



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Ciencias Biológicas y de la Salud

Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Protocolo de

Proyecto de Investigación para el Servicio Social

**“Optimización del proceso de lisis de la pared y membrana celulares de
Penicillium crustosum para la obtención de la enzima 5 α - reductasa”**

Muñoz Murillo Irving Daniel 2193070676

Asesora: Dra. Marisa Cabeza Salinas

Nº económico: 2683

Firma: _____

Julio de 2024

Introducción:

La enzima 5α -reductasa (SRD5A) es fundamental en el proceso de catabolismo de andrógenos. Cataliza principalmente la reducción irreversible del doble enlace de la posición Δ^4 en los 3-cetosteroides. En humanos, se ha demostrado la existencia de tres isotipos de esta enzima que se conocen como de tipo 1, 2 y 3: Esta enzima se ha asociado con diversas patologías como la hiperplasia prostática benigna, el cáncer de la próstata, la alopecia androgénica, los ovarios poliquísticos y el acné. Debido a que la SRD5A es una enzima localizada en la fracción membranal, su forma activa no ha podido ser cristalizada. Solamente en 2020, Xiao y col. lograron estabilizar y cristalizar la de tipo 2 en presencia del inhibidor finasterida.

Dado que la concentración de esta enzima es baja en los tejidos andrógeno-dependientes, se ha tratado de buscar otra fuente de síntesis más abundante. En este sentido se ha reportado que el hongo filamentoso *Penicillium crustosum* expresa la actividad de esta enzima. Sin embargo, los procesos de obtención de proteínas intracelulares en hongos son complejos, debido a diversos factores, entre los que se encuentran la estructura y resistencia de su pared celular. Por esta razón, los métodos de lisis son esenciales para la extracción de proteínas. La homogenización, es un método mecánico con alta tasa de rendimiento y fácilmente escalable, en el que mejorar las condiciones de homogenización con el uso de tampones, maximiza la cantidad de proteínas que se puede extraer, además de aumentar la calidad de éstas y salvaguardar su estructura. En este proyecto se busca desarrollar un método de lisis celular evaluando diferentes técnicas mecánicas de homogenización asistidas con un tampón que contenga lubrol como detergente, además de realizar cultivos con diferentes tratamientos de andrógenos con el fin de inducir la producción de la enzima SRD5A. Con estas pruebas, se busca estandarizar el proceso y generar un protocolo para el método a mayor escala.

Planteamiento del problema y justificación:

La enzima SRD5A es clave en el metabolismo de andrógenos, cataliza la conversión de testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT) molécula más activa y relevante en procesos biológicos como la maduración de caracteres sexuales externos en la etapa prenatal (Barbonetti *et al.*, 2020). Diversas patologías están relacionadas con su expresión anormal,

en el feto la concentración baja de DHT conduce a un desarrollo deficiente de los genitales externos (Kumar & Barboza-Meca, 2022); En hombres de edad adulta se relaciona con la hiperplasia prostática benigna, que tiene una prevalencia de más de 210 millones de hombres a nivel mundial (Lokeshwar *et al.*, 2019). Desarrollar inhibidores para esta enzima ha sido un reto para los investigadores en el mundo debido a que la estructura cristalina de todos los isotipos no ha sido descrita.

En eucariotas la enzima SRD5A se expresa como una proteína de membrana, factor que ha sido limitante para conocer su estructura y mecanismos moleculares exactos. Actualmente solo se ha descrito la estructura cristalina del isotipo 2 unida al fármaco finasterida (Xiao *et al.*, 2020).

Penicillium es un género de hongos ascomicetos ampliamente utilizados para procesos biotecnológicos (Mehmannavaz & Nickavar, 2022). Aunque la extracción de proteínas de alto peso molecular a partir de hongos filamentosos resulta complicada debido a factores como la presencia de pared celular rígida de quitina o la concentración de proteasas endógenas, los métodos de disrupción y condiciones de lisis adecuadas favorecen la concentración de proteína obtenida (Krishnaswamy *et al.*, 2018).

Penicillium crustosum expresa a la enzima SRD5A (Cabeza *et al.*, 2001) por lo que se busca desarrollar y optimizar un método de extracción de esta enzima, como primer paso para una consecuente cristalización que sería de utilidad en la investigación de su estructura además de abrir nuevas vías en aplicaciones biotecnológicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con su disfunción.

Objetivo general:

Optimizar el proceso de lisis celular para la extracción de la enzima 5 α -reductasa a partir de la especie *Penicillium crustosum*.

Objetivos específicos:

1. Optimizar las condiciones de cultivo de *Penicillium crustosum* para la expresión de proteínas.
2. Comparar y determinar el método mecánico o las combinaciones que lleven a cabo el proceso de ruptura de la pared celular de *P. Crustosum*, utilizando como parámetro la concentración de proteínas extraídas cuantificadas por el método de Bradford.
3. Determinar la combinación de disruptores químicos que provocan la ruptura de la membrana celular de *P. crustosum*.
4. Inducir la actividad anabólica de *P. crustosum* y la producción de la enzima 5 α -reductasa realizando cultivos con diferentes tratamientos de andrógenos.
5. Identificar la presencia de la enzima 5 α -reductasa en el extracto de proteínas obtenido por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Antecedentes:

Enzimas:

Las enzimas son catalizadores biológicos de reacciones químicas (Bourlieu *et al.*, 2020). Están constituidas de unidades básicas de aminoácidos en un arreglo tridimensional complejo que genera surcos con secuencias específicas, denominados sitios activos, donde ocurre la reacción (Kennelly *et al.*, 2022). El modelo de ajuste inducido es el más aceptado actualmente para describir su funcionamiento. Una enzima puede actuar sobre un grupo pequeño de sustratos con características químicas similares (Díaz *et al.*, 2019).

5 α -reductasa

La SRD5A es una enzima involucrada en el metabolismo de andrógenos, cataliza la reacción de conversión de la testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT) (Chislett *et al.*, 2023). Los andrógenos tienen un papel importante en el desarrollo del individuo; están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos, la espermatogénesis, el aumento de la síntesis de proteínas y además previenen su degradación (Barrett *et al.*, 2020). La T se libera de los testículos a la sangre y su producción está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículos. (Barrett *et al.*, 2020). La T y DHT se unen al mismo receptor de andrógenos (AR). Sin embargo, el complejo DHT-AR es más estable que el formado por T-AR y presenta una afinidad mayor a los complejos de transcripción de ADN. La transformación de T a DHT es una amplificación de señales en tejidos específicos en donde la SRD5A se expresa en altas concentraciones (Nassar & Leslie, 2023).

Las SRD5As son oxidorreductasas dependientes de NADPH. Esta coenzima dona el grupo H para reducir la doble ligadura del anillo A del esqueleto de la testosterona. Existen tres isotipos diferentes de la 5 α -reductasa (SRD5A1-3). SRD5A1 y 2 participan en la conversión de T a DHT (Xiao *et al.*, 2020) (Escamilla-Cruz *et al.*, 2023). Mientras que el isotipo 3 se relaciona con la glicosilación de N-proteínas, (Kentache *et al.*, 2024).

La SRD5A1 se encuentra en las células de la piel de todo el cuerpo y es el isotipo dominante en el cuero cabelludo. SRD5A2 está presente en la piel de los genitales, en el estroma de la

próstata y el hígado (Chislett *et al.*, 2023). Los tres isotipos de 5 α -reductasa en células se encuentran en la membrana del retículo endoplasmático (Han *et al.*, 2021).

La estructura de la SRD5A ha sido estudiada con diferentes estrategias. Han *et al.* (2021) utilizaron el homólogo PbSRD5A expresado en *P. bacterium* y lo adecuaron al modelo homólogo HsSRD5A2, mientras Xiao *et al.* (2020) expresaron la SRD5A2 humana en presencia de finasterida en células Sf9 de insecto. La estructura tridimensional de la SRD5A evidenciada por ambos grupos, mostró 7 fragmentos transmembranales con los extremos N en el lado periplásmico de la membrana plasmática y los extremos C en el lado citosólico (figura 1).

