaza sus células epiteliales cada tres días, las necesidades de folatos superan a las de los demás tejidos. Los síntomas gastrointestinales suelen aparecer como resultado de un déficit grave de folatos y a menudo se asocian con una absorción anormal (Rébeille y col., 2006).

Además de la anemia megaloblástica, un consumo insuficiente de folatos y las concentraciones bajas del nutriente se han relacionado con embarazos que evolucionan mal, mayor riesgo de parto prematuro, lactantes de bajo peso al nacer y retardo del crecimiento. La elevación de las concentraciones maternas de homocisteína se asocia tanto con abortos espontáneos como con complicaciones del embarazo, por ejemplo: infarto placentario y retardo del desarrollo fetal con preclampsia (Vollset y col., 2000; El-Khairi y col., 2003; Nurk y col., 2004 Powers y col., 2004; Vadachkoria y col., 2004).

Algunos autores plantean que el parto prematuro, el desprendimiento de la placenta y los defectos del cierre del tubo neural están relacionados con la disminución real de los folatos en el suero y en los tejidos (Hogg y col., 2000; Hietala y col., 2001; D' Aniello y col., 2003; Zeeman y col., 2003).

Dentro del grupo infantil, la deficiencia es más frecuente en niños prematuros, los cuales cuentan con bajas reservas al nacer pues durante su estancia en el útero lo obtuvieron en cantidades insuficientes. Esta deficiencia se agrava si se sufren procesos infecciosos o enfermedades hemolíticas ya sea hereditarias o por incompatibilidad a grupos sanguíneos (Tamura y Picciano, 2006).

Se ha demostrado muchas veces que los suplementos de ácido fólico en el periodo periconceptivo protegen de la aparición o recurrencia de los defectos del cierre del tubo neural (Olney y Mulinare, 2002),

Los defectos del cierre del tubo neural son daños en la formación de la médula espinal y el cerebro conduciendo a la aparición de la anencefalia y espina bífida, diferentes estudios han llevado a evidencias epidemiológicas sobre la asociación de los bajos niveles de ingestión y bajos niveles séricos de folatos con estos defectos congénitos, además de que se relaciona con la aparición de paladar hendido y labio leporino (Pitkin, 2007).

En los alcohólicos se conjugan la baja ingesta de alimentos y la acción directa del alcohol sobre los niveles séricos de folato por bloqueo de la liberación del folato hepático a la circulación y una interrupción de la circulación enteropática de este, además del efecto destructor sobre la vitamina y de la interferencia en la absorción unido al incremento de su excreción y a la disminución de la utilización (Herbert, 1990).

La homocisteína es un aminoácido tóxico dispensable que se encuentra en el organismo y se origina en el proceso de metilación de aminoácidos. Cuando esta reacción se produce junto con la transferencia de otro metilo donado por el ácido fólico a la homocisteína se transforma en metionina que es un aminoácido indispensable para el organismo (Hesse y Hoefgen, 2003).

La homocisteína en sangre, hiperhomocisteinemia, puede ser causada por déficit de folatos, de vitaminas B6 y B12, de transmetilglicina y por falta de ejercicio (Johnson, 2007).

Los folatos reducen en un 25% los niveles de homocisteína, mientras que la vitamina B12 solamente logra disminuirlos en un 7% y la B6 no produce disminución (Nygard y col., 1998; Selhub y col., 1999).

Existe un aumento en el riesgo de vasculopatía aterosclerótica coronaria, cerebral y vasos periféricos, y de tromboembolismo arterial y venoso (Quinlivan y col., 2002).

Varios estudios epidemiológicos relacionaron el riesgo de cáncer con un estado deficiente de folatos como se muestra en el Cuadro 3. La insuficiencia de folatos posee efectos procarcinogénicos al interferir con la síntesis y la metilación normales de DNA (Lucock y col., 2003).

En respuesta al déficit, la síntesis de timidilato se altera y el desequilibrio nucleotídico resultante incrementa la incorporación errónea al DNA de bases de uracilo provenientes del fondo de nucleótidos o de la desaminación de citosina no metilada (Chiu y Mason, 2000).

Cuadro 3. Antecedentes de estudios clínicos sobre la importancia de los folatos en la prevención del cáncer

ESTUDIO	REFERENCIA
La deficiencia de folatos afecta el gen involucrado en la inhibición de formación de tumores.	Nensy y col., 1995; Meenan y col., 1997
Existe una asociación inversa entre los niveles de folatos y el riesgo de presentar pólipos adenomatosos en el colon distal y colitis ulcerativa.	Lashner y col., 1993; Su y Arab, 2001;
La ingesta alta en folatos reduce la incidencia de cáncer de seno.	Zhang y col., 1999
Bajos niveles de folatos en mujeres se han identificado como un factor de riesgo en la infección con papiloma virus humano.	James y col., 1994; Giovannuci y col., 1998; Boppana y col., 2000
La deficiencia de ácido fólico aumenta la incidencia de leucemia linfocítica aguda en 4.3 veces.	Kim y col., 1994

5.3. Deterioro del metabolismo de los folatos inducido por fármacos

Numerosos fármacos pueden afectar la absorción y el metabolismo de los folatos, los efectos de determinados productos farmacéuticos llegan a ser considerables. Un ejemplo es el metotrexato; su estructura molecular sólo difiere levemente de la del ácido fólico, un grupo amino reemplaza el grupo 4-oxhidrilo en el anillo de pteridina y existe un grupo metilo en la posición N-10. Estas modificaciones le otorgan al metotrexato más afinidad por la dihidrofolato reductasa, objetivo de la droga, que la propia del sustrato natural, el folato (Rebeillé, 2006).

Lo anterior ocasiona una deficiencia de la síntesis de timidilato al interrumpirse el ciclo metabólico de los folatos debido a la carencia del sustrato fisiológico. Entre los efectos tóxicos del metotrexato están la desfoliación de los epitelios de recubrimiento con ulceración oral, diarrea, alopecia, pancitopenia que es una causa frecuente de muerte (Richard y col., 2004).

Otros antagonistas de los folatos incluyen la aminopterina, trimetoprima, el trimetrexato y el triamtereno. Estos compuestos pueden bloquear la producción de timidina e inhibir la síntesis de novo de nucleótidos purínicos y durante medio siglo han sido claves en el tratamiento del cáncer (Lliades y col., 2003).

El metotrexato también se usa a menudo y con éxito para tratar enfermedades como la artritis reumatoide, la psoriasis, el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal. Los pacientes con artritis reumatoidea presentan déficit de folatos y los depósitos de la vitamina están disminuidos en los que toman metotrexato. Si se administran de forma simultánea dietas altas en folatos o suplementos alimenticios de ácido fólico, los efectos tóxicos disminuyen sin que aminore la eficacia del fármaco (Scott y col., 2000).

Los anticonceptivos orales administrados durante un largo tiempo, pueden producir el desarrollo de anemia megaloblástica, la falta de vitamina B12 o de folato causa un tipo de anemia similar. En este tipo de anemia hay una disminución en la producción de glóbulos rojos, la cual se manifiesta con fatiga y agotamiento temprano con cualquier esfuerzo. La deficiencia también tiene repercusiones a nivel del sistema nervioso con confusión, pérdida de la memoria (demencia), alucinaciones y debilidad muscular, entre otras (Seshadri y col., 2002).

Numerosos informes asocian un estado de folatos deficiente con el uso crónico de los anticonvulsivantes fenitoína y fenorbital. Algunos sugieren que estos fármacos interfieren con la utilización de folatos, aunque aún no se ha dilucidado el mecanismo exacto de la interacción fármaco/nutriente. La sulfasalazina es un compuesto antiinflamatorio que se suele emplear para el tratamiento de la colitis ulcerosa y que ejerce un conocido efecto inhibitor de la absorción y el metabolismo de folatos (Gregory, 1995).

También se usan biguanidas como la metformina para controlar la glucemia en personas diabéticas y en determinados tipos de enfermedad cardiovascular, y su uso crónico se asocia con un riesgo más elevado de deterioro del estado de los folatos y de hiperhomocisteinemia (Chen y col., 2002).

6. Recomendaciones de la ingesta de folatos y fuentes principales

6.1 Ingesta diaria recomendada

Los folatos son sintetizados solamente por las bacterias y las plantas, por lo que el hombre requiere de la dieta para cubrir sus necesidades diarias de esta vitamina. Cuadro 4.

Cuadro 4. Ingesta diaria recomendada de folatos (μg / día).

Grupo	Ingesta adecuada
Lactantes	
0-6 meses	65
6-11 meses	85
Niños y adolescentes	
1-3 años	150
4-8 años	200
9-13 años	300
14-18 años	400
Adultos \geq 19 años	400
Mujeres embarazadas, todas las edades	600
Mujeres que amamantan, todas las edades	500

(Remacle y Reusens, 2004)

Se muestran las estimaciones de ingesta adecuada para todas las categorías de edad y para ambos sexos. Los datos que asocian la ingesta diaria de folatos con la reducción del riesgo de malformaciones del tubo neural se consideraron suficientes como base para una recomendación independiente de la ingesta diaria recomendada para mujeres que puedan concebir (Rébeille y col., 2006).

Las recomendaciones de ingesta están basadas en la prevención de la anemia megaloblástica y no en la prevención de defectos del cierre del tubo neural, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas. Para la prevención de la hiperhomocisteinemia, los requerimientos de folatos serán más altos (250 a 500 μg diarios) que las recomendaciones de la ingesta diaria recomendada (Stover, 2004).

Cuando se trata de la prevención de defectos del cierre del tubo neural se aconseja a las mujeres que desean quedar embarazadas la ingestión de dosis elevadas de ácido fólico al menos 4 semanas antes de la concepción y hasta unas 8 semanas después (Food and Nutrition Information Center, 2004).

De esta manera muchos países como Estados Unidos, Hungría, Bolivia, Colombia, han establecido de manera obligatoria fortificar algunos alimentos como la harina de trigo con ácido fólico (Health Council of the Netherlands, 2000).

Muchos estudios demuestran la relación entre el consumo de suplementos polivitamínicos con ácido fólico y la disminución de los defectos del cierre del tubo neural, cuando la mujer consume una alta proporción de folatos alimentarios al comienzo del embarazo (Food and Nutrition Information Center, 2004).

La Junta de Alimentación y Nutrición recomienda que para reducir el riesgo de defectos del cierre del tubo neural, todas las mujeres en edad fértil deberían consumir unos 400 μg / día de ácido fólico sintético en forma de suplementos o con alimentos enriquecidos, además de consumir folatos alimentarios de una variedad de fuentes (USDA, 2004).

La lactancia es otro factor que incrementa las demandas de folato pues un litro de leche materna contiene de 50 a 100 mg de folato, que es el requerimiento basal diario de un recién nacido, por lo que se hace necesaria la suplementación de la madre durante este periodo. Durante la infancia aumenta la síntesis de DNA debido al crecimiento corporal, lo que a su vez aumenta la demanda de folatos a niveles muy similares a los requerimientos del embarazo. En un adulto normal las reservas de folato son pequeñas en relación con la proporción excretada, por lo que un régimen deficiente de folato puede detectar una caída (Olivares, 2005).

Aunque las dosis de ingesta recomendadas están basadas en la prevención de la anemia megaloblástica, la fortificación está enfocada a la prevención de deficiencias en grupos más sensibles, como es el caso de mujeres en edad fértil, mujeres en periodos de lactación y ancianos (Suárez, 2003).

Durante el embarazo los requerimientos de folatos son mayores, pueden llegar hasta unos 400 µg / día e incluso más si el embarazo es múltiple, si hay agregado un proceso infeccioso o si es indispensable la ingestión de algún anticonvulsivante. En el caso de las mujeres en edad de procrear catalogadas dentro del grupo de riesgo o por haber tenido un hijo con defectos del cierre del tubo neural la dosis aconsejada es de 5 mg totales al día (Melse-Boonstra, 2003).

6.2 Fuentes principales de folatos

Las plantas son la primera fuente de folatos en la nutrición humana, pero los niveles varían considerablemente y son muy bajos en algunos alimentos básicos (USDA, 2004). Cuadro 5.

Los folatos tienen como característica su inestabilidad, todas las formas derivadas son sensibles a la oxidación, luz y variaciones de pH, de tal forma que se producen grandes pérdidas de folatos durante los procesos de preparación de los alimentos, principalmente cuando conllevan tratamientos térmicos y se realizan bajo condiciones oxidativas. Hay que ser cuidadoso con los métodos de cocción utilizados, evitando las temperaturas elevadas por largos periodos de tiempo (Olivares, 2005).

Las fuentes naturales ricas en folatos incluyen leguminosas como el frijol y la lenteja, los vegetales de hoja verde como la espinaca, lechuga, apio, algunas frutas como la naranja, fresa y alimentos de origen animal como el hígado (Rébeille, 2006).

Los frijoles cocidos son una gran fuente de folatos, el consumo diario de una taza podría cubrir hasta un 72% del total de las necesidades de folatos. El consumo de $\frac{1}{2}$ taza de lenteja podría cubrir hasta un 45% de la recomendación diaria. El consumo de una taza de espinaca al día podría cubrir hasta un 65% de la recomendación diaria. Las cantidades de folatos contenidas en las leguminosas crudas son tan importantes que aún con las pérdidas entre el 50 y 70% obtenidas en los procesos de cocción, se logra obtener una buena fuente en alimentos cocidos (Suárez, 2003).

Las estrategias para conseguir los niveles de folatos adecuados son, la correcta educación e información sobre los alimentos que deben ser consumidos y en que cantidades (Lumley y col., 2000).

Cuadro 5. Contenido de folatos en vegetales, frutas y alimentos de origen animal.

Alimentos	Folatos (ng/g)
Papa	108
Cebolla	133
Zanahoria	140
Lechuga	395
Apio	460
Naranja	260
Limón	305
Fresa	360
Trigo	510
Maíz	580
Chícharo	630
Espinaca	658
Plátano	100
Tomate	140
Lenteja	1170
Frijol	1290
Hígado	2750

(Karatas y col., 2007).

7. Métodos analíticos para la determinación de folatos en alimentos

Básicamente todos los aspectos de la nutrición y la investigación relativa a los folatos se fundan en la determinación confiable de la vitamina en muestras biológicas y de componentes de la dieta. Las principales técnicas para medir los folatos incluyen procedimientos de desarrollo microbiano, métodos cromatográficos e inmunoensayos (Quinlivan y col., 2006).

Los análisis microbiológicos que emplean *Lactobacillus casei* miden folatos totales. Los de inmunoensayo se emplean a menudo en el medio clínico debido a su simplicidad y a que sus aplicaciones están bien normalizadas; sin embargo, la falta de una respuesta uniforme de los distintos folatos tiende a impedir su aplicación para muestras que contienen múltiples formas de folatos. Los métodos de cromatografía líquida de alta resolución permiten medir cada forma de folato si las muestras son bien purificadas, pero la preparación de modelos confiables para todas las formas de folatos constituye un problema. Varios métodos de espectrometría de masas mediante dilución isotópica se han limitado sobre todo a las muestras de sangre (Scott y col., 2000).

7.1 Ensayo microbiológico

En la mayoría de los estudios nutricionales para calcular el consumo de folatos se recurre a bases de datos sobre la composición alimentaria, básicamente mediante análisis microbiológicos. Los elementos metodológicos clave son las etapas preparatorias, como la extracción de la matriz de la muestra y la desconjugación enzimática de los poliglutamilfolatos (Quinlivan y col., 2006).

El paso de desconjugación es el más crítico para el ensayo con el microorganismo *Lactobacillus casei rhamnosus* (ATCC 7469), ya que suelen surgir muchos problemas si no se optimizan las condiciones de preparación de la muestra. Puede subestimarse el contenido de folatos si la extracción es incompleta y posiblemente, si la desconjugación enzimática es insuficiente (Quinlivan y col., 2005).

El tratamiento de desconjugación de los homogeneizados de alimentos con enzimas α -amilasa, proteasa y conjugasa, el tipo y actividad de la conjugasa, las condiciones (tiempo, temperatura y pH) y la naturaleza del sustrato pueden afectar el rendimiento completo del ensayo. La eficiencia de las enzimas puede ser inhibida por citrato y por ciertos extractos del mismo alimento (Quinlivan y col., 2006). El tratamiento enzimático cerca de pH neutro usando una gran cantidad de conjugasa podría mejorar el problema aunque no lo eliminaría (Pandurangi y LaBorde, 2004).

El ensayo microbiológico ha sido modificado para incrementar su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, tal como el uso de la moderna microplaca. El *Lactobacillus casei rhamnosus* (ATCC 7469) puede medir las concentraciones de folatos de menos de 100 pmol / L, además de que puede crecer en todas las especies de folatos. Los métodos de microplaca usan menos de 0.2 ml de medio por muestra, los cultivos de microorganismos crioconservados son baratos, de fácil mantenimiento, no detecta precursores de folatos como el ácido pterico (Quinlivan y col., 2006).

Una desventaja de los ensayos microbiológicos es que son susceptibles a contaminación microbiana, así como también a la presencia de antifolatos u otras drogas antibacteriales pueden causar la sobreestimación de las concentraciones de folatos debido a la inhibición del crecimiento bacterial (Scott y col., 2000).

7.2 Análisis por Cromatografía

Para la separación de las diferentes formas se han desarrollado métodos cromatográficos de alta resolución (HPLC) que permiten diferenciar y cuantificar las distintas formas derivadas tras una extracción previa de la matriz del alimento y la posterior desconjugación por incubación con una enzima conjugasa (Phillips y col., 2006).

Actualmente, incluso se están perfeccionando técnicas para la determinación en cromatografía combinada de Líquidos-masas (LC-MS), que permite una mayor certeza de la especie química que se determina (Olivares, 2005).

7.3 Prueba de ELISA

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes antígeno o anticuerpo marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Quinlivian y col., 2005).

Para la detección de folatos en alimentos, las ventajas que ofrece este ensayo son la alta sensibilidad, además de que la enzima no se ve afectada por la interferencia de sustancias, el tiempo que se requiere para hacer la prueba es relativamente corto en comparación con los demás ensayos (Scott y col., 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos nutricionales de gran preocupación para la población es la deficiencia en la ingesta de folatos; ya que a nivel mundial México ocupa uno de los primeros lugares en malformaciones del cierre de tubo neural. La deficiencia de folatos también se asocia con anemia megaloblástica, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras.

Es importante identificar alimentos disponibles y de fácil acceso para la población, que sean fuente de folatos y que además se puedan manipular genéticamente para incrementar la síntesis de esta importante vitamina.

El nopal es un excelente candidato debido a que es un alimento de consumo tradicional; con gran adaptabilidad, propiedades sensoriales, nutricionales y nutracéuticos sobresalientes.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Cuantificar la concentración de folatos en cladodios de nopal (*Opuntia ficus indica*) e identificar algunas enzimas que participan en su biosíntesis.

B. ESPECÍFICOS

- Evaluar la presencia de folatos en nopal a través de ensayo microbiológico.
- Determinar la concentración de folatos en nopal por ELISA.
- Aislar, clonar y caracterizar las secuencias de los genes en nopal que codifican para las enzimas: GTP-ciclohidrolasa 1 (GTPCH1), Aminodeoxicorismato sintasa (ACDS), Hidroximetildihidropterina pirofosfocinasa / Dihidropteroato sintasa (HPPK / DHPS).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Material vegetal

Se emplearon cladodios de nopal de la morfoespecie “Verde Valtierra”, en tres etapas de desarrollo: la etapa 1 de 22 días de brotación de 3.5-17 cm, la etapa 2 de 45 días de brotación de 18-20 cm, y la etapa 3 de 2 meses de brotación de 25-30 cm, proporcionados por la Sociedad de Productores nopalersos de Valtierra (PRONOPVAL), Salamanca Guanajuato.

2. Cepas bacterianas

- Cepa de *Lactobacillus casei* rhamnosus (ATCC 7469) para la evaluación de folatos en nopal.
- Células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP10F' para la propagación de plásmidos.

3. Enzimas de digestión

- Proteasa (EC 3.4.24.31) de *Streptomyces griseus*
- α -amilasa (EC 3.2.1.1) de *Aspergillus niger*
- Carboxipeptidasa G. de *Pseudomonas* sp

4. Controles:

- Espinaca cruda (Análisis bioquímico)
- Plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Análisis molecular)

5. Vector de clonación

Se empleó el plásmido pCR 2.1 TOPO. Figura 5.

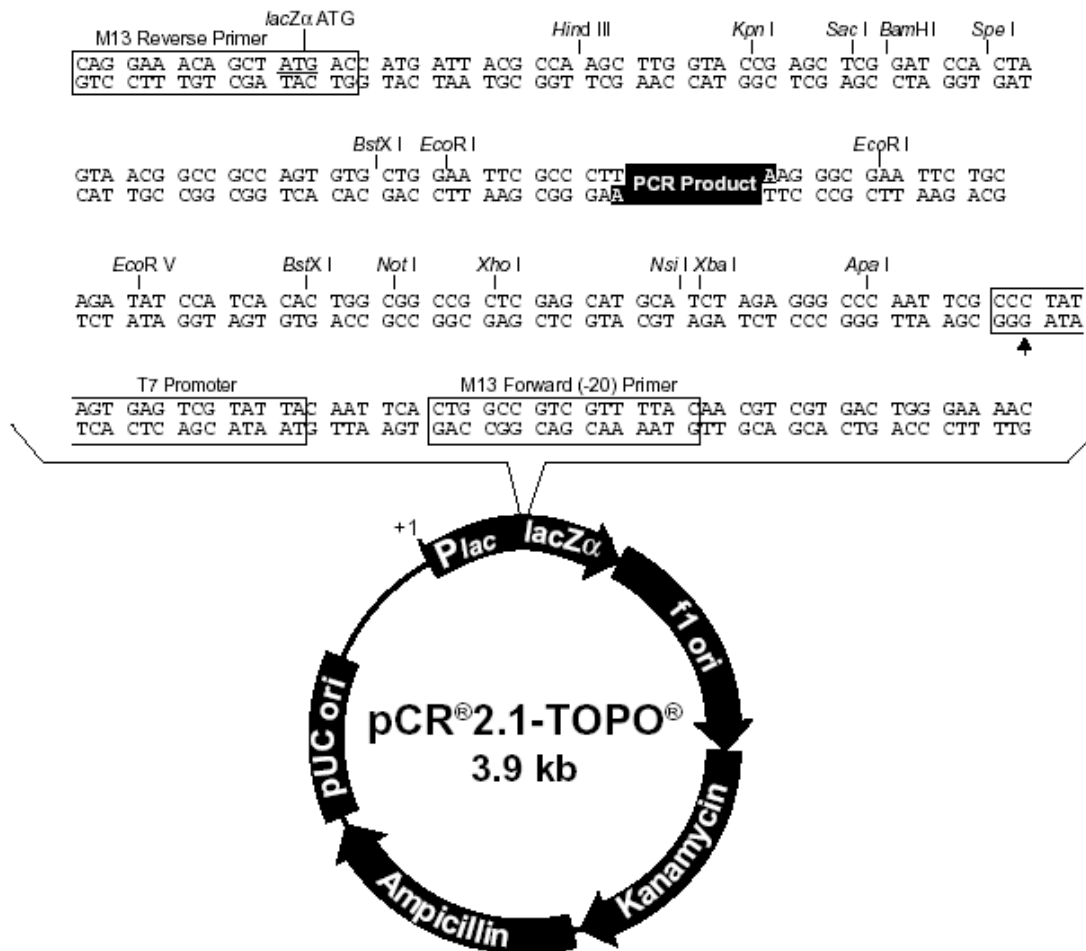


Figura 5. Mapa de las características del vector pCR 2.1-TOPO y la secuencia circundante, así como el sitio de clonación. Los sitios de restricción están indicados en el sitio real de corte. La flecha indica el comienzo de la transcripción de la polimerasa T7. Este plásmido tiene una extensión de 3931 nucleótidos, tiene múltiples sitios de clonación, es resistente a kanamicina y ampicilina, su origen es del vector pUC.

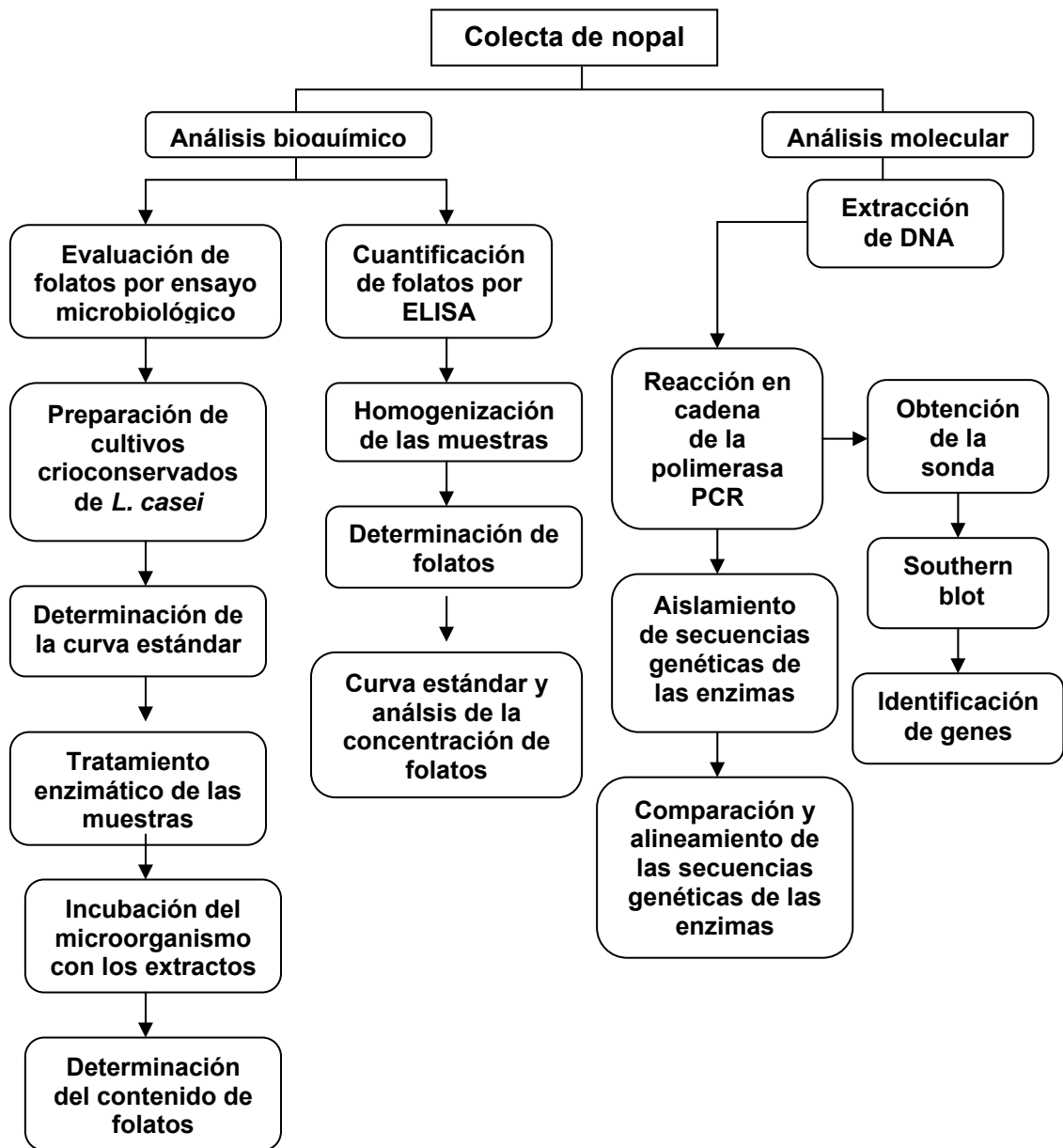


Figura 6. Esquema general de trabajo

B. MÉTODOS

1. Análisis bioquímico

1.1 Evaluación de la presencia de folatos en nopal por ensayo microbiológico

1.1.1 Preparación de cultivos crioconservados

Para la evaluación de folatos se inició con la reconstitución del cultivo (*Lactobacillus casei rhamnosus*) adquirido de la American Type Culture Collection (ATCC 7469). La preparación de cultivos crioconservados se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Grossowicz y col. (1981). La cepa liofilizada se rehidrató con 500 µl de medio de ensayo (lactobacilli) y se transfirió a un tubo con 5 ml de medio de ensayo previamente esterilizado a una temperatura de 121°C por 15 minutos, se incubó a 37°C durante 17 horas, posteriormente el cultivo se transfirió a otro tubo con 5 ml de medio de ensayo y se reincubó por 7 horas a 37°C, la mezcla se transfirió a otro frasco con 150 ml de medio de ensayo suplementado con ácido fólico (30ng/L) y se incubó nuevamente durante 18 horas a 37°C. Después se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a intervalos de 1 hora y cuando el crecimiento se mantuvo en fase estacionaria toda la mezcla se transfirió a otro frasco con 300 ml de medio de ensayo sin ácido fólico, se determinó nuevamente la absorbancia a la misma longitud de onda (600 nm) cada hora, al aminorar el crecimiento, la mezcla se centrifugó a 6,500 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con medio de ensayo para eliminar totalmente el remanente de ácido fólico de las células.

La pastilla se reconstituyó con 10 ml de medio de ensayo y se diluyó 100 veces, se leyó la absorbancia y al alcanzar una D.O de 0.2 se mezcló con un volumen igual de una solución de glicerol/ agua (80/20). Se tomaron alícuotas de 500 µl de la mezcla y se colocaron en tubos eppendorf, se les dió un baño con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

1.1.2 Determinación de la curva estándar

Se tomó un vial de microorganismos y se reconstituyó con 2 ml de medio de ensayo, después se diluyó 10, 50 y 100 veces. Se seleccionó una de las diluciones para todos los ensayos, eligiendo la que mejor se asemejó a lo descrito en el protocolo. Se preparó medio de ensayo Lactobacilli y se colocó en tubos en porciones de 5 ml a los cuales se les adicionó una cantidad de ácido fólico en diferentes concentraciones 0, .2, .4, .6, .8 ng, todo por triplicado, después se le adicionó una gota del inóculo previamente diluido a cada tubo y se incubaron a 37°C por 72 horas. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm contra un control sin inocular y se graficó contra la concentración de ácido fólico (Grossowicz y col., 1981).

1.1.3 Tratamiento enzimático de las muestras

El tratamiento enzimático de las muestras se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Pandrangi y Laborde (2004). Se hizo la desconjugación del nopal en tres etapas de desarrollo y se tomó como control la espinaca cruda, el análisis se hizo por triplicado. Una vez colectadas las muestras, se pesaron 10 g de cada uno y se homogenizaron con 50 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1M que contenía 114 Mm de ácido ascórbico a un pH final de 4.2, se calentó la mezcla a 100°C por 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para determinar la combinación más efectiva de enzimas para la extracción de folatos en nopal, se determinaron tres tratamientos enzimáticos, un tratamiento individual (conjugasa), doble (proteasa-conjugasa) y triple enzimático (α -amilasa-proteasa-conjugasa).

En el tratamiento individual, se mezclaron 335 μ l de las muestras homogenizadas con 1580 μ l de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 y se incubó con 85 μ l de conjugasa a una temperatura de 37°C durante 3 horas, posteriormente se calentó la mezcla a 100°C por 5 minutos con el fin de detener la reacción enzimática, se dejó enfriar la mezcla y se centrifugó por 15 minutos a 10,000 rpm a 4°C el residuo se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue resuspendido nuevamente con 2 ml del mismo buffer y posteriormente la mezcla se filtró y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para el tratamiento doble enzimático, se mezclaron 250 μ l de muestras homogenizadas, se le añadieron 250 μ l de buffer de citrato pH 4.0 y 500 μ l de proteasa, se incubó la muestra a 37°C durante 8 horas, el extracto se calentó a 100°C por 5 minutos para detener la reacción, se enfrió a temperatura ambiente, se tomó una alícuota de 335 μ l y se le añadieron 1580 μ l de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 y 85 μ l de la enzima conjugasa, a partir de aquí se efectuó el principio anteriormente utilizado en el tratamiento individual.

En el tratamiento triple enzimático, se hizo una mezcla de 250 μ l de muestras homogenizadas con 250 μ l de buffer de citrato pH 3.0 y 500 μ l de α -amilasa seguido de una incubación a 37°C por 6 horas, se calentó a 100°C por 5 minutos, se enfrió y se tomaron 250 μ l de la misma y se le añadieron 750 μ l

de buffer de citrato pH 4.0 y 500 µl de proteasa, se incubó esta mezcla a 37°C durante 8 horas, el extracto se calentó a 100°C por 5 minutos, se enfrió y se tomaron 335 µl de la mezcla, se le adicionaron 1580 µl de buffer de fosfato de potasio pH 7.0 y se le añadieron 85 µl de conjugasa, se continuó con el mismo procedimiento descrito en el tratamiento individual

1.1.4 Incubación del microorganismo con las muestras y determinación del contenido de folatos

Se tomó una alícuota de 200 µl de cultivos crioconservados de *L. casei* y se incubó en un tubo con 5 ml de medio durante 12 horas a 37°C, de esta mezcla se tomaron nuevamente 200 µl del cultivo saturado y se resuspendieron en otros 5 ml de medio. Se tomaron 100 µl del cultivo reconstituido y se adicionó a cada una de las mezclas previamente preparadas enzimáticamente, se incubaron durante 54 horas, se leyó la absorbancia en el espectrofotometro a una longitud de onda de 600 nm, las lecturas se hicieron a las hora 0, 18, 36 y 54 y una vez obtenidos los datos se calculó la concentración de folatos de las muestras mediante una ecuación de tercer orden:

$$y= (0.0125x^3 - 0.1411x^2 + 0.5954x - .42)$$

1.2 Determinación de la concentración de folatos en nopal por ELISA

1.2.1 Homogenización de las muestras

La cuantificación de folatos se realizó mediante el kit (Diagnostic Automation, Inc. Calabasas, CA USA). Se determinó la concentración de folatos en extractos de nopal en tres etapas de desarrollo y se tomó como sistema control extracto de espinaca cruda, los análisis se efectuaron por triplicado.

La preparación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente forma: se homogenizaron 5 g de muestra en un mortero y 50 ml de agua destilada, se mezclaron y se les ajustó el pH de 6 a 7 utilizando NaOH 1M o HCL 1M, posteriormente se agregaron 0.5 ml de solución Carrez I y después 0.5 ml solución Carrez II, la mezcla se dejó en constante agitación durante 10 minutos y después se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y se descartó el precipitado. Se tomaron 100 µl de la muestra y se diluyeron 1:50 en 400 µl del reactivo "sample diluent".