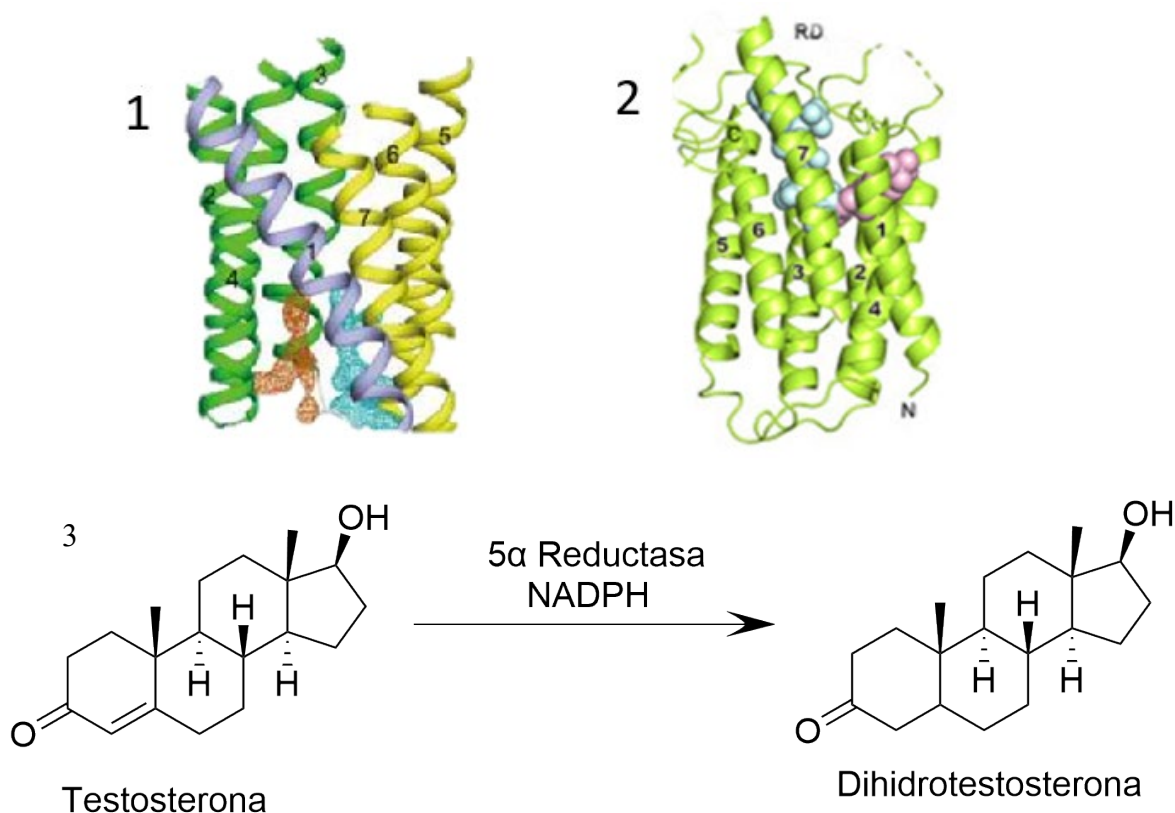


Figura 1: 1 Estructura de SRD5A2 (Xiao *et al.* 2020) y 2 HRD5A (Han *et al.* 2021) 3: reacción de T a DHT

Patologías relacionadas:

La deficiencia de la SRD5A2 es un trastorno ocasionado por una mutación en el gen SRD5A2 en el brazo corto del cromosoma 2. Los niños con esta deficiencia tendrán una producción reducida de DHT durante el desarrollo fetal, lo que conduce a un desarrollo genital externo defectuoso (Kumar & Barboza-Meca, 2022; Aaron *et al.*, 2016).

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una enfermedad con una alta tasa de prevalencia en hombres mayores de 50 años. Es un crecimiento excesivo no maligno del tejido prostático (Launer *et al.*, 2020). La DHT se une a los receptores androgénicos en el interior de las células de la próstata aumentando la transcripción de proteínas ocasionando el aumento en la proliferación celular (Joseph *et al.*, 2022). Los fármacos inhibidores de la SRD5A han sido utilizados eficientemente para aliviar esta condición; los dos únicos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) son la finasterida que se une con alta afinidad a la SRD5A2 y dutasterida que se une indistintamente a los isotipos SRD5A1 y 2.

Penicillium crustosum.

Esta especie, pertenece al grupo de hongos filamentosos; habitualmente se encuentra en los productos lácteos como el queso, en gran variedad de cereales, nueces, tortilla mexicana, en frutos como la nectarina y los cítricos. Este hongo es el causante de la enfermedad del moho azul de las frutas (Duduk *et al.*, 2021).

P. crustosum tiene la capacidad de catalizar la conversión de T a DHT por la presencia de la enzima SRD5A (Cabeza *et al.*, 2001).

Características morfológicas de *Penicillium crustosum*: Pitt y Hocking (2009) describen las colonias en medio Czapek de 30 a 40 mm de diámetro planas o un con un surco pequeño radialmente, con textura aterciopelada y granular; la superficie de aspecto polvoriento, micelio de color blanco con producción de conidios alta, con color verde opaco, ligeramente más gris en ocasiones.

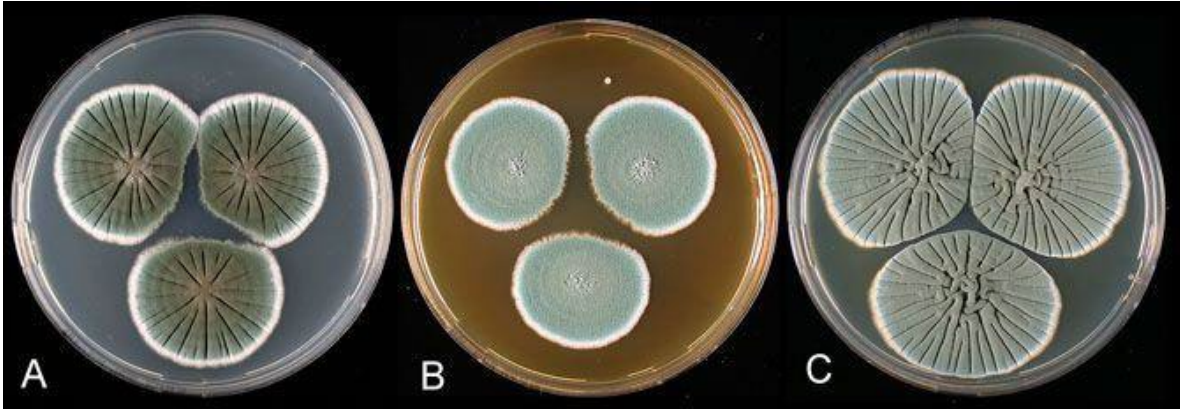


Figura 2. *P. crustosum* cultivado en medio Czapek A. B en medio con extracto de malta C en medio de cultivo con extracto de levadura (Pitt y Hocking., 2009).

En el medio Czapek presentan, como características distintivas, márgenes azules verdosos. Cuando maduran, los conidios son de tonos más cercanos a verde grisáceo (Fig. 2 A).

Cuando se cultivan en medio con extracto de malta (Fig. 2 B), la producción de conidios es alta después de 7 a 10 días; cuando se agita la caja Petri donde están cultivados, se desprenden fácilmente estos conidios. Las condiciones óptimas de crecimiento son a temperaturas cerca de los 25 °C y pH en un rango de 4.5 hasta 9.

Métodos de disrupción celular

La biotransformación microbiana ha sido utilizada ampliamente en diferentes industrias como la farmacéutica o la alimentaria. Muchos productos comerciales como hormonas, o enzimas son ejemplos de esto (Katsimpouras & Stephanopoulos, 2021; Newman & Cragg, 2020). Los metabolitos que se originan en los procesos extracelulares son los preferidos ya que los pasos consecuentes como la purificación, son más sencillos y con costos relativamente bajos. Los procesos que involucran moléculas intracelulares ya sea libres en el citoplasma o embebidas en la pared celular o en algún otro organelo, son más complicados de realizar (Krishnaswamy *et al.*, 2018). La disrupción celular es un paso crucial en estos últimos procesos. Existen diferentes métodos de lisis celular; la elección del más acertado va a depender de la estructura de la pared celular de cada organismo, así como de la ubicación del metabolito (Gomes *et al.*, 2020).

Los métodos de disrupción celular se pueden clasificar como: métodos mecánicos y no mecánicos:

Métodos no mecánicos: Suelen ser suaves con las células; se basan en principios químicos, físicos o enzimáticos. Estos métodos no mecánicos, son más específicos y selectos, comparados con los mecánicos (Gomes *et al.*, 2020). Actúan permeabilizando las membranas celulares permitiendo el paso de metabolitos de bajo peso molecular. Estos procesos requieren de baja energía como la desecación, el choque osmótico, y los cambios bruscos de temperatura (congelación- descongelación) entre otros (O' Brien *et al.*, 2022).

Métodos mecánicos: Los métodos mecánicos están enfocados en la destrucción de la pared y de los componentes que le otorgan resistencia. Son más indiscriminados que los no mecánicos, pero eficientes para extraer metabolitos de alto peso molecular. Debido a su fácil escalamiento, suelen ser más utilizados en la industria; sin embargo, tienen como desventajas la liberación total del contenido citoplasmático y la formación de residuos celulares inconvenientes para los procesos de purificación. Entre los métodos mecánicos están la homogeneización a alta presión o ultrasonificación (Saini *et al.*, 2021).

La ruptura de la pared celular difiere en organismos procariotas o eucariotas. La extracción de proteínas fúngicas intracelulares no es fácil.

La estructura de la pared celular de los hongos consiste en diferentes concentraciones de manoproteínas, β 1,6-glucanos, β 1,3-glucanos y como componente principal la quitina. La quitina es difícil de lisar debido a sus propiedades fisicoquímicas, está conformada por monómeros de N-acetil glucosaminada (figura 3) unidos por enlaces β -1,4 de igual manera que la celulosa, sin embargo, en lugar de presentar un grupo hidroxilo como los monómeros en la celulosa tiene grupos acetilamina que le dan la capacidad de generar mayor cantidad de puentes de hidrógeno con monómeros subyacentes otorgándole mayor resistencia (Pandey *et al.*, 2019).