1.2.2 Determinación de la concentración de folatos

Los pozos de la microplaca se marcaron, tanto para los estándares (ácido fólico en concentraciones de 0, 4, 10, 40, 100 y 400 ng/ ml) como para la muestras. En cada pozo marcado se pipetearon 100 µl de las muestras y los estándares, se añadieron 50 µl del anticuerpo (Mouse-anti-folic-acid antibody) y se mezcló la microplaca cuidando de no perder el líquido, se tapó con papel adhesivo y se incubaron las muestras por 60 minutos a temperatura ambiente. Después de este periodo de incubación se quitó el papel adhesivo, se invirtió la microplaca y se agitó para eliminar todo el líquido.

Se lavaron los pozos tres veces con 300 µl de buffer de lavado, fueron secados completamente y después se añadieron 100 µl del antígeno (anti-mouse IgG HRP) a cada pozo, se tapó la microplaca y se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 60 minutos, después de este tiempo se invirtió para eliminar todo el líquido y nuevamente se efectuaron los tres lavados y se dejó secar completamente.

Se añadieron 100 µl de sustrato (tetrametilbenzidina) a cada pozo, se mezcló e incubó por 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, esperando que desarrollara un color azul como indicativo de la existencia de folatos en la muestra. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M, se mezclaron los pozos y se procedió a leer la absorbancia a un intervalo de 450-620 nm durante media hora por periodos de 5 minutos, en el cual se observaron cambios de color de azul a amarillo.

1.2.3. Curva estándar y análisis de la concentración de folatos

Se calculó para cada estándar y cada muestra la media absorbancia, además del valor B0 (dividiendo cada una de las absorbancias entre la absorbancia del estándar de 0 ng/ml). Se graficó la media absorbancia de los estándares contra el \log_{10} de la concentración de los estándares. Por último se cuantificó la cantidad de folatos utilizando una ecuación tipo polinomial de orden 3 $y = (0.0657x^3 - 0.3636x^2 + 0.2003x + .9976)$

2. Análisis molecular

2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.1.1 Amplificación de los fragmentos por PCR

El análisis de amplificación para determinar las secuencias de los genes en nopal que codifican para las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de folatos se llevó a cabo utilizando los primers de los genes de las enzimas (GTPCH1, ADCS, HPPK/DHPS) los cuales se aislaron con base en las secuencias reportadas para los genes de *Arabidopsis thaliana*:

gtp ciclohidrolasa 1 (1401 pb)

Sentido 5'TGAGGGATGTTTGAATCTGG 3'

Antisentido 5'GCTTGACTCTGTCTTCAAGGC 3'

adc sintasa (2761 pb)

Sentido 5'TTCGTTTTGTTCAACATCTTC 3'

Antisentido 5'TGTCTCCTCTGATCACTACA 3'

hppk/dhps (1455 pb)

Sentido 5'TGGATTTACATCTTTGGAAA 3'

Antisentido 5'TGAACCTTTTCGTCATCATTG 3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400. Los componentes y las condiciones de reacción se muestran en los cuadros 6, 7, 8 y 9.

Cuadro 6. Componentes de la mezcla de reacción para PCR de los genes gtp ch1, adcs, hppk/dhps

Componente	Concentración final	Volumen final (µl)
Agua	-----	30
Regulador Taq (10x)	1x	5
MgCl ₂ (50 Mm)	1.5 mM	2
Primer 1	100 nM	2
Primer 2	100 nM	2
DNA	100 g	4
Taq polimerasa	5u	1
dNTP's (2.5 mM)	20 µM	4

Cuadro 7. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para el gen gtp ch1

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Inicio	95	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	50	1.5
Síntesis	72	2
Ciclos		35
Síntesis final	72	10
Temperatura final	4	∞

Cuadro 8. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para el gen adcs

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Inicio	95	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	50	2
Síntesis	72	3
Ciclos		35
Síntesis final	72	10
Temperatura final	4	∞

Cuadro 9. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR para el gen hppk / dhps

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Inicio	94	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	50	1.5
Síntesis	72	2
Ciclos		35
Síntesis final	72	10
Temperatura final	4	∞

2.1.2. Preparación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP 10 F'

Para la preparación de células químicamente competentes se utilizó el protocolo descrito por (Sambrook y col., 1989).

Se preparó medio LB líquido sin antibiótico y se colocaron 5 ml en un tubo y 500 ml en otro frasco, todo fue esterilizado a 15 psi por 15 minutos a 120°C. Se inocularon células de *E.coli* en el tubo de 5 ml sin antibiótico y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación constante, a la mañana siguiente, todo el contenido del tubo se transfirió al frasco que contenía los 500 ml de medio LB sin antibiótico, posteriormente se incubó a 37°C, en constante agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.3-0.4 aproximadamente de 2 a 3 horas. Al llegar a esta densidad, el contenido del frasco se dividió en dos tubos de 250 ml para centrifuga en condiciones estériles y fríos, se incubaron en hielo por 20 minutos, al pasar este tiempo se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4°C, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y la pastilla de ambos tubos se resuspendió en 5 ml de solución 1 (MgCl₂ 10 mM) fría y estéril, posteriormente fueron añadidos otros 60 ml de solución 1 por cada 250 ml del cultivo, se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y cada pastilla se resuspendió en 5 ml de solución 2 (CaCl₂ 50 mM), se incubaron en hielo por 1 hora y posteriormente la suspensión se transfirió a tubos eppendorf fríos y estériles, en alícuotas de 250 µl a las cuales se les añadió 1 volumen de glicerol frío y estéril. Los tubos se colocaron en baño de hielo seco y nitrógeno líquido para congelar y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

2.1.3 Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli*

La transformación de las células competentes se realizó utilizando el protocolo sistema (TOPO TA Cloning Invitrogen, 2006). Para efectuar la reacción de ligación, se tomaron tres tubos eppendorf de 1.5 ml, al primer tubo se le adicionaron 4 µl de producto de PCR, 1 µl de solución de sal, 1 µl del Vector pCR 2.1 TOPO y 150 µl de células de *E. coli*. Al segundo tubo se le añadieron 150 µl de células de *E.coli* y 1 µl del Vector pCR 2.1 TOPO y al tercer tubo se adicionaron 150 µl de células competentes de *E.coli*. Después de hacer estas preparaciones, los tubos eppendorf se colocaron en hielo por 30 minutos, entonces se les dió un choque térmico a 42°C por 30 segundos, y de inmediato se colocaron en hielo por 2 minutos, se añadieron 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente, se agitaron los tubos horizontalmente por 1 hora a una temperatura de 37°C, después se centrifugaron a 7,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente, se tiró un poco de sobrenadante de cada tubo y la pastilla se resuspendió en el resto de medio que quedó. Por otra parte se añadieron 40 µl de X-gal e IPTG a las cajas petri con medio LB con ampicilina 20 minutos antes de sembrar. La pastilla resuspendida de cada tubo se añadió a cada caja con el medio y se estrió cuidadosamente, se añadieron 20 µl de medio SOC a cada placa, con el fin de hacer una mejor distribución de las colonias y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día se seleccionaron 10 colonias de la caja con insertos por su coloración blanca, posteriormente se sembraron en cajas nuevas para estar completamente seguros de que no se hubieran seleccionado colonias sin insertos (azules), se dejaron a 37°C toda la noche y a la siguiente mañana se pudo comprobar que eran las transformantes.

2.1.4. Minipreparaciones para la extracción de DNA plasmídico

Las minipreparaciones de DNA de plásmido se realizaron de acuerdo al protocolo de Birnboim (1983).

Se prepararon 10 tubos con 5 ml de medio LB-ampicilina (50 mg/ml), se inocularon con una colonia bacteriana transformante y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación constante. Al siguiente día se tomó 1 ml del cultivo saturado de cada tubo y se colocó en tubos eppendorf, se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 minutos, se decantó el sobrenadante dejando 50 µl para resuspender la pastilla bacteriana. Se adicionaron 150 µl de solución Birnboim I y se agitaron los tubos levemente en vortex. Posteriormente se agregaron 300 µl de mezcla lítica (Birnboim II), se invirtieron tres veces para mezclar y dejar transcurrir la lisis durante cinco minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se adicionaron 225 µl de solución de acetato (Birnboim III), se mezclaron suavemente por inversión y se dejaron enfriar por 30 minutos en hielo; se centrifugaron por diez minutos a 12,000 rpm a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo y se adicionó un volumen de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, se agitaron suavemente y se refrigeraron a -20°C por veinte minutos, enseguida se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por cinco minutos y se recuperó la pastilla, esta se lavó con 700 µl de etanol al 70% y se rotó por el tubo, se eliminó el etanol lo más posible, tratando de no tocar la pastilla, se dejó evaporar el alcohol y esta se resuspendió con TE-RNAsa, por último se analizó el DNA plasmídico en geles de agarosa al 1%.

2.1.5. Digestión de los plásmidos recuperados en las minipreparaciones

Para conocer el tamaño de los insertos se tomaron 2 μ l del DNA plasmídico y se le adicionaron 10 unidades de la enzima de restricción *Eco* RI en un volumen final de reacción de 20 μ l.

La mezcla de reacción quedó integrada de la siguiente forma:

6 μ l DNA plasmídico
2 μ l Buffer de la enzima
1 μ l Enzima <i>Eco</i> RI
11 μ l Agua
<hr/>
20 μ l volumen total

Se mezclaron todos los elementos y se incubaron a 37°C por una hora. Inmediatamente después se calentaron a 65°C por 15 minutos, para suspender la reacción y separar los fragmentos de DNA; se enfrió en hielo por 5 minutos y se aplicó a un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como buffer de corrida.

2.1.6. Secuenciación, comparación y alineamiento

Una vez recuperados los insertos que exhibieron el tamaño según el diseño de los primers. Se seleccionaron seis de cada uno para conocer la secuencia nucleotídica y compararla con las secuencias reportadas en el banco de datos. Al obtener las secuencias de nucleótidos se analizaron en el sitio Web BLASTX y posteriormente fueron alineadas mediante el programa Vector NTI Advance 10.3.

2.2 Análisis tipo Southern blot

Para la determinación de los genes de las enzimas gtpch1, adcs, hppk/dhps en el genoma del nopal se llevó a cabo el análisis tipo Southern blot (Sambrook y col., 1989).

2.2.1 Extracción de DNA genómico de tejido vegetal

La extracción de DNA de tejido vegetal se realizó de acuerdo a protocolo del DNAzol (Invitrogen, 2001). Se partió de 0.3 gramos de tejido fresco. El tejido fue congelado con nitrógeno líquido, molido hasta que se obtuvo un polvo fino y se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml, posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de extracción DNAzol, se mezcló suavemente por inversión para homogenizar la mezcla y se incubó a 25°C con agitación constante durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 12 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al cual se le añadió 1 ml de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó por otros 5 minutos a 25°C en agitación constante, se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se le adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se agitó suavemente y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, nuevamente se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo al cual se le adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se agitó suavemente y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, se extrajo el sobrenadante y se precipitó con un volumen de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C durante 1 hora, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y se removió el sobrenadante, posteriormente la pastilla se lavó con 200 µl de DNAzol-Etanol (1ml/ 750 µl) se dió vortex para precipitar el DNA, se almacenó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12,000 rpm por 4 minutos, se removió todo el sobrenadante y la pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 70%, se centrifugó por 4 minutos a 12,000 rpm.

Finalmente se eliminó todo el etanol y se dejó secar por 5 minutos para descartar todo el remanente de alcohol. El DNA se disolvió en 70 µl de TE-RNAsa. La integridad del DNA obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, visualizados con bromuro de etidio. La concentración se calculó por densidad óptica a 260 nm utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] = \frac{\text{DO}_{260} \times 50 \times \text{F.D}}{1000}$$

[DNA]: Concentración de DNA µg/ ml

DO₂₆₀: Densidad óptica leída a 260 nm de longitud de onda

F.D: Factor de dilución = Volumen total /Volumen de la muestra de DNA

2.2.2. Preparación, digestión y purificación de la sonda

Para la preparación de la sonda se hizo la mezcla de reacción, quedando integrada de la siguiente forma:

6 µl	DNA plasmídico
2 µl	Buffer de la enzima
1 µl	Enzima <i>Eco</i> RI
11 µl	Agua
<hr/>	
20 µl	volumen total

Se mezclaron todos los elementos y se incubaron a 37°C al menos por 1 hora y se aplicó a un gel de agarosa al 1 % utilizando TAE como buffer de corrida. Para la purificación de la sonda se cortaron las bandas de DNA en un transiluminador (San Gabriel, CA. USA) y se colocaron en un tubo eppendorf.

Los fragmentos se purificaron utilizando el sistema QIAEX II (QIAGEN, Alemania 1993) como lo describe el fabricante.

2.2.3 Digestión de DNA genómico

Para la digestión se utilizaron 15 μl de DNA al cual se le agregaron 10 unidades de las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, en un volumen final de reacción de 60 μl , cada una. La mezcla de reacción, para cada una de las enzimas, quedó integrada de la siguiente forma:

26 μl de DNA de nopal
6 μl de Buffer de la enzima
6 μl de Enzima
22 μl de Agua
<hr/>
60 μl volumen total

Se mezclaron todos los elementos de la reacción y se incubaron a 37°C por 3 horas como mínimo. Después se calentó la mezcla a 65°C por 15 minutos, para suspender la reacción y se enfrió en hielo por 5 minutos, se tomó una alícuota de 5 μl , para observar la digestión parcial en geles de agarosa al 1%. Con la finalidad de digerir por completo el DNA genómico y evitar digestiones parciales, se realizó una segunda digestión con cada una de las enzimas, integrando la reacción de la siguiente forma:

60 μl de DNA de nopal
6 μl de Buffer de la enzima
6 μl de Enzima
41 μl de Agua
<hr/>
120 μl volumen total

Los reactivos de la digestión se mezclaron y se incubaron a 37°C durante toda la noche, posteriormente se calentó la mezcla a 65°C para detener la reacción y se enfrió en hielo durante 5 minutos. El DNA genómico fraccionado se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de acetato de amonio 10 M y se sometió a una temperatura de -20°C durante 3 horas. Para recuperar la pastilla de DNA se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos, se lavó dos veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 20 µl de agua estéril. Para separar los fragmentos, el DNA digerido se calentó durante 5 minutos a 65°C y posteriormente se enfrió en hielo por 5 minutos, se le agregaron 10 µl de buffer de carga y se aplicó a un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se corrió a 14 V durante 15 horas.

El DNA se visualizó por exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador, posteriormente el gel se sumergió en tinción con bromuro de etidio por 15 minutos.

2.2.4 Desnaturalización, neutralización y transferencia de DNA

El gel de agarosa se puso en contacto con una solución desnaturalizante (0.5M NaOH, 1.5 M NaCl) durante 30 minutos, después se lavó con agua desionizada estéril y se expuso en una solución neutralizante (0.5M Tris, 1.5M NaCl) durante 30 minutos, posteriormente el gel se lavó con la solución SSC 2X. El DNA se transfirió a una membrana de Nylon (HybondN⁺, Amersham, Little Chalfont, Englad) por capilaridad.

Después de haber hecho la transferencia, el DNA fue fijado a la membrana por una doble reacción de (1200x µJ/ cm²) en un Stratalinker, UV crosslinker (Stratagene, CA, USA).

2.2.5 Marcaje de sondas radiactivas

Se utilizaron 6 µl de la sonda resuspendidos en 25 µl de agua desionizada estéril. Se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos y después se colocó en hielo por otros 5 minutos, luego se le adicionó la mezcla de reacción Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences 2006) y se puso en hielo por 5 minutos, se adicionaron 2 µl de [³²P] dCTP y se incubó a 37°C por 1 hora. Después se puso a 95°C por 5 minutos y en hielo por otros 5 minutos.

2.2.6 Hibridación y exposición

La membrana fue prehibridada a 42°C con 15 ml de una solución de prehibridación (50% formamida, 5X SSC, 5% dextrán sulfato, 0.05% SDS, 5X reactivo de Denhart's y 100 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado) por al menos 2 horas, el DNA de timo o esperma de salmón fue desnaturalizado a 95°C por 5 minutos y otros 5 minutos en hielo antes de ponerlo en contacto con el buffer de prehibridación. La hibridación se realizó agregando la sonda marcada con ³²P a 42°C durante toda la noche.

Las membranas hibridadas se lavaron en condiciones de alta astringencia primero con una solución 4X SSPE, 0.1% SDS y después 2X SSPE, 0.1% SDS, posteriormente fueron expuestas a películas de rayos X para detectar las señales radiactivas (Kodak, Eastman Kodak, Rochester, N.Y.).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis bioquímico

1.1 Evaluación de la presencia de folatos en nopal por ensayo microbiológico

Para conocer los niveles de folatos en nopal se llevó a cabo un ensayo microbiológico con *Lactobacillus casei rhamnosus*, el cual permite obtener el resultado de folatos totales, ya que no discrimina entre las diferentes formas químicas de folatos. Este método está basado en el crecimiento del microorganismo, que responde a las formas monoglutámicas así como a las di y triglutámicas (Olivares y col., 2005).

La determinación de la curva estándar para la evaluación del contenido de folatos en nopal consistió en incubar al microorganismo en un medio de cultivo específico suplementado con diferentes concentraciones de ácido fólico (0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 ng /ml) como se muestra en la Figura 7, donde se puede observar que el crecimiento de la bacteria exhibe una dependencia de la cantidad de folatos, además de sensibilidad y estabilidad. Esta curva se determinó siguiendo el protocolo descrito por (Grossowicz y col., 1981) y al ser comparadas el crecimiento del microorganismo fue similar.

Posteriormente se llevó a cabo la homogenización de las muestras de nopal en tres etapas de desarrollo y espinaca que se uso como control. Se sometieron a tratamientos enzimáticos para la extracción de los folatos.

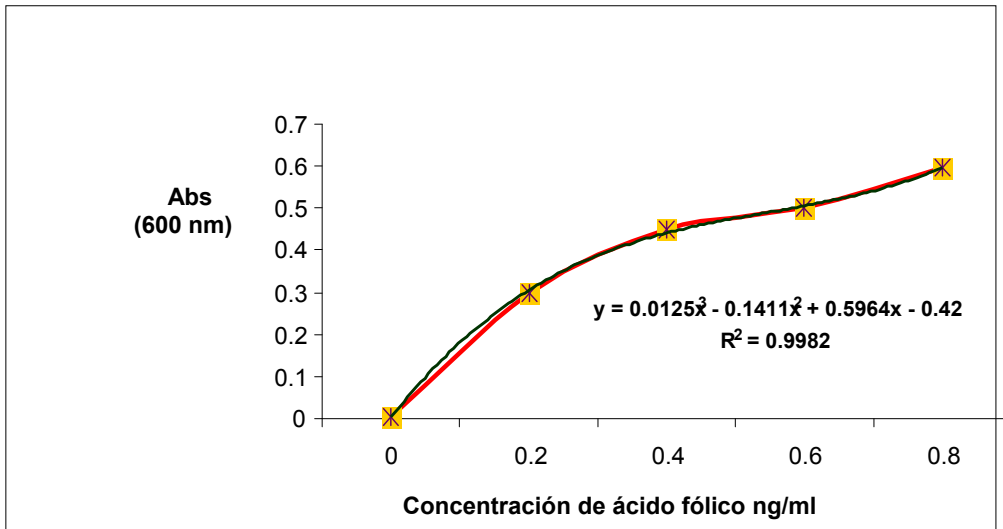


Figura 7. Curva estándar para la cuantificación de folatos en nopal por ensayo microbiológico (*Lactobacillus casei*).

El tratamiento con la enzima conjugasa se usa para hidrolizar la forma poliglutamato a monoglutamato que es la forma principal de los folatos en alimentos (Johnston y col., 2001). Como se muestra en la Figura 8 los extractos fueron tratados con la enzima conjugasa y se puede observar que conforme incrementa el tiempo de incubación del microorganismo con las muestras se obtiene una mayor concentración de folatos en cada una de las etapas de desarrollo, sin embargo, la etapa que presenta mayor concentración de folatos es la etapa 2 (1.87 ng/g), seguido de la etapa 1 con 1.85 ng/g, y por último la etapa 3 con 1.46 ng/g ^{a)}. La concentración de folatos en espinaca obtuvo un valor de 467.5 ng/g ^{b)}. Cabe mencionar que el periodo de incubación donde se obtuvieron las mayores concentraciones fue a las 54 horas para los dos extractos.

Se realizó un análisis estadístico por la prueba de rangos múltiples de Tukey tomando como factor el efecto de la etapa de desarrollo del nopal en cada uno de los tiempos de incubación para cada tratamiento.

En este tratamiento se determinó que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la etapa de desarrollo 1 y 2 en comparación con la etapa 3.

Al analizar los resultados obtenidos se observó que el contenido de folatos en espinaca estaba por debajo de los valores reportados en la literatura, ya que según Karatas y col. (2007) reportaron que el contenido de folatos en espinaca es mayor a los 658 ng/g, mientras que Suárez (2003) reportó una concentración de 2,600 ng/g. Por tal motivo las muestras tanto de nopal como espinaca se sometieron a un tratamiento con las enzimas proteasa y conjugasa.

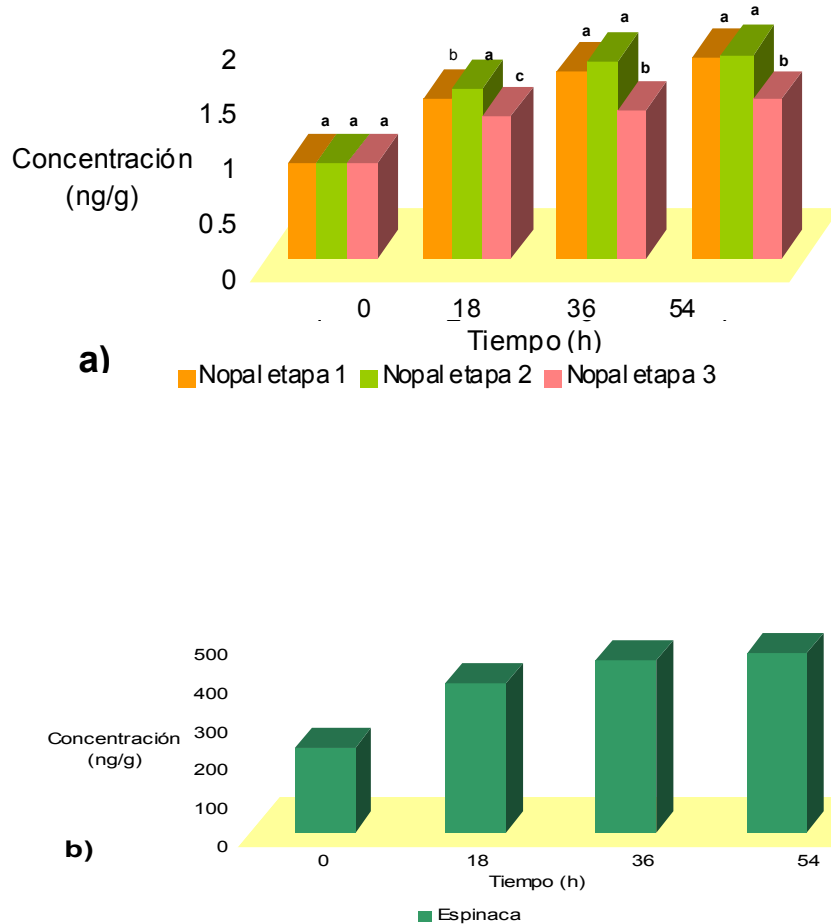


Figura 8. Concentración de folatos en muestras de nopal y espinaca. Tratamiento con una enzima. La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo microbiológico de *L.casei*. ^{a)} nopal en tres etapas de desarrollo y ^{b)} espinaca. Ambas tratadas con la enzima conjugasa. Valores seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente a $p=0.05$ de acuerdo a la prueba de rangos múltiples.

En el tratamiento con las dos enzimas hubo un incremento de la concentración de folatos en el nopal en las tres etapas de desarrollo con respecto a lo obtenido en el tratamiento con una sola enzima. En la Figura 9 se puede observar que la mayor concentración de folatos se obtuvo en el último tiempo de incubación (54 horas) tanto en nopal en las tres etapas de desarrollo como en la espinaca. ^{a)} En la etapa 1 se cuantificó una concentración de 2.2 ng/g, mientras que en las etapas 2 y 3 se obtuvieron valores iguales de 2.0 ng/g cada una. ^{b)} La espinaca obtuvo una concentración de 574.25 ng/g.

Al realizar el análisis de varianza, se determinó que las etapas 2 y 3 son iguales entre ellas y tienen una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa de desarrollo 1.

El incremento en la concentración de folatos en los extractos supone que es debido a la influencia que tienen las enzimas sobre las formas de folatos de los residuos de glutamato por acción de la conjugasa y de los folatos unidos a proteínas por la proteasa (Pandurangi y LaBorde, 2004). Yamada (1979) reportó un incremento total de folatos en leche humana cuando se hizo una digestión con proteasa seguida de un tratamiento con conjugasa. (Johnston y col., 2001).

Al observar que el contenido de folatos estaba aumentando conforme el tratamiento enzimático, se llevó a cabo la digestión de los extractos con un tratamiento a base de tres enzimas α -amilasa-proteasa-conjugasa.

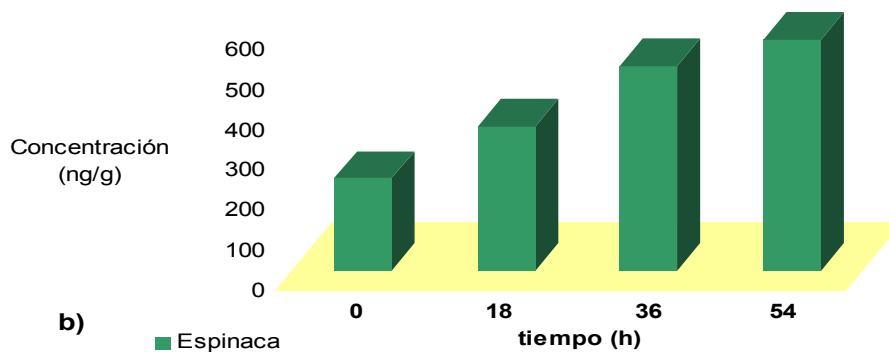
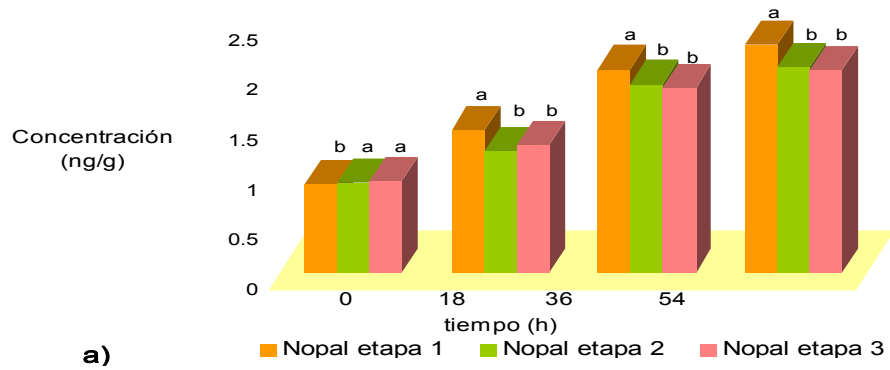


Figura 9. Concentración de folatos en muestras de nopal y espinaca. Tratamiento con dos enzimas. La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo microbiológico de *L.casei*. a) nopal en tres etapas de desarrollo y b) espinaca. Ambas tratadas con las enzimas proteasa-conjugasa. Valores seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente a $p=0.05$ de acuerdo a la prueba de rangos múltiples.

El tratamiento con tres enzimas nos permitió obtener la mayor concentración de folatos en cada uno de los extractos, en comparación con los tratamientos anteriores. En la Figura 10 se puede observar que en el tiempo de incubación a las 54 horas también se obtuvieron los valores más altos de folatos. ^{a)} En la etapa 1 se cuantificó una concentración de 5.0 n/g, seguido de la etapa 3 con 3.6 ng/g y de la etapa 2 con 2.6 ng/g. ^{b)} Mientras que la espinaca alcanzó valores por encima de los 1,200 ng/g .

Al hacer el análisis de varianza, se pudo determinar que había una diferencia significativa estadísticamente en las tres etapas de desarrollo. Con estos resultados podemos sugerir que en el tratamiento con tres enzimas es donde se obtienen los valores más altos y el periodo óptimo de incubación es de 54 horas. Estudios que se han realizado para la cuantificación de folatos en alimentos sugieren que el tratamiento triple enzimático suministra los valores más altos (Tamura, 1998) y que puede ser debido a que los folatos están fuertemente unidos a los carbohidratos y proteínas donde no pueden ser liberados por un solo tratamiento, la adición de una tercera enzima como la α -amilasa permite la digestión de carbohidratos (Johnston y col., 2002).

En otra investigación llevada a cabo por Tamura y col. (1997) quienes cuantificaron el contenido de folatos en alimentos mediante un ensayo microbiológico con *L. casei* y tres tratamientos enzimáticos al analizar sus resultados observaron que los valores más bajos los obtuvieron con el tratamiento de una sola enzima (conjugasa), mientras que en el tratamiento con dos enzimas (proteasa –conjugasa) aumentó la concentración en un 60%, al someter sus muestras al tercer tratamiento el contenido de folatos alcanzó un 217% más que el obtenido en el tratamiento individual. Wong (2000) notó una diferencia de concentración de folatos en soya al ser sometida a tratamiento con una sola enzima (100 μ g/ 100 g) mientras que al ser desconjugada por tres enzimas exhibió una mayor concentración (400 μ g/ 100 g).

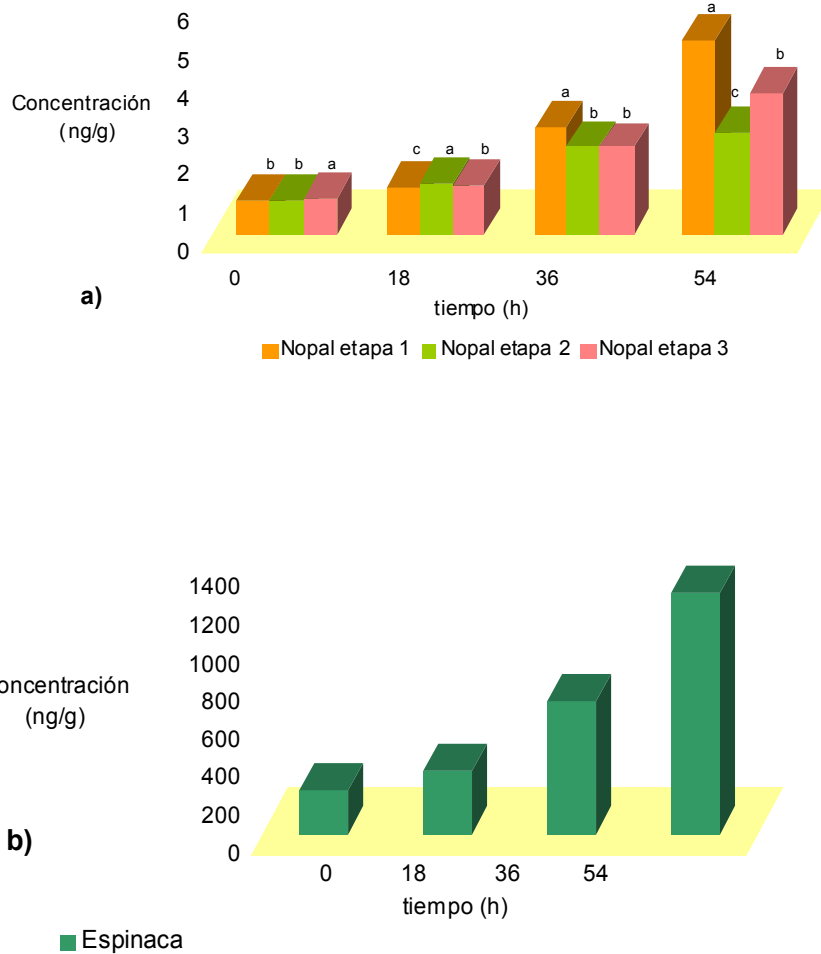


Figura 10. Concentración de folatos en muestras de nopal y espinaca. Tratamiento enzimático triple. La cuantificación se llevó a cabo mediante el ensayo microbiológico de *L.casei*. ^{a)} nopal en tres etapas de desarrollo y ^{b)} espinaca. Ambas tratadas con las enzimas. α -amilasa-proteasa-conjugasa. Valores seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente a $p=0.05$ de acuerdo a la prueba de rangos múltiples.

1.2 Determinación de la concentración de folatos en nopal por la técnica de ELISA

Para la determinación de folatos presentes en nopal, primero se corrieron los estándares de ácido fólico de 0 a 400 ng/g. En la Figura 11 se puede observar la curva estándar, donde a mayor concentración de ácido fólico se obtuvo una menor absorbancia.

Posteriormente se corrieron las muestras de nopal en las tres etapas de desarrollo. En el nopal etapa de desarrollo 1 se obtuvo una concentración de 5.6 ng/g, en la etapa de desarrollo 2 se alcanzó un nivel de 5.55 ng/g y en la etapa 3 se obtuvo un valor de 5.62 ng/g ^{a)} (Figura 12). El máximo valor encontrado en espinaca fue 1,338 ng/g ^{b)}

Sin embargo, hay que señalar que al someter los valores al análisis de varianza utilizando como estadístico Tukey no se observaron diferencias significativas estadísticamente en ninguna de las etapas de desarrollo del nopal. A diferencia de los resultados en el ensayo microbiológico, el nopal que exhibe mayor cantidad de folatos es el que se encuentra en la etapa de desarrollo 3. También hay que resaltar que la concentración mayor se obtuvo en el tiempo de lectura "0". Con estos resultados podemos concluir que este método de cuantificación de folatos comparado con el de *L. casei* es más sensible y permite tener los resultados en plazo corto de tiempo.