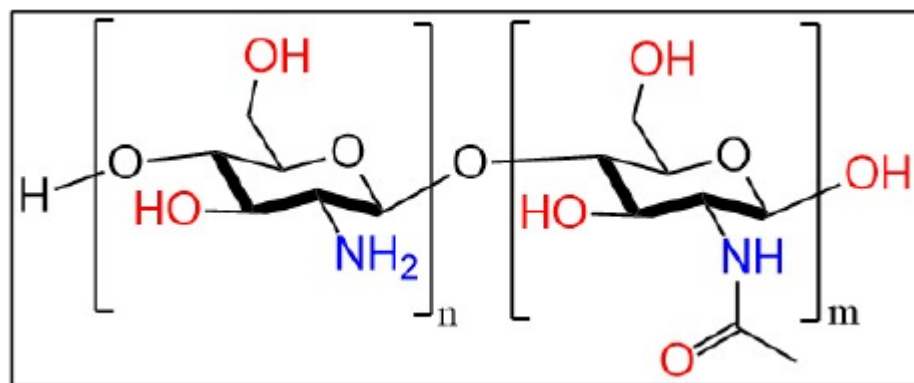


Figura 3: Estructura de la quitina (Pandey *et al.*, 2019).

Para la ruptura de la pared celular y la obtención de proteínas intracelulares en hongos filamentosos y/o levaduras se han utilizado una gran cantidad de métodos. La molienda en nitrógeno líquido ha sido utilizada ampliamente. Sin embargo, tiene sus deficiencias cuando la concentración de proteína es baja (Lakshman *et al.*, 2008).

El método de homogeneización también es, de los más utilizados. Este método se basa en la aplicación de fuerzas de alta presión que provocan el colapso de las paredes celulares. Para su procedimiento se utiliza un equipo de presurización de alta presión en donde la suspensión celular se presuriza y después es forzada a pasar a través de una abertura pequeña donde se libera la presión rápidamente generando impacto y esfuerzo de corte que ocasionan la disrupción de las células (Mayta-Hancco *et al.*, 2020). Tiene como ventaja un escalado sencillo. Sin embargo, durante este proceso se genera calor, lo que puede desnaturar a las proteínas lábiles (Gomes *et al.*, 2020).

En los métodos de homogenización, las condiciones de lisis son un factor para considerar, ya que con las condiciones adecuadas se obtienen concentraciones mayores de proteínas y de mayor calidad (Krishnaswamy *et al.*, 2018). Además de ayudar a la lisis celular, los tampones estabilizan, previenen y minimizan la desnaturación de las proteínas.

Materiales y métodos:

El proyecto se realizó en el laboratorio de Hormonas G-006 ubicado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX).

1. Inoculación de *Penicillium crustosum*

1.1. Cultivo de *P. Crustosum* en medio papa dextrosa

1.1.1 Cultivo en agar

Los cultivos de *P. crustosum* se realizaron a partir de dos cepas donadas por la Dra. María Cristina Julia Pérez Reyes de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Estas cepas se obtuvieron a partir de dos fuentes orgánicas diferentes: maíz y cítricos.

El agar se prepara siguiendo las indicaciones del reactivo comercial, pesando la cantidad necesaria, diluyendo en 100 mL de agua destilada y esterilizando el medio, durante 15 minutos en autoclave. Posteriormente se vierte la cantidad necesaria en una caja estéril de Petri y se espera a que solidifique. Cuando el medio ya es sólido se inocula el germen, utilizando un asa bacteriológica, incluyendo una muestra del cultivo stock en la placa de agar. Con el asa de muestra, se realiza un estriado en la superficie de la caja Petri. Todo este procedimiento se realiza en una campana de flujo laminar. El cultivo se mantiene por 9 días en incubación a temperatura ambiente con ausencia de luz y se revisa periódicamente el crecimiento.

1.1.2 **Conteo de esporas**

Se toma una muestra de *P. Crustosum* de la caja Petri y se agrega a una solución estéril de sacarosa al 60%, se agita suavemente y se deja reposar por 15 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga a 3200 RPM durante tres minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con agua destilada. Este procedimiento se realiza tres veces más. El último lavado se realiza con una solución estéril de Tween 80 al 0.1% con el objetivo de obtener una suspensión de esporas homogénea. El Tween 80 rompe la tensión superficial de las esporas, separándolas individualmente permitiendo un conteo más preciso (Lemus *et al.*, 2008). El último paso es centrifugar y retirar nuevamente el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1 mL de agua destilada.

El conteo de esporas se realiza en una cámara de Neubauer, tomando 10 μ L de muestra del sobrenadante obtenido como se indicó en el párrafo anterior. Como criterios para el conteo se tomaron en cuenta los recuadros grandes extremos de la cámara, contando las esporas que tocan los límites derechos y superiores de los mismos. El conteo se realiza por duplicado y se calcula la cantidad de esporas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{número de esporas} = \frac{\text{Número de esporas contadas} \times 20 \text{ (factor de dilución)}}{\text{volumen (0.4 mL}^3\text{)}}$$

1.2. Cultivo de esporas de *P. crustosum* en medio papa dextrosa

1.2.1 Preparación del medio de cultivo de papa/dextrosa

Para preparar un litro de medio de papa/dextrosa, se pesaron y cortaron 600 g de papa y se introdujeron en un litro de agua destilada. Se dejó hervir la mezcla por 20 minutos, se filtró y al filtrado se le agregaron 20 g de sacarosa. Posteriormente esta solución se completó con agua CBP un litro y se ajustó el pH a 8 con NaOH 1 M. La mezcla se esterilizó utilizando calor húmedo.

1.2.2 Desarrollo de cultivos

Se hicieron cultivos preliminares de *P. crustosum* en la misma forma descrita arriba, pero sin agregar andrógenos al medio, con la finalidad de probar los métodos de disrupción mecánica. Para esto se inocularon 3,000,000 de esporas en 10 mL de medio de cultivo de papa/dextrosa. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles, en la campana de flujo laminar. La incubación se mantuvo a temperatura ambiente con ausencia de luz durante 5 días.

1.3. Incubación de esporas de *P. crustosum* en presencia de diferentes esteroides

Se inocularon 300,000 esporas en matraces conteniendo un mL de medio de papa/dextrosa. Después de 24 horas, se agregaron a cada matraz, los tratamientos indicados en la Tabla 1. Los matraces se incubaron en ausencia de luz y a temperatura ambiente durante 5 días. El procedimiento se realizó por triplicado.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los cultivos conteniendo 300,000 esporas de *P. Crustosum*

Tratamiento	Incubación 24 horas	Esteroides [nM]	DMSO 0.5%	Evaporar en CFL	NADPH [mM]	DTT [mM]	Volumen de Medio papa dextrosa (mL)
Control 1		-	-		0.5	1	3
Control 2		-	0.5		0.5	1	3
Testosterona		142.9	0.5		0.5	1	3
Dutasterida		142.9	0.5		0.5	1	3
Androstenediona		142.9	0.5		0.5	1	3

* CFL: campana de flujo laminar.

Disrupción de la pared celular

Al final de la incubación, los micelios en etapa madura se separaron del medio de cultivo y se secaron en papel absorbente por 20 minutos. Se pesaron en la balanza analítica y se sometieron a disrupción celular, siguiendo las metodologías propuestas por Krishnaswamy *et al.* (2018) y Bridge *et al.* (2004) con ligeras modificaciones.

Brevemente, los micelios se sometieron a diferentes métodos de homogeneización en presencia de una solución de tampón de lisis celular cuya composición se describe en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición de la solución tampón de lisis.

Para 100 mL	Concentracion
Tris	0.25 mM
Glicina	1.92 mM
Lubrol	0.4%
MgCl ₂	20 mM
PMSF	1 mM
DDT	1 mM

Tris: trishidroximetilaminometano,
PMSF: fluoruro de fenilmetanosulfonilo
DDT: ditiotreitolo

Métodos de Homogeneización

1.1.3 Homogeneización manual

El micelio se homogeneizó utilizando un aparato Potter- Elvehem en presencia de 2 mL del tampón descrito en la Tabla 2 por 60 segundos 3X. Las muestras se mantuvieron en un baño de hielo para evitar la acción de las proteasas. Con la finalidad de producir un rompimiento de la membrana del micelio, el homogeneizado se dejó en el baño de hielo por 60 minutos.

1.1.4 Homogeneización manual con ciclos térmicos

La masa del micelio se congeló a -72 °C durante 24 h y se descongeló lentamente. A las 24 horas, se repitió la misma operación por 24 horas más para terminar un ciclo. Se repitieron cuatro ciclos de esta manera para más tarde homogeneizar, utilizando el homogeneizador Potter Elvehem como se describió en el párrafo anterior y en presencia de tampón de lisis. Las muestras se mantuvieron en agitación suave y constante durante una hora.

1.1.5 Homogeneización con ultra sonicación

La masa del micelio se suspendió en buffer de lisis frío. Se utilizó un Ultrasonicador (Sonic VCX-750) para homogeneizar la mezcla, con los siguientes parámetros eléctricos: 40 kHz de frecuencia con ciclos de 10 segundos y 20 segundos de descanso con una amplitud de la λ del 60% y un tiempo total de 5 minutos.