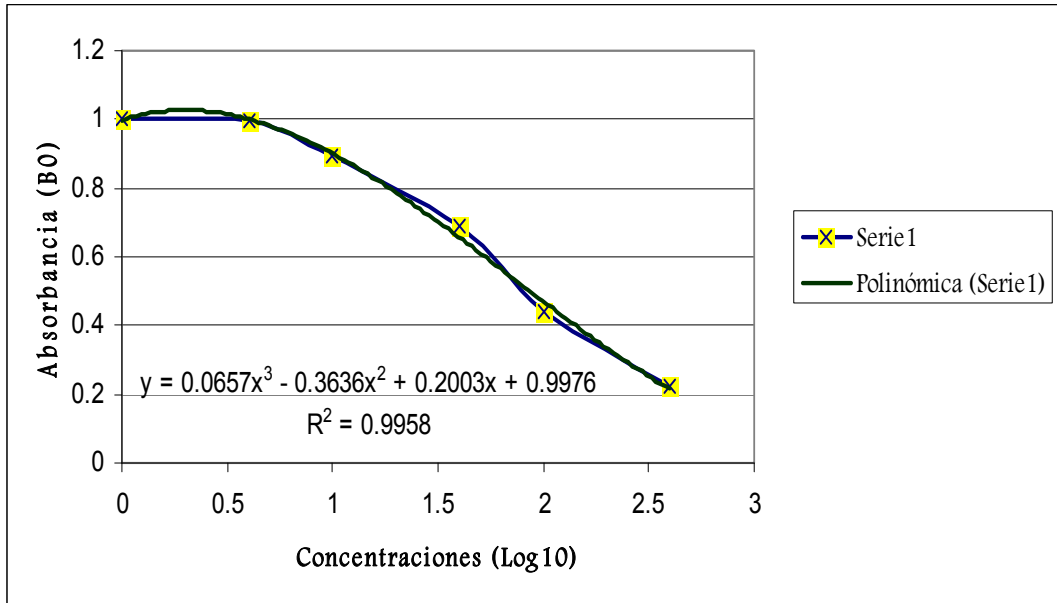
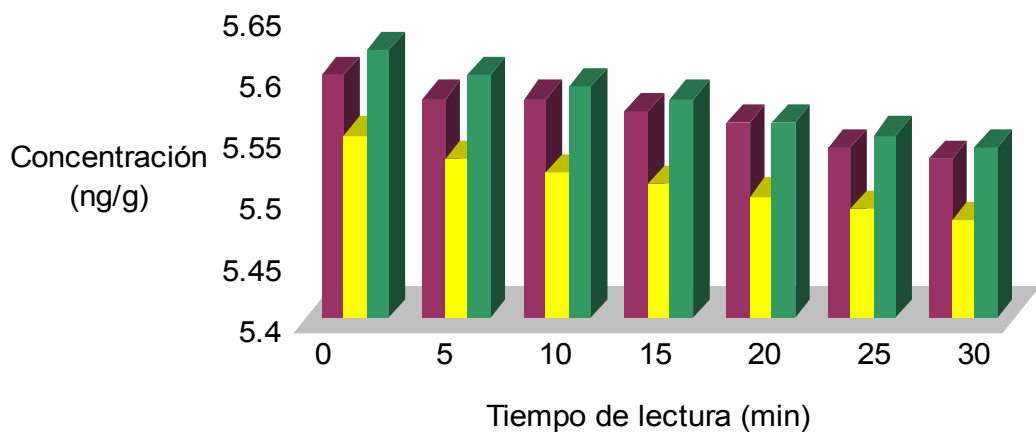
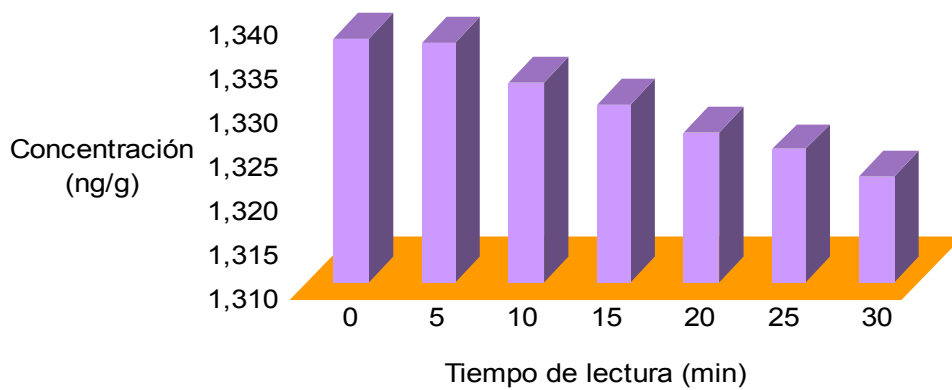


Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de folatos en nopal y espinaca por la técnica de ELISA.



a) Nopal etapa 1 Nopal etapa 2 Nopal etapa 3



b) Espinaca

Figura 12. Comparación de los niveles de folatos en nopal y espinaca. La cuantificación se realizó utilizando la técnica de ELISA. ^{a)} nopal en tres etapas de desarrollo ^{b)} espinaca.

2. Análisis molecular

2.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

2.1.1 Amplificación de los fragmentos por PCR

Para comprobar la existencia de los genes que codifican para las enzimas gtpch1, adcs y hppk/dhps que participan en la ruta de biosíntesis de folatos fue necesario aislar DNA genómico del material vegetal seleccionado. Se utilizó como control *Arabidopsis thaliana* y se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos de cada uno de los genes. La reacción se realizó a diferentes condiciones de desnaturalización, alineamiento y síntesis a diferentes ciclos y los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1%.

En la Figura 13 se observa la presencia de una banda amplificada en el carril 2; esta banda corresponde al tamaño esperado de 1401 pb de la enzima gtpch1. En la Figura 14 en el carril 2 se puede observar la amplificación de un fragmento de 2761 pb correspondiente al gen que codifica para la enzima adcs. Para la enzima hppk/dhps se obtuvo una banda (carril 2) de 1455 pb, correspondiendo al tamaño que se esperaba (Figura 15).

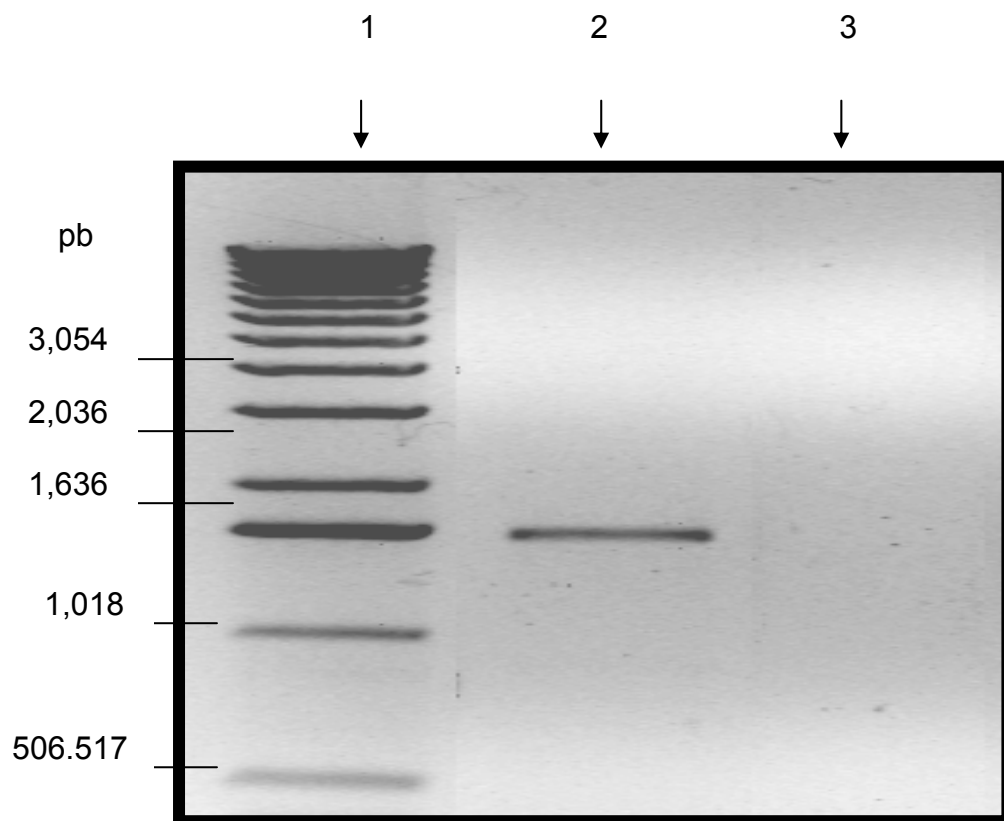


Figura 13. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima gtpch1 en *Arabidopsis thaliana*. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen gtpch1 de *Arabidopsis thaliana*, Carril 3) Control negativo (agua).

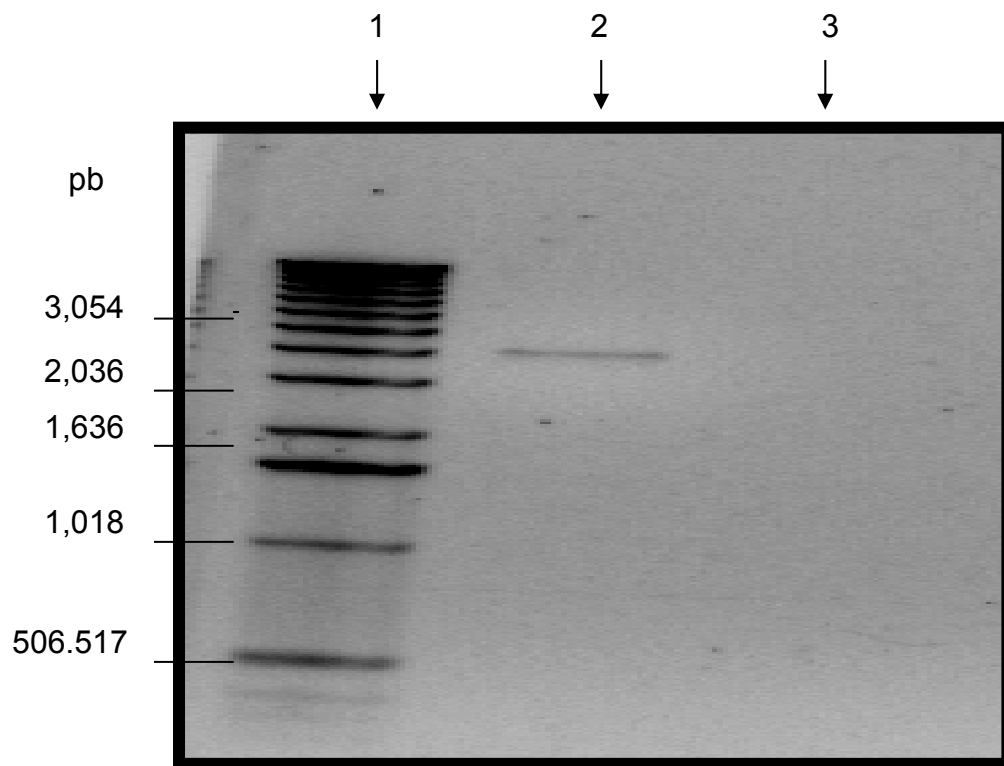


Figura 14. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima adcs en *Arabidopsis thaliana*. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen adcs de *Arabidopsis thaliana*, Carril 3) Control negativo (agua).

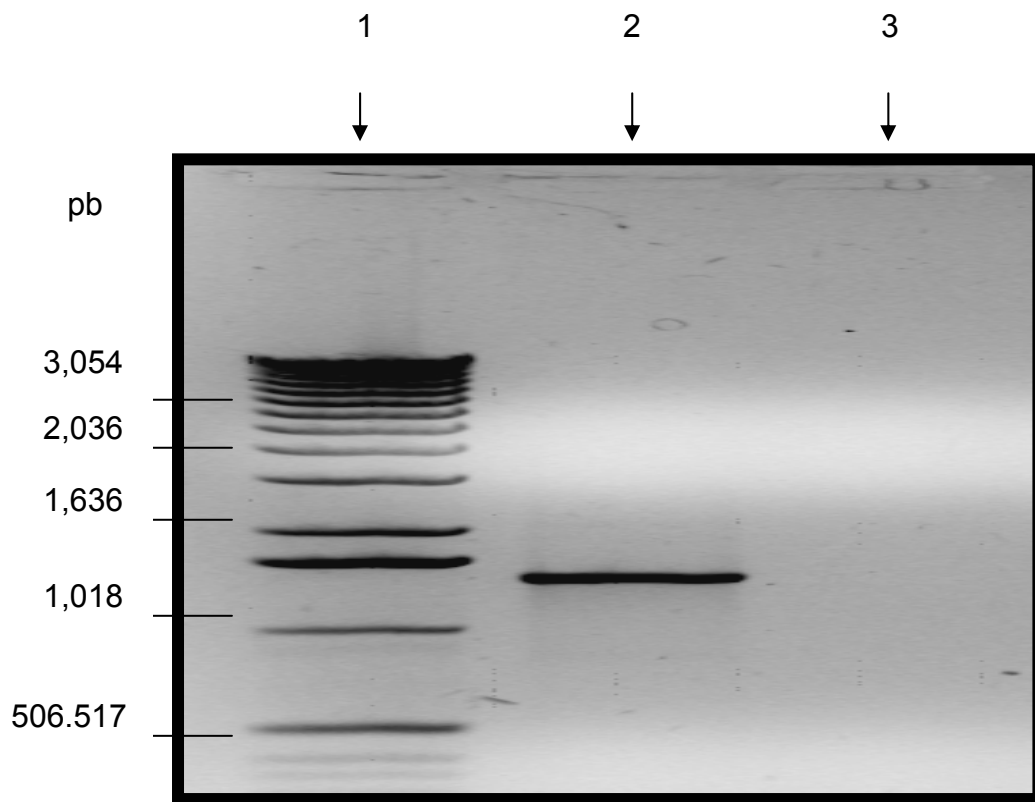


Figura 15. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima hppk/dhps en *Arabidopsis thaliana*. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen hppk/dhps sintasa de *Arabidopsis thaliana*, Carril 3) Control negativo (agua).

Una vez obtenidos los productos de PCR de cada uno de los fragmentos se clonaron en el vector pCR 2.1 TOPO y se transfirieron a *Escherichia coli* por choque térmico y comprobados los insertos se procedió a conocer el tamaño de cada uno mediante una digestión con *EcoRI*. En la Figura 16 se puede observar el producto de la clonación de cada uno de los insertos, a) corresponde a la enzima gtpch1 donde se obtuvieron bandas de diferentes tamaños, pero algunas correspondieron al tamaño esperado, b) los fragmentos que se obtuvieron de la enzima adcs fueron de tamaños variados, sin embargo se lograron observar algunos que se relacionaban al tamaño correspondiente, c) Las bandas de la enzima hppk/dhps fueron las esperadas.

Los fragmentos liberados de cada una de las enzimas fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y fueron seleccionados seis de cada uno para conocer la secuencia nucleotídica.

Las secuencias de los fragmentos se compararon con las reportadas en el banco de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/db>), utilizando los programas BLAST y BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST7query>).

El análisis correspondiente para la secuencia de la gtp ch1 presentó una homología del 100% con el RNA mensajero de la gtp ciclohidrolasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (NM_111607.2), un 71% con *Vitis vinifera* (AM439936.2), un 70% con el RNA mensajero de la gtp ciclohidrolasa 1 de *Triticum aestivum* (EF095153.1), un 74% con el DNA genómico de *Oryza sativa* (AP008210.1) y un 72% con el RNA mensajero de *Zea mays* (AY111090.1). Cuadro 10.

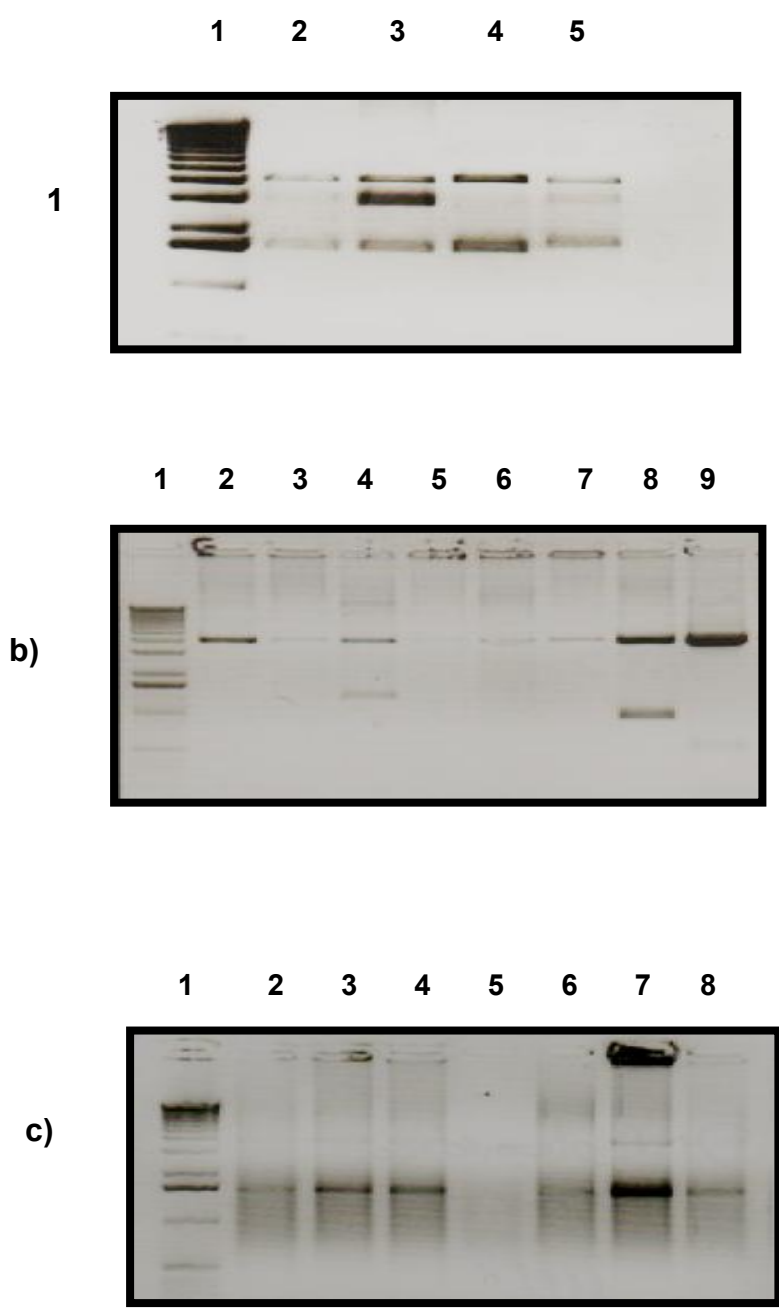


Figura 16. Clonación de los productos de la amplificación

- a) *gtpch1*, Carril 1 PM 1kb, Carril 2 al 5 clonas digeridas con *EcoRI*
- b) *ADCS*, Carril 1 PM 1kb, Carril 2 al 9 clonas digeridas con *EcoRI*
- c) *HPPK/DHPS*, Carril 1 PM 1 kb, Carril 2 al 8 clonas digeridas con *EcoRI*

En el Cuadro 11 se puede observar que en el análisis de comprobación para la secuencia de la adcs nos permitió conocer una homología del 99% con el RNA mensajero de la aminodeoxicorismato sintasa de *Arabidopsis thaliana* (AY096797.1) y un 70% con la antranilato sintasa de *Arabidopsis thaliana* (NM_179796.1).