1.1.6 Homogeneización con Ultraturrax.

La masa del micelio se congeló a -72 °C por 24 horas para endurecerlo. El congelado se maceró en un mortero para posteriormente volver a congelar el polvo de micelio seco. Pasadas 24 h, se agregó 1 mL de tampón de lisis y se homogeneizó utilizando el Ultraturrax (BIOSPEC modelo: 985-370), durante tres ciclos de 1 minuto cada uno con descanso de 5 minutos entre cada ciclo. Por último, las muestras se mantuvieron a una temperatura y agitación constante por una hora.

1.1.7 Homogenización con Ultraturrax en presencia de glicerol.

Con la finalidad de mantener el nivel de proteína en la muestra se agregó glicerol al 10% en el tampón de lisis. El glicerol actúa como crioprotector, protegiendo a las células de daño por la formación de cristales de hielo, en el momento de la congelación (Solomon *et al.*, 2015). La homogeneización en presencia de este tampón se realizó utilizando el mismo procedimiento que se describió en el párrafo anterior.

2.1. Separación y cuantificación de proteínas

Con la finalidad de obtener la fracción membranal del micelio, la mezcla obtenida después de la homogeneización se centrifugó a 3200 rpm durante una hora. El sobrenadante se separó del pellet y éste se resuspendió en un mL del tampón de lisis y ambas fracciones se mantuvieron a -72°C hasta su uso.

Se cuantificó la concentración de proteínas presentes en las fracciones obtenidas (pellet y sobrenadante) utilizando el método espectrofotométrico descrito por Bradford (Costa, 2023).

Identificación de la enzima SRD5A1 por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

2.1. Preparación de la muestra para electroforesis

Se tomaron 600 μL de proteína de la fracción del pellet solubilizado que se diluyeron con la misma cantidad de tampón A (Tabla 4) después se llevaron a ebullición hasta obtener un volumen de 15 μL de volumen total aproximadamente.

Tabla 3: Composición del tampón A

Reactivo	Volumen (mL)
H ₂ O	3.8
0.5 M de Tris- HCl pH=6.8	1
Glicerol	0.8
SDS al 10%	1.6
2- mercaptoetanol	0.4
Azul de bromofenol	0.4

2.2. Preparación del gel de electroforesis

El gel de electroforesis se preparó a una concentración de 20% como se indica en la Tabla 5

Tabla 4: Componentes de los geles concentradores de muestra y de elución

Gel de elución al 20%		Gel concentrador al 4%	
H ₂ O	1 mL	H ₂ O	3 mL
Acrilamida al 30%	3.35 mL	Acrilamida al 30%	0.65 mL
1.5 M de Tris HCl pH 8.8	1.25 mL	0.5 M de Tris HCl pH 6.8	1.25 mL
SDS al 10%	50 µL	SDS al 10%	50 µL
APS al 10%	50 µL	APS al 10%	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL

SDS= duodecilsulfato de sodio, TEMED= tetrametiletilenodiamina, APS= persulfato de amonio

2.3. Electroforesis

Para desarrollar la electroforesis dentro de la cámara, se utilizó un tampón que se preparó como indica la Tabla 6. Se empleó, además, un marcador de peso molecular (Bio- Helix®, distribuido por CRISOL, CDMX) en el primer carril del gel de electroforesis. En el segundo carril, un control que consistió en 20 µg de proteína de la fracción membranal de próstata de hámster. En los carriles subsiguientes, se colocaron las muestras experimentales y la electroforesis se desarrolló por 18 horas en las siguientes condiciones eléctricas: 60 V, 15 mA y 4 W.

Pasado el tiempo el gel se reveló con una solución de azul de Comassie R-250 (BioRad, distribuido por El Crisol, CDMX) con agitación suave a temperatura ambiente por tres horas. El gel se destiñó después con una solución decolorante (Agua, Metanol y Ácido acético= 50:40:10), hasta eliminar el excedente de color y luego se transfirió a agua destilada. La SRD5A1 se identificó por su peso molecular (26 y 27 kD) comparado con los estándares.

Tabla 5: *composición del tampón de corrida*

Tampón de corrida pH 8.3	
Tris base	30.3 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
2- mercaptoetanol	0.4 mL
Agua desionizada	CBP 1000 mL

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando en Paquete Estadístico JMP Pro. Se empleó la prueba unidireccional de ANOVA, con el cálculo de la desviación estándar. Además, se contrastaron los valores de la media con la prueba post-hoc de Dunnett y se consideraron como estadísticamente significativos los valores de $P < 0.05$.

Se utilizó el Paquete de Excel para construir los gráficos que se presentan en las Figuras.

Resultados y Discusión

1. Cultivos

El crecimiento del hongo filamentososo, *Penicillium crustosum* de dos fuentes de origen diferente se muestra en las fotografías de la Figura 4.

El hongo que creció más rápidamente fue el proveniente del maíz, mientras que el proveniente de los cítricos mostró una apariencia más aterciopelada. Dados estos resultados se encogió el micelio procedente del maíz.

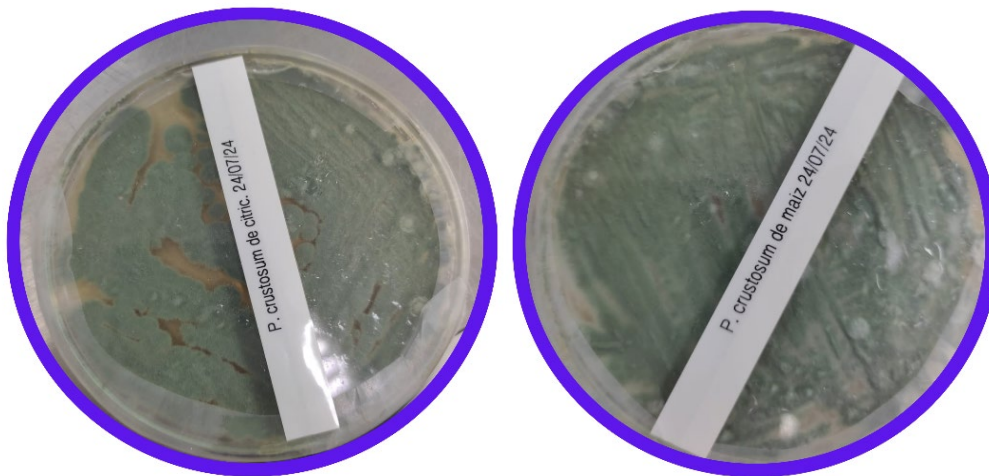


Figura 4: *P. crustosum* procedentes de maíz y de cítricos, cultivados en placas de papa/dextrosa/agar.

Después de 9 días de cultivo en la placa de papa/dextrosa/agar, el número de esporas cuantificadas por el método descrito en el capítulo de Métodos fue en promedio de 2,700,000 esporas/mL. La Figura 5 muestra la cámara de Neubauer con las esporas.

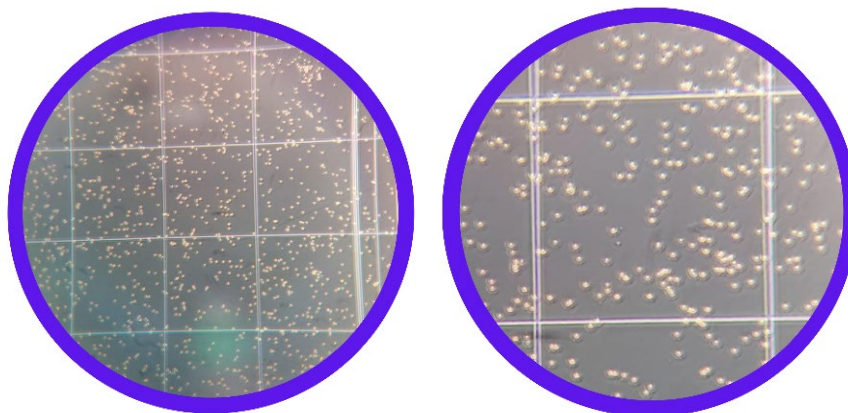


Figura 5: esporas de *P. Crustosum* visto en el microscopio en la cámara de Neubauer, 1: aumento 10x y 2: aumento 40x

Estos resultados indican que en 9 días se obtienen suficientes esporas para continuar los experimentos, manteniendo el número de esporas constante.

2. Métodos mecánicos de lisis de micelio de *P. crustosum*

El peso promedio (n=3) de los micelios obtenidos después de 5 días de cultivo en caldo de papa/dextrosa antes de la lisis celular fue de 1.88 ± 0.13 g. La variación mínima en la muestra (tamaño de la DE) reafirma que creció el mismo número de esporas en cada matraz, lo que es un indicador de buena técnica de análisis.

Controlar la cantidad de esporas inoculadas en cada matraz garantiza el crecimiento homogéneo de todos los micelios por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los pesos de los diferentes cultivos que se realizaron (Sardella *et al.*, 2018).

La concentración de proteínas tanto en el micelio como en el sobrenadante, obtenida por los diferentes métodos de lisis se muestran en la Figura 6.

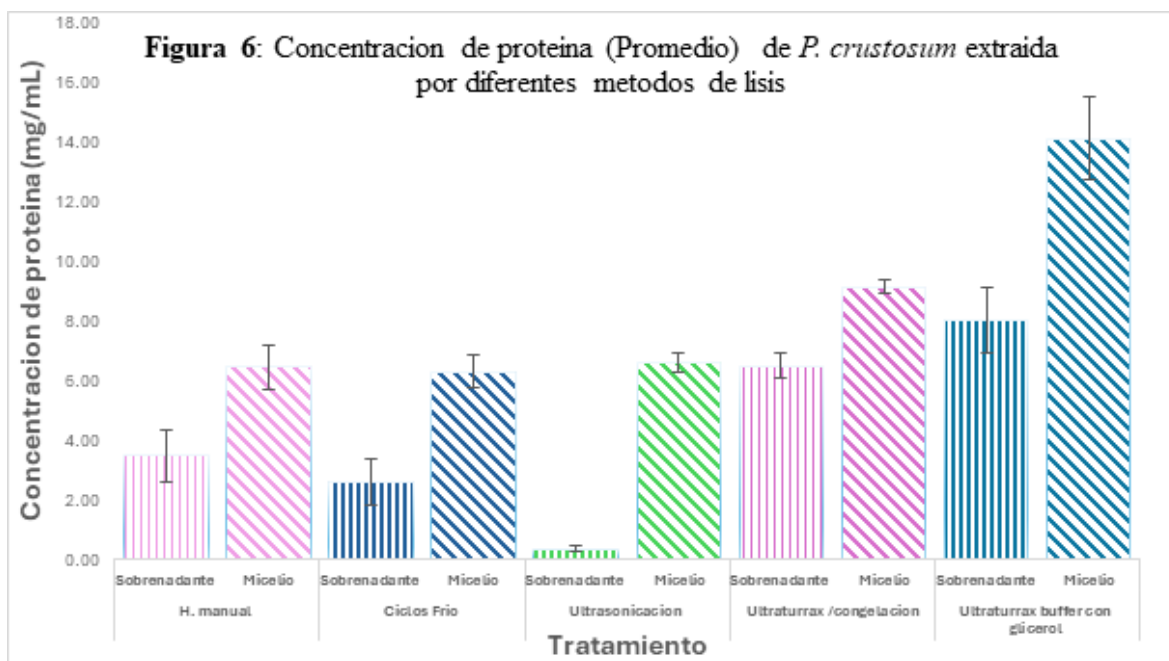


Figura 6. concentración de proteína obtenida por los diferentes métodos mecánicos de lisis

El método de lisis consistente en congelación/ lisis mecánica (Ultraturrax), resultó ser el método que proporcionó una mayor concentración de proteína/mg de micelio tanto en el sobrenadante como en el pellet, ver Figura 7.

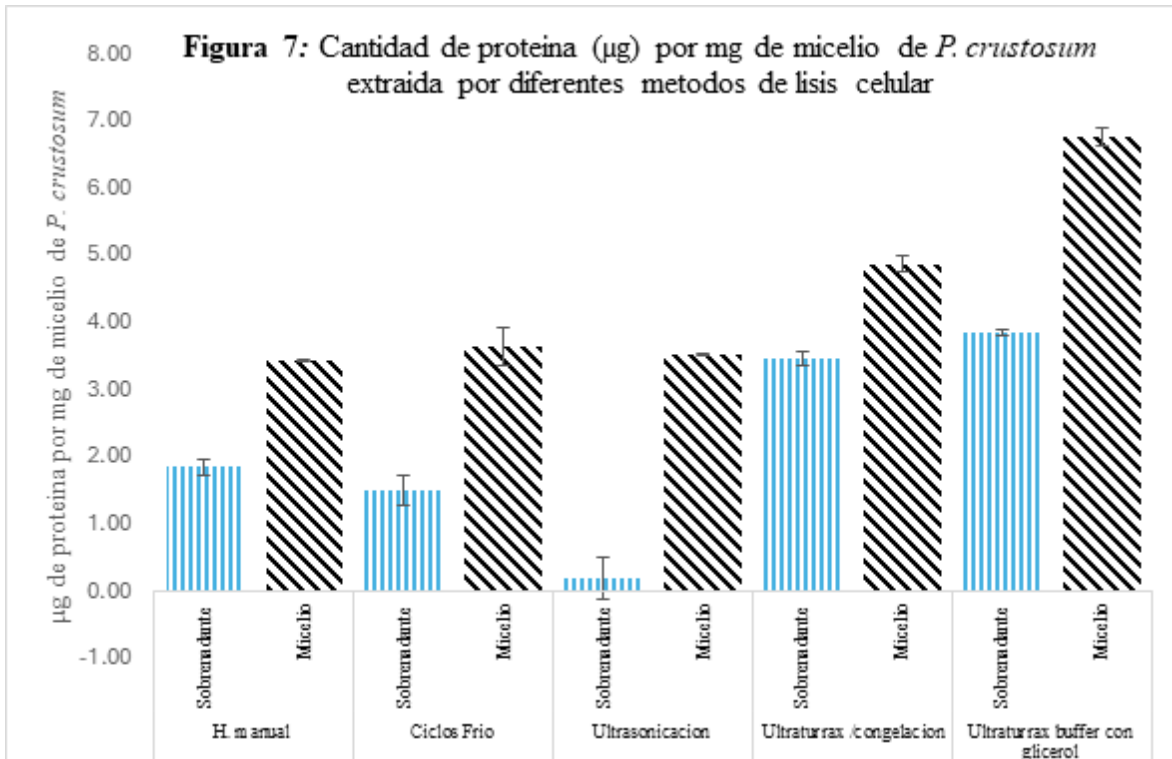


Figura 7. Concentración de proteína por mg de micelio obtenida por diferentes métodos de lisis mecánicos

La lisis de hongos filamentosos es un desafío por muchos factores entre los cuales está la resistencia estructural de su pared celular (Krishnaswamy *et al.*, 2018). El Ultraturrax rompe el tejido fúngico aplicando la fuerza de cizalla, fuerza mecánica que debilita y condiciona la integridad de la pared celular (Karpínski *et al.*, 2022). El método ha sido ampliamente utilizado por diversos autores como Islam *et al.* (2017) quien además combina el homogeneizador de tejido con detergentes como CHAPS para la disrupción de células animales, permitiendo la obtención de proteínas tanto citoplasmáticas como de membrana. Otros métodos más convencionales para la lisis de levaduras y hongos filamentosos son el homogeneizador de alta presión y el molino de bolas en presencia de proteasas (Pérez De Mora *et al.* 2012). Por este método se obtienen enzimas fúngicas con actividad biológica. Sin embargo, es poco efectivo en presencia de micelios de bajo peso y por el riesgo de lisis celular, por lo que no se utilizó en este experimento.

El proceso de extracción comienza con la obtención de polvo seco de micelio, a través de la maceración manual de la biomasa congelada en el mortero (Pang & Barrientos, 2023). Esta etapa tiene como objetivo debilitar la pared celular, facilitando el posterior paso de lisis. La

congelación no tiene un efecto significativo en la actividad enzimática y el glicerol presente en el tampón de lisis contribuye a preservar la conformación estructural de las proteínas (Pérez De Mora *et al.*, 2012). Esta estrategia que combina congelación con un buffer que contiene glicerol, demostró ser en este experimento, una alternativa eficaz, ya que permitió obtener una cantidad significativa de proteínas comparado con otras metodologías publicadas anteriormente. La maceración con nitrógeno líquido y la liofilización (Krishnaswamy *et al.* 2018) también permite la obtención de polvo de micelio seco para más tarde solubilizar la pared y obtener enzimas funcionales (Bhadauria and Peng, 2010). Sin embargo, estos métodos requieren de mucha masa de micelio para ser ventajosas por su alto costo. En contraste, el uso de la congelación más la homogenización con método mecánico y el tampón de lisis conteniendo lubrol como detergente, resulta económica, accesible y eficaz, especialmente en muestras pequeñas, menores a un gramo, como lo muestra la Figura 8. En esta figura se observa que cuando se agrega glicerol se obtiene una mayor cantidad de proteína a partir del micelio de *P. crustosum*.

El método de ciclos de congelación / descongelación fue menos eficiente para la obtención de proteínas (Figuras 6 y 7) que el de congelación en presencia de glicerol y homogeneización con Ultraturax. Aunque diversos autores han reportado que los ciclos térmicos pueden debilitar la estructura celular de los micelios (Lippi *et al.*, 2011), debido a la formación de cristales de hielo que se intercalan entre la membrana y la pared celular, durante la congelación, en el laboratorio, no se logró obtener una cantidad considerable de proteínas por este método (Figura 7). Su baja eficiencia, podría atribuirse a que los ciclos son altamente agresivos con la conformación tridimensional de las proteínas, lo que podría causar su desnaturalización (Harju *et al.*, 2004). Aunque en este protocolo no se evaluó directamente la actividad enzimática, salvaguardar la funcionalidad biológica de las enzimas es un objetivo clave en este experimento. De hecho, autores como Danaeifar *et al.* (2022) destacan que incluso con el uso de criopreservadores la congelación/descongelación, no es el método preferido para la extracción de enzimas funcionales.