El análisis correspondiente para la secuencia de la hppk/dhps presentó una homología del 99% con el RNA mensajero de la hppk/dhps de *Arabidopsis thaliana* (AJ866732.1), un 99% con la secuencia completa del RNA mensajero de la dihidropteroato sintasa de *Arabidopsis thaliana* (NM_105586.2), un 70% con *Vitis vinífera*, 68% con el RNA mensajero de la hppk/dhpS de *Pisum sativum* (Y08611.1), un 66% con el DNA genómico de *Oryza sativa* (AP008213.1) y un 64% con el RNA mensajero de *Triticum aestivum* (EF208803.1). Cuadro 12

Estos resultados nos permitieron comprobar la presencia de los genes de cada una de las enzimas en *Arabidopsis thaliana*, por lo cual se utilizaron las mismas condiciones de amplificación, clonación, secuenciación y comparación en el banco de datos para las muestras de nopal.

Cuadro 10. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima gtp ciclohrolasa 1 de *Arabidopsis thaliana*.

Secuencia	No. de Accesión	Valor E	% de identidad
RNAm de gtp ciclohrolasa 1 de <i>A. thaliana</i>	NM_111607.2	0.0	100
cDNA clona GSLTFB31ZG09 de <i>A. thaliana</i> col 0	BX822377.1	0.0	98
<i>Vitis vinifera</i> contig VV8X139415.3	AM439936.2	1e-41	71
<i>Triticum aestivum</i> , RNAm de isoformaTaA de gtp ciclohrolasa 1	EF095153.1	e-13	70
<i>Oryza sativa</i> (cultivar japonica)DNAgenómico, cromosoma 4	AP008210.1	2e-06	74
<i>Zea mays</i> CL581 1 secuencia de RNAm	AY111090.1	0.55	72

Cuadro 11. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima adcs de *Arabidopsis thaliana*.

Secuencia	No. de Accesión	Valor E	% de identidad
RNAm de aminodeoxicorismato sintasa/ glutamina amidotransferasa de <i>A thaliana</i>	AY096797.1	0.0	99
RNA mensajero de cds tpg/BK001419.1 <i>A thaliana</i>	At2g28880	0.0	99
Antranilato sintasa de <i>A thaliana</i>	NM179796.1	0.0	70

Cuadro 12. Comparación de las secuencias obtenidas de la enzima hppk/ dhps de *Arabidopsis thaliana*.

Secuencia	No de Accesión	Valor E	% de identidad
RNAm de 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfocinasa/7,8-dihidropteroato sintasa de <i>A. thaliana</i>	AJ866732.1	0.0	99
Secuencia completa del RNAm de la dihidropteroato sintasa (AT1G69190) de <i>A thaliana</i>	NM_105586.2	0.0	99
<i>Vitis vinifera</i> contig VV8X038344.10	AM461419.2	0.0	70
<i>Pisum sativum</i> , RNAm de dihidropterina pirofosfocinasa/dihidropteroato sintasa	Y08611.1	1e-145	68
<i>Oryza sativa</i> (cultivar japónica) DNA genómico cromosoma 7	AP008213.1	2e-93	66
<i>Triticum aestivum</i> RNAm de hppk/dhps	EF208803.1	5e-69	64

Al determinar las condiciones de amplificación para el gen de la enzima gtpch1 en nopal, se obtuvo como producto una banda de 1401 pb, correspondiendo al tamaño obtenido en *Arabidopsis thaliana* (Figura 17). Se hicieron diversos ensayos para el gen de la enzima adcs pero el producto de la amplificación fue menor a 1500 pb, diferente a la reportada en *Arabidopsis thaliana* (Figura 18). Para el gen de la enzima hppk/dhps, se obtuvo un producto de amplificación menor a lo que se había obtenido en *Arabidopsis thaliana* menos de 1000 pb (Figura 19).

Al obtener los productos de PCR se clonaron siguiendo el mismo procedimiento que se llevó a cabo para *Arabidopsis thaliana*. En la Figura 20 se puede observar el producto de la clonación de cada uno de los insertos, a) corresponde al gen de la enzima gtpch1 donde se obtuvieron bandas de diferentes tamaños, algunas un poco más bajas que las obtenidas en la amplificación, b) los fragmentos que se obtuvieron del gen de la enzima adcs fueron de tamaños variados, sin embargo se lograron obtener algunos que se relacionaban al tamaño correspondiente. Cabe señalar que no se pudieron obtener clonas de la enzima hppk/dhps, se realizaron variando las condiciones para tratar de obtener las transformantes pero no se logró.

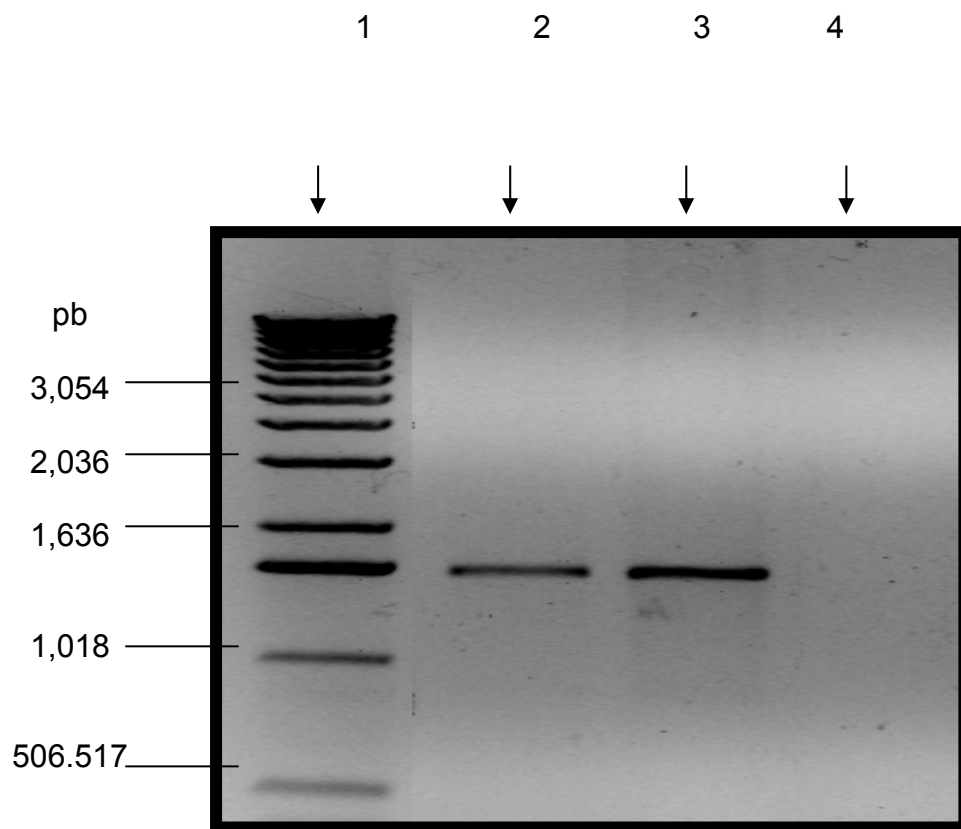


Figura 17. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima gtpch1 en nopal (*Opuntia ficus indica*). Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen gtpch1 de *Arabidopsis thaliana* Carril 3) gen gtpch1 en nopal, Carril 4) Control negativo (agua).

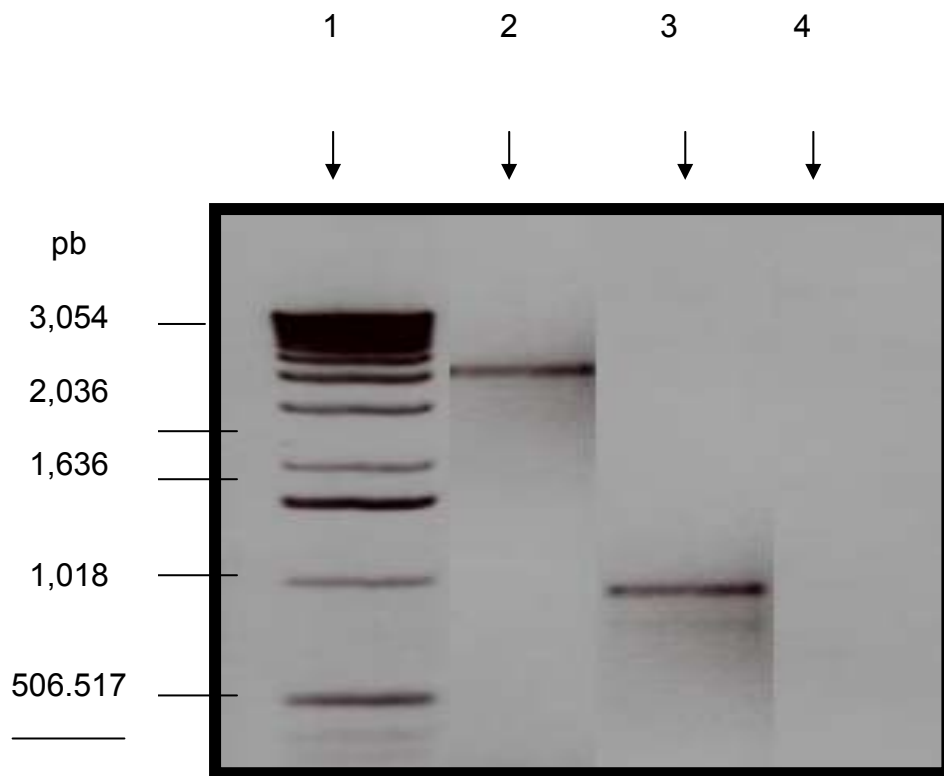


Figura 18. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima adcs en nopal (*Opuntia ficus indica*). Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen adcs de *Arabidopsis thaliana* Carril 3) gen adcs en nopal, Carril 4) Control negativo (agua).

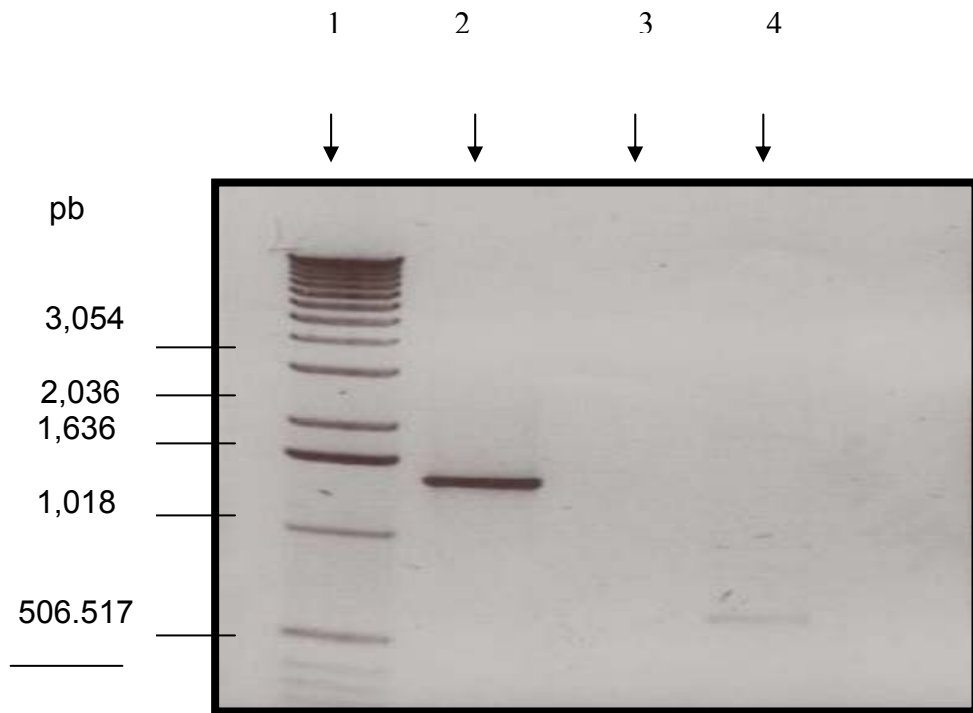


Figura 19. Amplificación del fragmento del gen que codifica para la enzima hppk/dhps en nopal (*Opuntia ficus indica*). Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 2) gen hkkp/dhps de *Arabidopsis thaliana* Carril 3) gen hppk/dhps en nopal, Carril 4) Control negativo (agua).

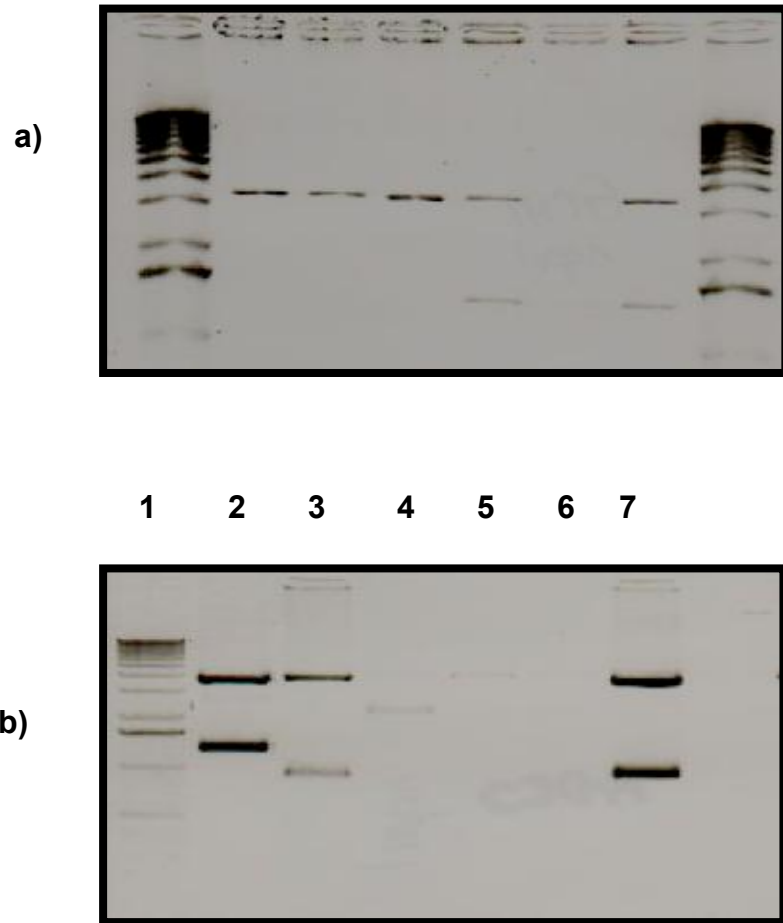


Figura 20. Clonación de los productos de la amplificación

- a) gtpch1, Carril 1 PM 1kb, Carril 2 al 8 clonas digeridas con *EcoRI*
 b) adcs, Carril 1 PM 1kb, Carril 2 al 7 clonas digeridas con *EcoRI*

Los fragmentos obtenidos de las dos enzimas fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y se seleccionados seis de cada uno para conocer la secuencia nucleotídica.

El análisis correspondiente para la secuencia de la gtpch1 presentó una homología del 63% con la gtp ciclohidrolasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AF489530.1), un 63% con el RNA mensajero de la gtp ciclohidrolasa de *Arabidopsis thaliana* (NM111607.2) y un 63% con el cromosoma IIIBACTIB9 de *Arabidopsis thaliana* (AC012395.5). Cuadro 13.

Las secuencias de los fragmentos de la enzima adc sintasa presentaron una homología del 100% con el RNA mensajero de la aminodeoxicorismato sintasa/ glutamina aminotransferasa de *Arabidopsis thaliana* (AY096797.1), un 100% con el RNA mensajero de la antranilato sintasa de *Arabidopsis thaliana* (NM179796.1), un 100% con el cromosoma 2F8N16 de *Arabidopsis thaliana* (ACO05727.3) y un 84% con el genoma de la *Vitis vinifera* (AM479423.3). Cuadro 14.