En comparación con los otros métodos, la Ultrasonicación fue el menos eficiente para la extracción de proteínas (figura 6 y 7). Este resultado difiere del obtenido por Wang *et al.* (2015) en levaduras, ya que, en este hongo unicelular, la técnica resulta muy eficiente. Es importante señalar que la Ultrasonicación se utiliza comúnmente en ensayos donde no se

busca salvaguardar la configuración de las proteínas, como en la extracción de material genético o en la obtención de proteínas desnaturalizadas con fines de análisis proteómicos (Danaeifar, 2022). Por esta razón, los ensayos pueden realizarse en condiciones más agresivas (Joshi & Jain, 2017).

Disrupción celular de *P. Crustosum* por el método de homogenización en Ultraturrax con diferentes tratamientos de hormonas.

Después de seleccionar el método óptimo de lisis, en este experimento se sembraron las esporas de *P. crustosum* con la finalidad de evaluar el efecto de diferentes tratamientos hormonales en la actividad metabólica. Los cultivos se mantuvieron a un pH de 8 para lograr la mayor expresión de la enzima SRD5A1 (Han *et al.*, 2021).

Los cultivos se mantuvieron por 5 días en las condiciones de incubación descritas anteriormente. La Figura 9 presenta fotografías de uno de los cultivos analizados.

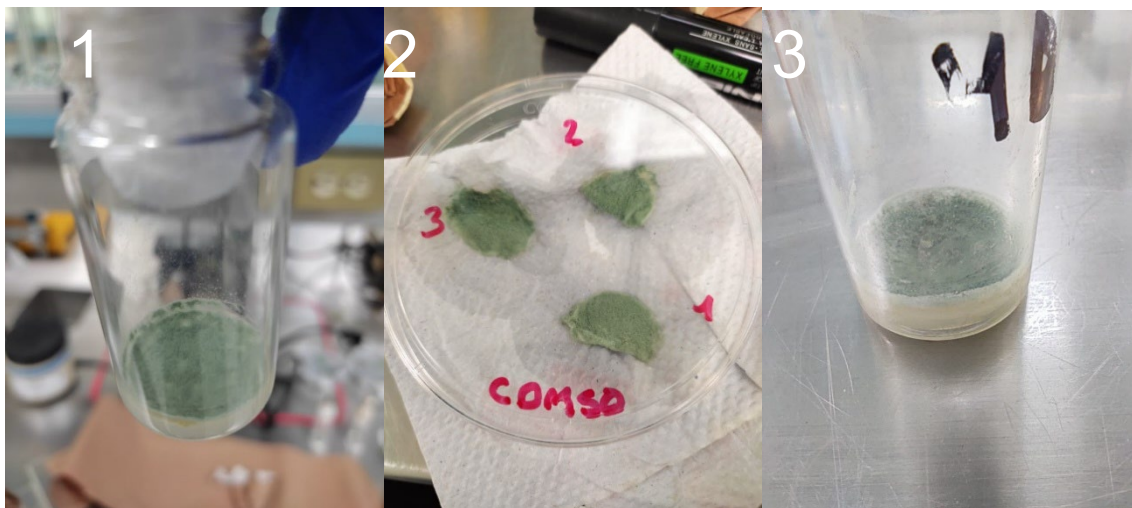


Figura 8. Las fotografías 1 y 3 muestran el crecimiento de *P. Crustosum* en presencia del tratamiento hormonal y después de 5 días de incubación. 2. Micelios de *P. Crustosum* en proceso de secado con papel filtro.

El peso promedio \pm desviación estándar obtenido a partir de los micelios de *P. Crustosum* sin tratamiento (control) fue de 102.9 ± 25.5 mg. Mientras que el peso del micelio de los grupos tratados con testosterona y androstenediona fue 142.4 ± 13.5 y 131.5 ± 12.7 mg respectivamente. La prueba post-hoc de Dunnett indicó una diferencia estadísticamente significativa, $P < 0.001$ con el control (Tabla 6). Los resultados también indicaron que los

andrógenos aumentaron el peso del micelio en comparación con el grupo tratado con DMSO (vehículo), 92.4 ± 10.7 mg y la dutasterida, 100 ± 13.6 mg ($P < 0.001$, ver Tabla 6). Estos datos evidenciaron que los andrógenos aumentan la velocidad de proliferación del micelio de *P. crustosum*. La dutasterida es un inhibidor de la actividad de la enzima SRD5A1/2 lo que explica que este esteroide no haya estimulado el crecimiento del micelio.

Tabla 6. Prueba post-hoc de Dunnett, diferencia entre los pesos de los micelios de *P. Crustosum* en presencia de diferentes tratamientos

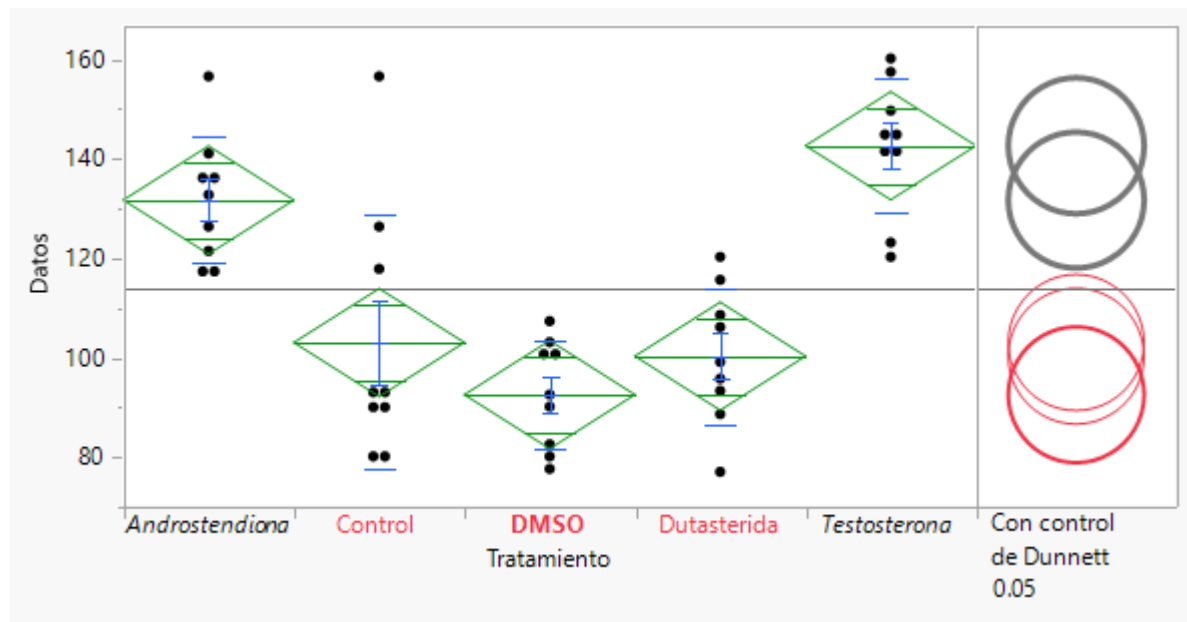


Tabla 6. Análisis univariante de los grupos tratados con hormonas respecto al grupo control (DMSO).

Los resultados obtenidos en los ensayos de lisis, así como en la cantidad de proteína por mg de micelio de *P. crustosum* que se observa en la figura 9 muestran que la cantidad de proteína fue superior en los grupos estimulados con andrógenos comparado con los controles y el grupo tratado con dutasterida. Sin embargo, la prueba post-hoc de Dunnett mostró que solamente existe diferencia significativa ($P < 0.001$) en la producción de proteínas/mg de micelio, cuando se utiliza la T, pero no la androstenediona (véase tabla 7). Estos resultados pueden explicarse con base en que la androstenediona es un andrógeno de efecto más débil que T.

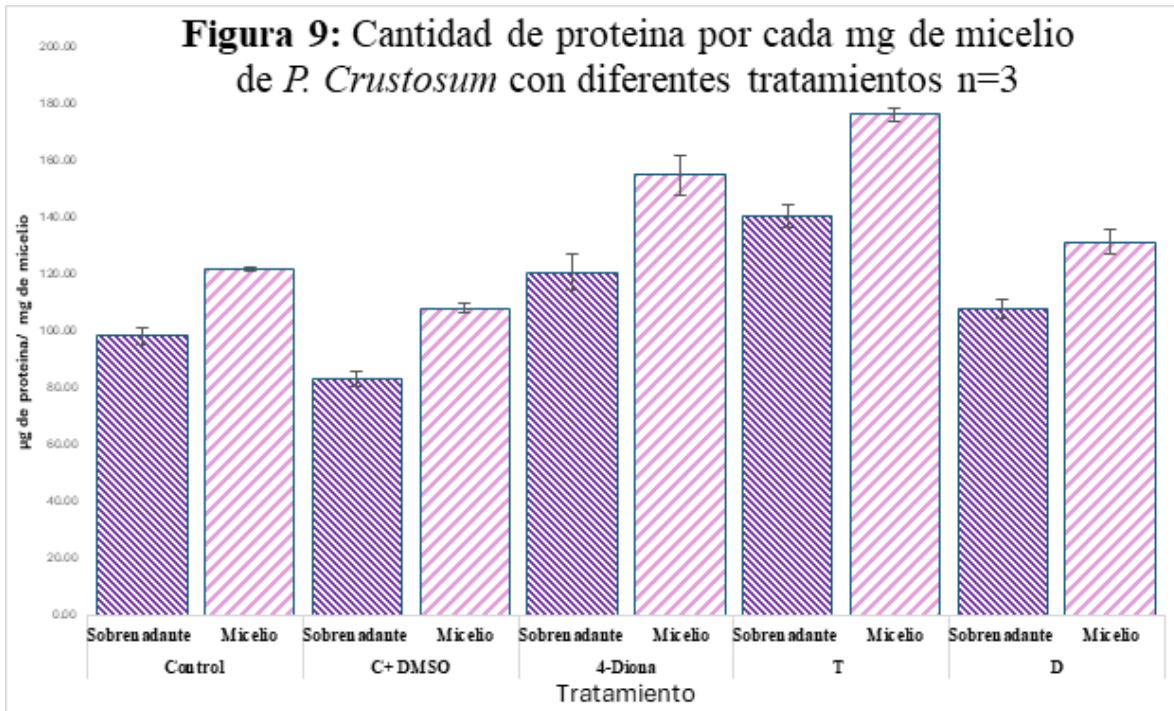


Figura 9. Concentración de proteína por mg de micelio obtenida por el método de congelación/ultraturrax con diferentes tratamientos

Tabla 7. Prueba post-hoc de Dunnett, diferencia entre la proteína/mg de micelio de *P. Crustosum* en presencia de diferentes tratamientos

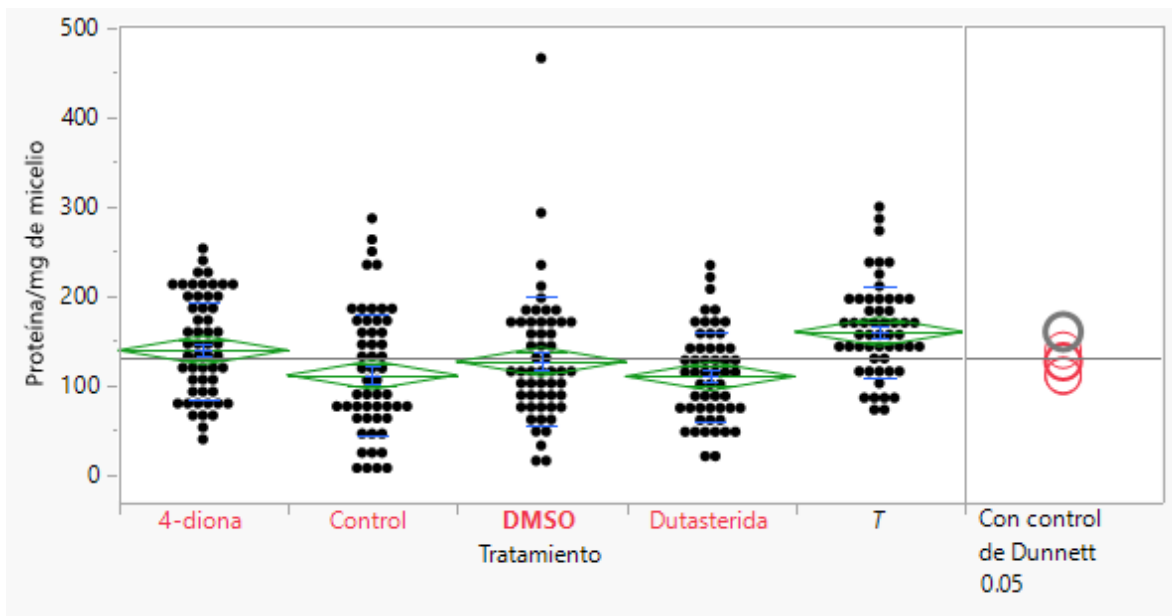


Tabla 7. Análisis univariante de los grupos tratados con hormonas respecto al control

Aunque los hongos no sintetizan hormonas de manera estricta como es el caso de las células animales, existen evidencias de que ciertas hormonas esteroides interactúan con células fúngicas (Črešnar & Žakelj-Mavrič, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que la testosterona juega un papel importante en la resistencia a infecciones de *Cándida albicans* (Arroyo-Mendoza *et al.*, 2020) o hongos pertenecientes al género *Cunninghamella* que han sido utilizados en biotransformaciones para la obtención de análogos a la testosterona con fines médicos (Ibrahim *et al.*, 2023). Aunque la interacción entre hormonas esteroides y hongos está documentada. Los mecanismos moleculares y los receptores implicados aún no están completamente descritos. Se tiene la teoría de que podrían existir mecanismos similares incluyendo isotipos de receptores esteroideos similares a los de células animales (Donova *et al.*, 2004).

La actividad anabólica de *P. crustosum* en presencia de testosterona y androstenediona sugiere que el hongo es capaz de reconocer estos andrógenos como señales metabólicas induciendo la expresión genética de proteínas específicas relacionadas con el metabolismo secundario (Ferrer-Romero *et al.*, 2019). La testosterona actúa como señal para la transcripción de genes regulados por esta vía hormonal (Cabeza *et al.*, 2001).

Las Figuras 10 y 11, muestran los geles de electroforesis con la presencia de una proteína con una masa molecular de alrededor de 25 kDa. Este dato se muestra tanto en la proteína procedente del micelio como la del sobrenadante. Las bandas se observan más claramente en las preparaciones tratadas con testosterona y con androstenediona en menor intensidad. La enzima SRD5A1 tiene una masa molecular de alrededor de 26 kDa, por lo que la proteína aislada podría ser la enzima SRD5A1. Además, se ha reportado actividad de la enzima SRD5A en cultivos de *P. crustosum*, catalizando la reacción de conversión de testosterona a dihidrotestosterona (Cabeza *et al.*, 2001). También se ha descrito que el isotipo SRD5A1 es capaz de utilizar androstenediona como sustrato, catalizando su conversión a 5 α -androstanodiona (Han *et al.*, 2021).

En el grupo tratado con dutasterida, no se observaron bandas en el peso correspondiente a 26 kDa (Figuras 10 y 11), en el gel de electroforesis. Lo que indica que la dutasterida no actuó como señal para la síntesis de proteínas, debido a que la dutasterida es un inhibidor de la actividad de la enzima SRD5A, de tipos 1 y 2 de la (Ding *et al.*, 2024).

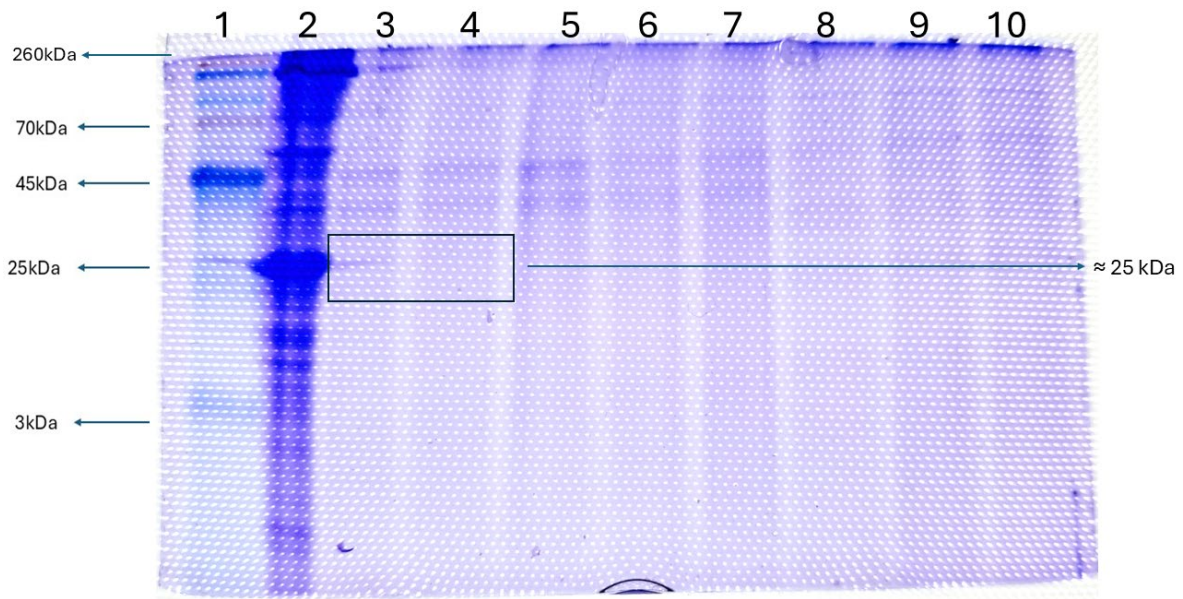


Figura 10. gel de electroforesis SDS page con muestras del protocolo de lisis de *P. crustosum* carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: próstata homogenizada de hámster, carril 3: sobrenadante grupo testosterona, carril 4: sobrenadante grupo androstenediona, carril 5: sobrenadante grupo control, carril 6: sobrenadante grupo control DMSO, carril 7: sobrenadante grupo dutasterida, Carril 8: pellet grupo dutasterida, carril 9: pellet grupo androstenediona, carril 10 pellet grupo control