Es importante mencionar que la homología del 100% que presentó la aminodeoxicorismato sintasa con respecto a la antranilato sintasa, se debe a que las dos enzimas tienen algunas funciones similares como la utilización de corismato como substrato para la síntesis de triptófano (vía antranilato sintasa) y para la síntesis de folatos (vía aminodeoxicorismato sintasa) (Sahr y col., 2006).

Cuadro 13. Comparación de la secuencia obtenidas de la enzima gtpch1 en nopal (*Opuntia ficus indica*).

No. de Acceso	Descripción	% Identidad
AF489530.1	gtp ciclohidrolasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63%
NM111607.2	RNA mensajero de gtp ciclohidrolasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> AT3G07270	63%
AC012395.5	Cromosoma IIIBACTIB9 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63%

Cuadro 14. Comparación de la secuencia obtenidas de la enzima adcs en nopal (*Opuntia ficus indica*).

No. de Acceso	Descripción	% Identidad
AY096797.1	RNA mensajero de aminodeoxicorismato sintasa/glutamina aminotransferasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> At2g28880/F8N16.17	100%
NM179796.1	RNA mensajero de antranilato sintasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	100%
AC005727.3	Cromosoma 2F8N16 Secuencia completa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	100%
AM479423.3	<i>Vitis vinifera</i> contig VV 78X184545.6 genoma completo	84%

2.2 Comparación y alineamiento de las secuencias genéticas

Para hacer una comparación de las secuencias nucleóticas de las enzimas gch1 y adcs de nopal con respecto a las secuencias reportadas de *Arabidopsis thaliana* se hizo un alineamiento de ambas secuencias y se encontraron algunos sitios homólogos. Figuras 21y 22.

2.3 Análisis tipo Southern blot

El análisis Southern blot confirmó la existencia de los genes que codifican para las enzimas gtpch 1 y la enzima bifuncional hppk/dhps. Las secuencias de estos genes que codifican para cada una de las enzimas se utilizaron como sonda para determinar la organización genómica en el nopal. La figura 23 muestra el autorradiograma donde se detectaron señales positivas: a) corresponde al gen de la enzima gtpch1 donde se detectaron algunas señales positivas en el carril 2 correspondientes a la hibridación de la sonda. Estas muestras fueron digeridas con HINDIII, mientras que en los carriles 1 y 3 se observaron bandas correspondientes a DNA de nopal sin digerir. b) corresponde al gen de la enzima hppk/dhps, se detectaron señales positivas en los carriles 2, 3 y 6, mientras que los carriles 1, 4 y 5 es DNA de nopal sin digerir. En el caso del gen de la enzima adcs se hicieron varios análisis pero no se obtuvo el resultado esperado.

1051 ATATTGGCTA CTTTTGTGCT GAAAGATCCAA CCCCAAACC. 1100
 A. ε GAATTCGC. . . CTTTGAAGG. GATGTTGAAATCTGGAA GTT 1150
 N

1101 TTTCACTCATG AAAGCGATTG TACACTTTTA TGGGTTCA. . .
 A. ε CTATACGTCC TTT. CTCA CGAA. . . GTTTG IGAAGCA TTTTGGCA CATC 1200
 N 1151

1201 GCAAGAGAGG ATGACTCGAC AGATCGCTGA AAGCTATCG
 A. ε AGACTCAGAA TAAAGATA TTCA TTTCTTTCC ACAGCATCTA AGCA. TGGAG 1250
 N 1201

1251 GCGGGGATGT GATTGTGTG GCGGAAGCTG GGCATAC TTTG
 A. ε CCTTGTGTTG TTTGACGATGT TATTGATGCA TCATC. GTTG AGCTGTTT C 1300
 N 1251

1301 AGAGGAATTG AGAAGTTTG AAGCAGCAC GCGACATCG
 A. ε TATGATCTCT . GGGCAATTG TGACCCTCCAT AT. CATAAGC TCGT. ATTAC 1350
 N 1301

1351 TCGGTTTTCG AGTGACAAT TCCGCAAGAGC GATGTTCTTA
 A. ε CAGCTCTGG AATGTTTTGG GCT. T GTTACTTGC AGTGCATA TTA 1400
 N 1351

1401 ATACAAC TAA TGCCTTGAAG ACAGAGTCAA GCTC. . TCCA
 A. ε GATATC. CC ATTCAC. GCCTTGAAG ACAGAGTCAA GCAAGGCGA
 N 1401

1401 TTTTGA
 A. ε AATTC. .

Figura 21. Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de la enzima gch1 de *Arabidopsis thaliana* y nopal.

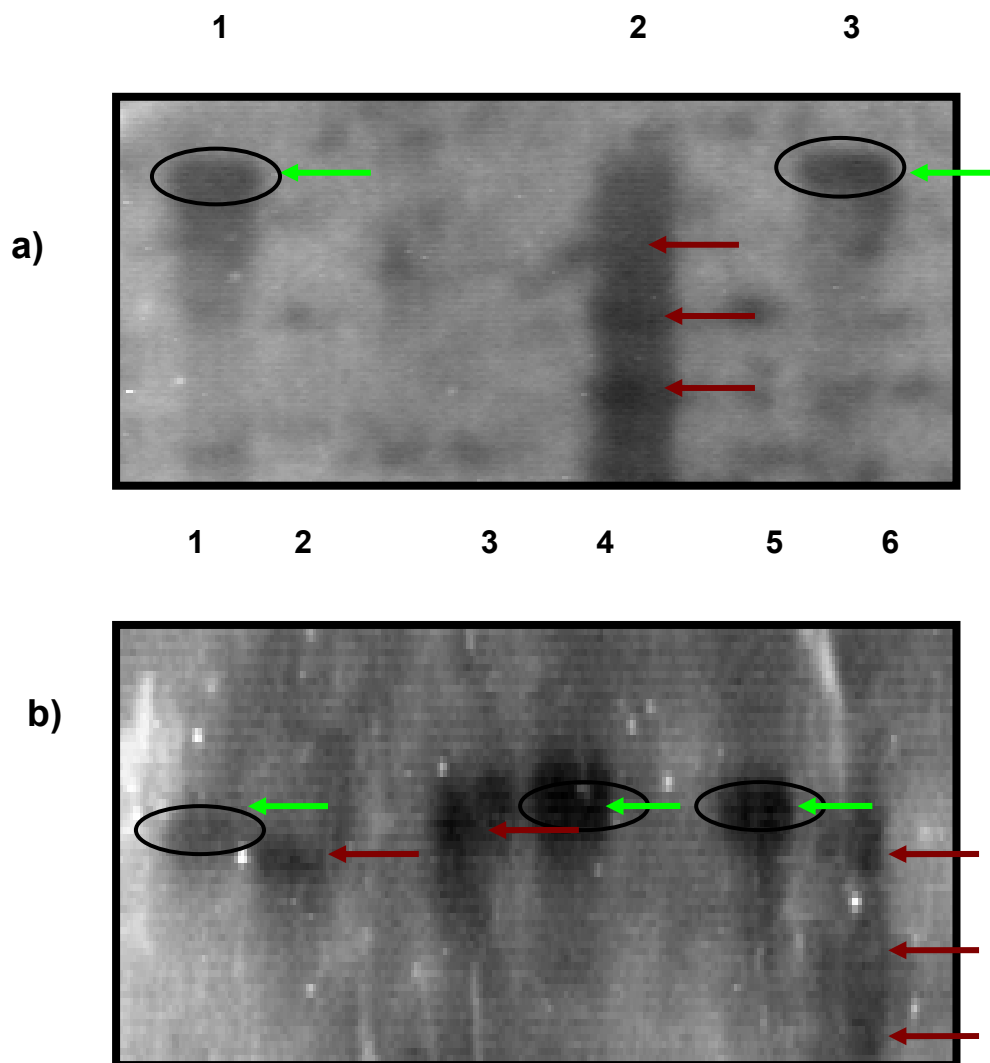


Figura 23. Análisis tipo Southern blot de muestras de nopal

- a) gen *gtpch1* Carriles 1 y 3- DNA de nopal sin digerir
 Carril 2- digestión de DNA de nopal con *Hind* III
- b) gen *hppk/dhps* Carriles 1, 4 y 5- DNA de nopal sin digerir
 Carril 2- digestión de DNA de nopal con *Bam* HI
 Carril 3- digestión de DNA de nopal con *Eco* RI
 Carril 6- digestión de DNA de nopal con *Hind* III

VII. CONCLUSIONES

1. Se logró la identificación y cuantificación de folatos en el nopal por ensayo microbiológico, estableciendo que el tratamiento triple enzimático y en el periodo de incubación de 54 horas fue donde se lograron cuantificar los máximos valores de folatos en el nopal. Los niveles cuantificados estuvieron en el rango de 1.87 a 5.0ng/g variando en cada etapa de desarrollo del nopal.
2. Mediante la técnica de análisis de ELISA se pudieron detectar valores de 5.6 ng/g de folatos en nopal en las tres etapas de desarrollo sin alguna diferencia significativa, por lo cual la técnica de ELISA es un método más sensible comparado con el de *Lactobacillus casei*, para la cuantificación de folatos en muestras de nopal, además de la rapidez.
3. Se logró comprobar la existencia de las secuencias nucleotídicas que codifican para las enzimas gtpch1, adcs y hppk/dhps en *Arabidopsis thaliana* por medio del análisis de PCR, secuenciación, alineamiento y comparación en el banco de datos en el NCBI. Se detectó una homología del 100% para la enzima gtpch1, 99% para las enzimas adcs y hppk/dhps.
4. Se pudieron identificar las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las enzimas aminodeoxicorismato sintasa y gtp ciclohidrolasa 1 en nopal, por medio de análisis PCR, secuenciación, alineamiento y comparación en el banco de datos en el NCBI. Mediante la comparación de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y nopal, se encontraron regiones homólogas del 63% para la enzima gtp ciclohidrolasa 1 y un 100% para la enzima adc sintasa.
5. En el análisis tipo Southern blot se confirmó la existencia de los genes que codifican para las enzimas gtpch1 y hppk/dhps en el genoma del nopal.

VIII. PERSPECTIVAS

1. El nopal es un cultivo potencial de manipulación genética para incrementar los niveles de folatos.
2. Optimizar el ensayo microbiológico de *Lactobacillus casei* y analizar el contenido de folatos en diferentes variedades de nopal.
3. Analizar más a fondo la actividad de las enzimas gtpch1, adcs y hppk/dhps
4. Mejorar la técnica de extracción de DNA de nopal

IX. LITERATURA CITADA

- Alvarado**, N. M. y **Díaz**, C. M. I. 2003. Nueva presentación del queso tuna. Memoria del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas. México. p. 246.
- Anaya-Pérez**, M.A. 2001. History of use of Opuntia as forage in Mexico. ICactus (Opuntia spp) as forage. Eds: Mondragón-Jacobo, C., Pérez-González, S. FAO, Rome, Italy pp. 5-12.
- ASERCA**. 2001. De nuestra cosecha. Nopal, leyenda, comercio futuro en México. Clarid. Agrop.No.98.
<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/098/ca098.pdf>
- Basile**, F. 2001. Economic aspects of Italian cactus pear production and market. J Profess Assoc Cactus Dev 4: 31-49.
- Basset**, G.J., Quinlivan, E.P., Ravanel, S., Rebeillé, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Adams-Phillips, L.C., Giovannoni, J.J., Gregory, J.F. III. y Hanson, A.D. (2004a). Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 1496-1501.
- Bekaert**, S., Storozhenko, S., Mehrshahi, P., Bennett, M.J., Lambert, W., Gregory III, J.F., Schubert, K., Hugenholtz, J., Van Der, S.D., y Hanson, D.S. 2007. Folate biofortification in food plants. Trends Plant Sci. 13: 28-35.

- Betancourt**, D.M. A., Hernández, P.T.Y., García, S. P A., Cruz, H.A., Paredes, L.O. 2006. Physico-chemical changes in cladodes (nopalitos) from cultivated and wild cacti (*Opuntia* spp.). *Plants Foods Hum. Nutr.* 3: 115-119.
- Birnboim**, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* Academic Press. Inc. pp. 243-255.
- Boppana**, S., Sarkar, F., Liu, L., Li, Y., Khan, A. Kucuk, K., Mahacala, K., y Jaszewiski, R. 2000. Folic acid: Regulation or growth of colon and gastric cancer cell lines. *Gastroenterology.* 114: A567.
- Botto**, L.D., Moore, C.A., Khory, M.J., Erickson, J.D. 2004. Neural tube defects, *N. Engl. J. Med.* 341: 1509- 1519.
- Bravo-Hollis**, H. y Sánchez-Mejorado, H. 1991. Las cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México. pp. 27-31.
- Caudill**, M.A., Gregory, J.F., Hotson, A.D. y Bailey, L.B. 1998. Folate catabolism in pregnant and nonpregnant women with controlled folate intakes. *J. Nutr.* 128: 204-208.
- Centers for Disease Control and Prevention**, 2006. Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 44:1-13.
- Chen**, Z.S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R.B., Kuwano, M., Zeng, H. y Kruh, G.D. 2002. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4); MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Can. J. Res.* 62: 3144-3150.

- Chiu, S.W. y Mason, J.B.** 2000. Folate and carcinogenesis. *J.Nutr.* 120: 129 – 132.
- Cicero, A.F.G., Derosa, G. y Gaddi, A.** 2004. What do herbalists suggest to diabetic patients in order to improve glycemic control? Evaluation of scientific evidence and potential risks. *Acta Diabet* 41: 91-98.
- Cikot, R.J.L.M. y Steegers- Theunissen, R.P.M., Thomas, C.M.G. de Buo, T.M., Merkus, H.M.W.M. y Steegers, E.A.P.** 2001. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br. J. Nutr.* 85: 49-58.
- Cook, R.J.** 2001. Folate metabolism En: Carmel, R., Jacobsen, D., (Eds.). *Homocysteine in health and disease.* New York. Cambridge University Press. pp. 113-134.
- Corrales-García, J.** 2000. Fisiología y tecnología postcosecha del fruto de tuna y del nopal verdura. Reporte de Investigación 54. Universidad Autónoma Chapingo. CIESTAAM. pp. 29-30.
- Cossins, E.A.** 2000. The fascinating world of folate and one carbon metabolism. *Can. J. Bot.* 78: 691-708.
- D'Aniello, G., Florio, P. y Sabatini, J.** 2003. The search for thrombophilic gene mutations in women with gestacional hipertensión does not help in predicting poor pregnancy outcome. *J. Hypertens.* 21: 1915- 1920.
- Díaz, G. R., Gregory III, J,F y Hanson, A.D.** 2006. Folate biofortification of tomato fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 104: 4218-4222.

- El- Khairy**, L., Vollset, S.E., Refsum, H. y Veland, P.M. 2003. Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 467-472.
- Esparza**, F. G., Salas, L. M. A., Mena, C. J. y Valdez, Z.R.D. 2003. Memorias del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del nopal. México. p. 2.
- Felker**, P.C., Soulier, G., Leguizamon y Ochoa, J. 2002. A comparison of the fruit parameters of 12 *Opuntia* clones grown in Argentina and the United States. *J. Arid. Environ.* 52: 361-370.
- Feugang**, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F.C. y Zou, C. 2006. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience.* 11: 2574-2589.
- Flores- Valdez**, C.A. 2001. Producción, industrialización y comercialización de nopalitos. Reporte de investigación 58. Universidad Autónoma Chapingo CIESTAAM. pp. 21- 25.
- Flores-Valdez**, C.A. 2002. El nopal y la lucha contra la desertificación. Reporte de investigación 59. Universidad Autónoma Chapingo. CIESTAAM. pp. 18-19.
- Food and Nutrition Information Center**, 2004. Dietary reference intakes (DIR) and recommended dietary allowances (RDA).
<http://www.nal.usda.gov / fnic/ etext / 000105tml>
- Galati**, E.M., Mondillo, M.R., Giuffrida, D., Dugo, G., Micel, N., Pergolizzi, S. y Taviano, M.F. 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4903-4908.

- Gallegos, C.** y Méndez, S. 2000. La tuna, criterios y técnica para su producción comercial. Universidad Autónoma de Chapingo. Fundación Produce. Zacatecas. México. pp. 7-9.
- García, M.,** Peña-Valdivia, C., Trejo, L., Valle, S., Corrales, J. y Sanchez-Urdaneta, A. 2007. Soil water effect on osmotic potential and cellular membranes of Nopalito (*Opuntia* spp). Rev. Fav Agron. 1: 305-311.
- Giovannuci, E.,** Stampher, M., Colditz, G., Hunter, D., Fuchs, C., Rosner, B., Speizer, F. Y Willet, W. 1998. Multivitaminic use. Folate and colon cancer in women in thje Nurses Health Study. Ann. Inter. Med. 129: 517- 524.
- Goyer,A.,** Illarionova, V., Roje, S., Fischer, M., Bacher, A. y Hanson, A.D. 2004. Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologus expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases. Plant. Physiol. 78:555-560.
- Granados, S.D.** y Castañeda, P.A.D. 2003. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. (Ed.) Trillas. México. pp. 11, 65- 81.
- Gregory, J.F.** 1995. The bioavailability of folate. En: Bailey, L.B. (Ed.). Folate in health and disease. New York: Marcel Dekker. pp. 195-235.
- Grossowicz, N.,** Waxman, S. y Schreiber, C. 1981. Cryoprotected *Lactobacillus casei*: An approach to standarization of microbiological assay in serum. Clin. Chem. 27: 745-747.
- Gurrieri, S.,** Miceli, L., Lanza, M.C. Tomaselli, F. Bonomo, R.P. y Rizzarelli, E. 2000. Chemical chacaterization pf prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectivas for the storage of its juice. J. Agric. Food Chem. 48: 5424-5231.

- Guzmán**, L.D. y **Chávez**, J. 2007. Estudio bromatológico del cladodio de nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. Rev. Soc. Chem. 73: 41-45.
- Guzmán-Maldonado**, S.H. y **Paredes-López**, O. 1999. Biotechnology for the Improvement of Nutritional Quality of Food Crop Plants. Cap. 14 En: Molecular Biotechnology for Plant Food Production. Paredes-López, O. (Ed.). Technomic. United States of America pp. 563-620.
- Habibi**, Y., **Mahrouz**, M. y **Vignon**, M.R. 2002. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Carbohydr Res 337: 1593-1598
- Habibi** , Y., **Mahrouz**, M. y **Vignon** M.R. 2003. Isolation and structure characterization of a (4-O-methyl-D-glucoron)- D-xylan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. J. Carbohydr Chem. 22: 331-337.
- Habibi**, Y., **Mahrouz**, M. y **Vignon**, M.R. 2005. Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperma of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Carbohydr. Polymers. 60: 319-329.
- Hanson**, A.D. y **Roje**, S. 2001. One-carbon metabolism in higher plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 52: 119-137.
- Hanson**, A.D. y **Gregory**, J.F. III. 2002. Synthesis and turnover of folate in plants. Curr. Opin. Plant. Biol. 5: 244-249.
- Healt council of the Netherlands**. 2000. Risk of folic acid fortification, The Hague: Healt council of the Netherlands.

- Henderson**, G.B. 1992. Folate binding proteins. *Annu Rev. Nutr.* 10: 319-335.
- Herbert**, V. 1990. Development of human folate deficiency en folic acid metabolism in health and disease. New York: Wiley-Liss. pp. 195-210.
- Hernández**, Z. J. B. y Serrano, G. G. R. 2003. Uso del nopal en la industria de la construcción. Memoria del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas. México. p. 286.
- Hesse**, H. M. y Hoefgen, R. 2003. Molecular aspects of methionina biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8: 259- 262.
- Hietala**, R., Turpeinen, U. y Laatikainen, T. 2001. Serum homocysteine at 16 weeweeks and subsequent preclampsia. *Obstet. Gynecol.* 97: 527- 529.
- Hogg**, B.B., Tamura, T., Johnston, J.E., DuBard, M.B. y Goldenberg, R.L. 2000. Second-timester plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183: 805- 809.
- Hossain**, T., Rosenberg, I., Selhub, J., Kishore, G., Beachy, R. y Schubert, K. 2004. Enhancement of folates in plants through metabolic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 101: 5158-5163.
- Jabrin**, S., Ravel, S., Gambonnet, B., Douce, R. y Rebeillé, F. 2003. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant. Physiol.* 131: 1431-1439.

- James**, S., Basnakian, A. y Miller, B. 1994. In vitro folate deficiency induces deoxynucleotid pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Can. Res.* 94: 5075- 5080.
- Johnson**, M.A. 2007. If High folic acid aggravates Vitam B12 defecieny what should Be Done About It?. *Nutr. Rev.* 65: 451-458.
- Johnston**, K.E., Lofgren, P.A., y Tamura, T. 2001. Folate concentrations of Fast foods measured by trienzyme extraction method. *Food. Res. In.* 35: 565-569.
- Johnston**, K.E., Dirienzo, D.B. y Tamura, T. 2002. Folate content of Dairy products measured by microbiological assay with trienzyme treatment.
- Karatas**, F., Cansiz, A., Cifci, H. y Sebetci, Z. 2007. Determination of folic acid level in some foodstuffs. *Chem. of Nat. Compos.* 43: 310- 312.
- Kim**, Y., Solomon, R., y Choi, S. 1994. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasms in a dose dependent manner in the dimethylhidrazine rat model. *Gastroenterology.* 106: A402.
- Klaus**, S.M., Wegkamp, A., Sybesma, W., Hugenholtz, J., Gregory, J.F. III. y Hanson, A.D. 2005. A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *J. Biol. Chem.* 280: 5274-5280.
- Lashner**, B. 1993. Red blood cells is associated with development of dysplasia and cancer un ulcerative colitis. *Can. Res. Clin. Oncol.* 91: 549-554.

- Laurenz, J.C., Collier, C.C. y Kuti, J.O.** 2003. Hypoglycemic effect of *Opuntia lindheimeri*. Englem in a diabetic pig model. *Phytotherapy. Res.* 17: 26-29.
- Lee, Y. C., Pyo, Y.H., Ahn, C.K. y Kim, S.H.** 2005. Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island. *J. Food Sci. Nutr.* 10: 103-110.
- Li, G. M., Presnell, S.R., y Gu, L.Y.** 2003. Folate deficiency, mismatch repair-dependent apoptosis, and human disease. *J. Nutr. Biochem.* 14: 568-575.
- López-García, J.J., Fuentes-Rodríguez, J. y Rodríguez, R.A.** 2001. Production and uses of *Opuntia* as forage in Northern México: Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. Mondragón-Jacob, C. y Pérez-González, S. (Eds.). FAO. Plant Production and Protection Paper. 169. Roma. pp. 29-36.
- Lucock, M., Yates, Z., Glanville, T., Leeming, R., Simpson, N. y Daskalakis, I.** 2003. A critical role for B-vitam nutrition in human developmental and evolutionary biology. *Nutr. Res.* 23: 1463-1475.
- Lumley, J. Watson, L., Watson, M., y Bower, C.** 2000. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). Oxford: Update Software.
- Lliades, P., Berglez, J., Meshnick, S. y Macreadre, I.** 2003. Promoter strength of folic acid síntesis genes affects sulfa drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Drug. Res.* 9: 249-255.
- Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G. y Grisel, M.** 2001. Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydr. Polymers* 46: 69-79.

- Meenan, J., O'Hallinan, E., Scott, J., y Weie, D.** 1997. Epithelea cell folate depletion occurrsin neoplastic but not adjacent normal colon mucosa. En: *Gastroenterology*. 112: 1163- 1168.
- Melse-Boonstra, A.** 2003. Dietary folate: Bioavailability studies in humans. Doctorla thesis. Wageningen Centre for Food Science. Wageningen University. pp. 29-38.
- Mercereau, P.** 2004. Spina bifida and anencephaly before and after folia acid mandate-Unites States, 1995,1996 y 1999-2000. *Morbidity and Mortality Weekly. Report*. 53: 362-365.
- Mondragón, J.C y Bordelon, B.B.** 2002. Apomixis in crosses of mexican pear cactus, preliminary molecular identification. *Rev. Fitotec. Mex.*3: 247-257.
- Mouillón, J.M., Ravanel, S., Douce, R. y Rébeille, F.** 2002. Folate synthesis in higher plant mitochondria : coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *Biochem. J.* 363: 313-319.
- Muñoz de Chávez, M., Chávez, A., Valles, V. y Roldán, J.A.** 1995. The nopal: A plant of manifold qualities. *Plant. Food. Hum. Nutr.* 77: 109-134.
- Nefzaoui, A. y Salem, B.H.** 2002. Forage, fodder, and nutrition animal. In: *Cacti. Biology and Uses*. Eds: Nobel, P.S. University of California Press. Berkeley. pp. 199-210.
- Nensy, Y., Arlow, F. y Majumbar, A.** 1995. Aging: increased responsiveness of colorectal mucosa to carcinogen stimulation and protective role of folic acid. En: *Dig. Dis. Sci.* 40: 396- 401.

- Nygaard, O., Refsum, H., Veland, P. Volsett, S.** 1998. Major lifestyle detrminants of plasma total homocysteine distribution. The Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 263- 270.
- Nobel, P.S.** 2001. Ecophysiology of *Opuntia ficus.indica*. En: *Cactus (Opuntia spp.) as forage*. Mondragón-Jacobo, C. y Pérez-González, S. (Eds.). FAO. Plant Production and Protection Paper, 169 Roma. pp. 13-20.
- Nurk, E., Tell, G.S., Refsum, H., Veland, P.M., Vollset, S.E.** 2004. Associatins between material methylenetetrahyrdofolate reductase polymorphism and adverse outomes ofpregnancy. The Hordaland Momocysteine Study. *Am. J. Med.* 117: 26-31.
- Olivares, M.A.B., Ros, B.G., Bernal, C.M.J., Martinez, G.C. y Periago, C.M.J.** 2005. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *Archiv. Lat. Nutr.* 55: 5-14.
- Olney, R.S., y Mulinare, J.** 2002. Trends in neural tube defect prevalence folic acid fortification, and vitamin supplement use. *Semin. Perinatol.* 26: 277- 285.
- Orsomando, G., Díaz de la Garza, R., Green, B.J., Peng, M., Rea, P.A., Ryan, T.J., Gregory, J.F. III. y Hanson, A.D,** 2005. Plant γ -glutamil hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation and co-occurrence in vacuoles. *J. Biol. Chem.* 280:28877-28884.
- Pandrangji, S. y LaBorde, F. L.** 2004. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach. *Int. J. Food Sci. Tech.* 39: 525-532.

- Paredes**, L.O., Guevara, L.F. y Bello, P. L. A. 2006. Los alimentos mágicos de la culturas indígenas mesoamericanas. Edit. Fondo de Cultura Económica. pp. 104-113.
- Phillips**, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M. y Haytowitz, D.B. 2006. Difference in folate contenido of green and red sweet Peppers (*Capsicum annuum*). Determinated by liquid chromatography-MassSpectrometry. J. Agric. Food Chem. 54: 9998-10002
- Pimienta-Barrios**, E. 1990. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara. México. p. 237.
- Pimienta-Barrios**, E. 1993. Vegetable cactus (*Opuntia*). En: Pulses and Vegetables. Williams J.T. (Ed.). Chapman and Hall. Londres. pp. 177-191.
- Pitkin**, R.M. 2007. Folate and neural tube defects. M. J. Clin. Nutr. 85: 285-288
- Powers**, R.W., Majors, A.K., Kerchner, L.J. y Conrad, K.P. 2004. Renal handling of homocysteine during normal pregnancy and preeclampsia. J. Soc. Gynecol. Invest. 58: 10-16.
- Quinlivan**, P.E., McPartlin, J., McNulty, H., Word, M., Strain, J.J., Weir, D.G. y Scott, J.M. 2002. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk vascular disease. Anal. Biochem. 359: 227- 228.
- Quinlivan**, P.E., Basset, G.J., Gregory, J.F. y Hanson, A.D. 2005. Evidence for salvage of the folate catabolites dihydropterin-6-aldehyde and p-aminobenzoylglutamate in plants. Biochem. J. 19:505-507.

- Quinlivan, P.E., Hanson, D.A. y Gregory, F.J.** 2006. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Anal. Biochem.* 348:163-184.
- Ravanel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R. y Rébeillé, F.** 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15360-15365.
- Ravanel, S., Douce, R. y Rébeillé, F.** 2004. The uniqueness of tetrahydrofolate synthesis and one-carbon metabolism in plants. En: Day DA, Millar H, Whelan J (Eds.). *Plant Mitochondria from Genome to Function*. Kluwer Academic, Amsterdam. pp. 277-292.
- Rébeille, F., Ravanel, S., Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S. y Van Der Straeten, D.** 2006. Folate in plants: biosynthesis, distribution and enhancement. *Physiol. Plant.* 126: 330-342.
- Reisenauer, A.M., Krumdieck, C.L. y Halsted, C.H.** 1997. Folate conjugase: two separate activities in human jejunum. *Science.* 98: 196-197.
- Remacle, C., y Reusens, B.** 2004. *Functional foods, ageing and degenerative disease*. CRC, Press. pp. 26-27.
- Richard, D., Leprohon, P., Drummelsmith, J. y Ouellette, M.** 2004. Growth phase regulation of the main folate transporter of *Leishmania infantum* and its role in methotrexate resistance. *J. Biol. Chem.* 279: 54494-54501.

- Sáenz, C.** 2000. Processing technologies: An alternative for cactus pear (*Opuntia spp*) Fruits and cladodes. *J. Arid. Environ.* 46: 209-225.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhira, B.** 2004. *Opuntia spp* mucilage's a functional component with industrial perspectives. *J. Arid. Environ.* 57: 275- 290.
- Sáenz- Hernández, C.J., Corrales-García, J. y Aquino-Pérez, G.** 2002. Nopalitos, mucilage, fiber and cochineal. In: *Cacti. Biology and Uses.* Eds: Nobel, P.S. University of California Press, Berkeley Los Angeles. pp. 211-234.
- Sahr, T., Ravanel, S., Basset, G., Nichols, B.P., Hanson, A.D. y Rébeille, F.** 2006. Folate synthesis in plants : purification, kinetic properties, and inhibition of aminodeoxychorismate synthase. *Biochem. J.* 396: 157-162.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA.
- Scott J, Rebeillé F, Fletcher J,** 2000. Folic acid and folate: the feasibility for nutritional enhancement in. *J. Sci. Food Agric.* 80: 795-797.
- Scott, J.M.** 2007. Reduced folate status is common and increases disease risk. It can be corrected by daily ingestion of supplements or fortification. *Novartis Found Symp.* 282: 105-117.

- Selhub**, J. y Rosenberg, I.H. 1997. Ácido fólico. En: Ziegler, E.E., Fowler, I.J. (Eds.). Conocimientos actuales sobre nutrición, 7a Organización Panamericana de la salud e Instituto Internacional de Ciencias de la vida. Washington, D.C. pp. 218-232.
- Selhub**, J. y Rosenberg, I. 1999. Serum total homocysteine concentrations in the third national Health and Nutrition Examination survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamins status serum concentrations. *Ann. Intern. Med.* 131: 331- 339.
- SEMARNAP**. 1997. Suculentas mexicanas cactáceas. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. p. 87.
- Seshadri**, S., Beiser, A. y Selhub, J. 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 346: 476 – 483.
- Stintzing**, F.C., Schieber, A., y Carle, R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food. Res. Technol.* 212: 396-407.
- Stintzing**, F.C. y Carle, R. 2005. Cactus ítems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. *Mol. Nutr. Food. Res.* 49: 175-194.
- Stintzing**, F.C., Herbach, K.M., Mosshamer, M.R., Carle, R., Yi, W. G., Sellapan, S., Akoh, C.C., Bunch, R. y Felker, P. 2005. Color, betalain paltern, and antioxidante properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 442-451.
- Stover**, P.J. 2004. Physiology of folate and Vitamina B-12 in health and disease. *Nutr. Rev.* 62: 3-12

- Su, L. y Arab, L.** 2001. Nutritional status of folate and colon cancer risk. *Ann. Epidemiol.* 11: 65- 72.
- Suárez, R. M .P.** 2003. Ácido Fólico: Nutriente redescubierto. *Act. Med.* 45: 1-5
- Tamura, T.** 1998. Determination of food folate. *J. Nutr. Biochem.* 9: 285-293.
- Tamura, T. y Picciano, M.F.** 2006. Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 993- 1016.
- Tesoriere, L. Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M. y Livrea, M.A.** 2005. Distribution of betalain in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J. Agric. Food Chem.* 5: 1266-1270.
- USDA** 2004. USDA National Nutrient Database for Standar. Reference. Release 17 [http:// www. nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/)
- Vadachkoria, S., Sánchez, S.E., Qiu, C., Muy-Rivera, M., Malinow, M.R. y Williams, M.A.** 2004. Hyperhomocysteinemia and elevated soluble vascular cell adhesion molecule- I concentrations are associated with increased risk of preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 58: 133- 139.
- Vollset, S.E., Refsum, H. e Irgens, L.M.** 2000. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 962- 968.
- Wallace, R.S., y Gibson, A.C.** 2002. Evolution and systems. En: *Cacti: Biology and Uses.* Eds: Nobel, P.S. University of California Press. Berkeley. Los Angeles- London. pp. 275-290.

Wong, S. 2000. Folate retention during the production of tempeh and soy milk. BSC thesis. Depto of food science and technology. University of New South Wales, Sydney, Australia. p. 125.

Yamada, M. 1979. Folate contents in milk. *Vitamins*. 53: 221-227.

Zeeman, G.G., Alexander, J.M., McIntire, D.D., Devaraj, S. y Leveno, K.J. 2003. Homocysteine plasma concentration levels for the prediction of preeclampsia in women with chronic hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol.*189: 574- 576.

Zhang, S., Hunter, D. y Hankinson, S. 1999. A prospective of folate intake and risk of breast cancer. *J.Am. Med. Assoc.* 281: 1632- 1637.

Zimmerman, J., Gilula, Z., Selhub, J., Rosenberg, I.H. 1989. Kinetic analysis of the effect of luminal pH on transport of folic acid in the small intestine. *Vitam. Nutr. Res.* 59: 151-156.

Zou, D.M., Brewer, M., García, F., Feugang, J.M., Wang, J., Zang, R., Liu, H. 2005. Cactus pear- a Natural Product in Cancer Chemoprevention. *Nutr. J.* 4.