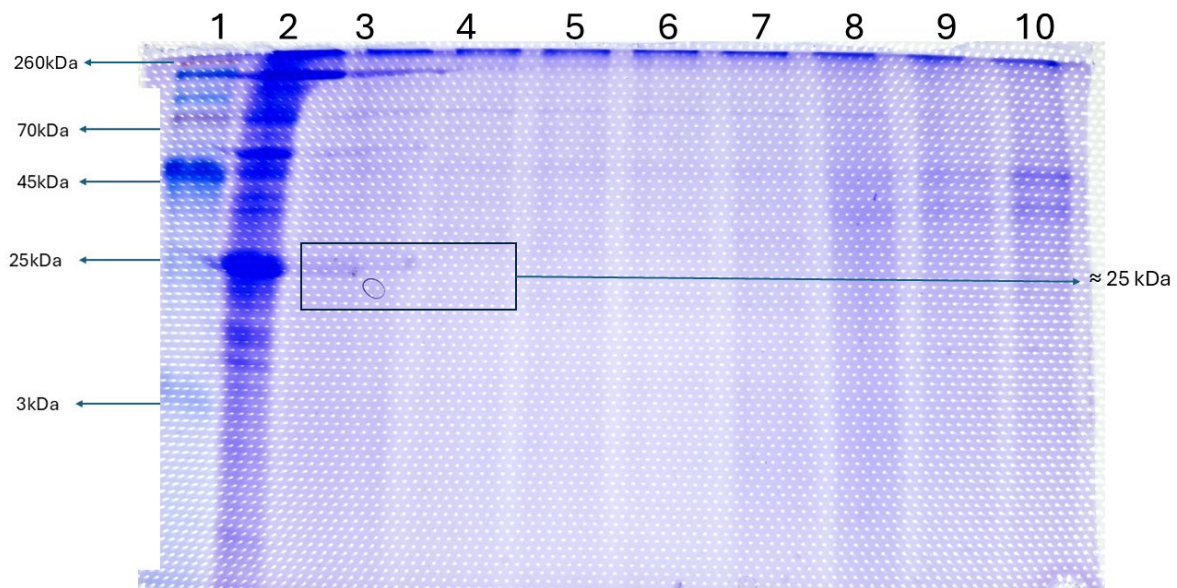


Figura 11: gel de electroforesis SDS page con muestras del protocolo de lisis de *P. crustosum* carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: próstata homogenizada de hámster, carril 3: pellet grupo testosterona, carril 4: pellet grupo androstenediona, carril 5: pellet grupo dutasterida carril 6: pellet grupo control, carril 7: grupo DMSO, Carril 8: sobrenadante grupo testosterona 2x, carril 9: sobrenadante grupo androstenediona, carril 10 sobrenadante grupo dutasterida

Conclusión.

1. La fuente orgánica en la que creció más rápidamente la especie de *P. crustosum* fue la del maíz.
2. Los resultados evidenciaron que los andrógenos aumentan la velocidad de proliferación del micelio de *P. crustosum* y por lo tanto su masa.
3. El método de lisis celular más eficiente para romper la pared del hongo filamentoso *P. crustosum*, con el objetivo de extraer la enzima SRD5A, fue, el de la combinación de la congelación-Ultraturrax en presencia de buffer conteniendo lubrol.
4. La cantidad de proteína obtenida a partir de la membrana celular y el sobrenadante fue superior en los grupos estimulados con andrógenos comparado con los controles y el grupo tratado con dutasterida. Sin embargo, la prueba post-hoc de Dunnett mostró que solamente existe diferencia significativa ($P < 0.001$) en la producción de proteínas/mg de micelio, cuando se utiliza la testosterona, pero no la androstenediona.
5. Se identificó la expresión de una proteína de 26 kDa mediante la técnica de electroforesis SDS- PAGE en la membrana y en el citoplasma obtenidos a partir de cultivos de *P. crustosum*. Esta evidencia fue clara en presencia de andrógenos en el medio de incubación, en comparación con el control.
6. Los resultados confirman que *P. crustosum* se puede utilizar como un sistema viable para la producción de enzimas como la SRD5A, lo que lo coloca como una alternativa para su aplicación en estudios Química Medicinal y Procesos Biotecnológicos.

Referencias:

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). *Review of Prostate anatomy and embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia*. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
- Arroyo-Mendoza, M., Peraza, K., Olson, J., Adler-Moore, J. P., & Buckley, N. E. (2020). *Effect of testosterone and estrogen supplementation on the resistance to systemic Candida albicans infection in mice*. *Heliyon*, 6(7), e04437. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04437>
- Barbonetti, A., D'Andrea, S., & Francavilla, S. (2020). *Testosterone replacement therapy*. *Andrology*, 8(6), 1551–1566. <https://doi.org/10.1111/andr.12774>
- Barrett K.E., & Barman S.M., & Brooks H.L., & Yuan J.J., (2020). *Función del sistema reproductor masculino*. *Ganong Fisiología médica*, 26a. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.up.elogim.com/content.aspx?bookid=2954§ionid=250024744>
- Bhadauria, V., & Peng, Y. (2010). *Optimization of a protein extraction technique for fungal proteomics*. *Indian Journal of Microbiology*, 50(S1), 127–131. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0072-3>
- Bourlieu, C., Astruc, T., Barbe, S., Berrin, J., Bonnin, E., Boutrou, R., Hugouvieux, V., Feunteun, S. L., & Paës, G. (2020). *Enzymes to unravel bioproducts architecture*. *Biotechnology Advances*, 41, 107546. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107546>
- Bridge, P. D., Kokubun, T., & Simmonds, M. S. J. (2004). *Protein extraction from fungi*. In: Humana Press eBooks (pp. 37–46). <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:37>
- Cabeza, M., Heuze, I., Bratoeff, E., Ramírez, E., & Martínez, R. (2001). *Evaluation of new pregnane derivatives as a 5 α -Reductase inhibitor*. *Chemical & Pharmaceutical*

Bulletin/Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49(5), 525–530.
<https://doi.org/10.1248/cpb.49.525>

- Chislett, B., Chen, D., Perera, M. L., Chung, E., Bolton, D., & Qu, L. G. (2023). *5-alpha reductase inhibitors use in prostatic disease and beyond*. *Translational Andrology and Urology*, 12(3), 487–496. <https://doi.org/10.21037/tau-22-690>
- Costa, M. B. (2023). *Cultivo de Aspergillus niger C em estado sólido em biorreator de leito empacotado para a produção de ácido cítrico e biofertilização de solos [Tesis de grado, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS]*. <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/19223>
- Črešnar, B., & Žakelj-Mavrič, M. (2008). *Aspects of the steroid response in fungi*. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.11.002>
- Danaeifar, M. (2022). *New horizons in developing cell lysis methods: A review*. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(11), 3007–3021. <https://doi.org/10.1002/bit.28198>
- Díaz, Á. G., Terrazas-López, M., Aguirre-Reyes, L. G., Lobo-Galo, N., Álvarez-Parrilla, E., & Martínez-Martínez, A. (2019). *Aspectos estructurales y funcionales de la N-Succinil-L, L-diaminopimelato desuccinilasa, una enzima clave para el crecimiento bacteriano y un blanco para el control antimicrobiano*. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22, e191. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.191>
- Ding, Y., Wang, C., Bi, L., Du, Y., Lu, C., Zhao, M., & Fan, W. (2024). *Dutasteride for the Treatment of Androgenetic Alopecia: An updated review*. *Dermatology*, 1–22. <https://doi.org/10.1159/000541395>
- Donova, M. V., Egorova, O. V., & Nikolayeva, V. M. (2004). *Steroid 17 β -reduction by microorganisms—a review*. *Process Biochemistry*, 40(7), 2253–2262. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.025>

- Duduk, N., Bekčić, F., Žebeljan, A., Vučković, N., & Vico, I. (2021). *First Report of Blue Mold Caused by Penicillium crustosum on Nectarine Fruit in Serbia*. *Plant Disease*, 105(2), 487. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-20-1632-pdn>
- Escamilla-Cruz, M., Magaña, M., Escandón-Pérez, S., & Bello-Chavolla, O. Y. (2023). *Use of 5 α -reductase Inhibitors in Dermatology: A Narrative Review*. *Dermatology and Therapy*, 13(8), 1721–1731. <https://doi.org/10.1007/s13555-023-00974-4>
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, H. J., Díaz-Fernández, U., Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, H. J., & Díaz-Fernández, U. (2019). *Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por Pleurotus ostreatus en fase sumergida*. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 16-30. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212019000100016
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2020). *An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecule recovery*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(7), 635–654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>
- Han, Y., Zhuang, Q., Sun, B., Lv, W., Wang, S., Xiao, Q., Pang, B., Zhou, Y., Wang, F., Chi, P., Wang, Q., Li, Z., Zhu, L., Li, F., Deng, D., Chiang, Y., Li, Z., & Ren, R. (2021). *The crystal structure of steroid reductase SRD5A reveals a conserved steroid reduction mechanism*. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20675-2>
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). *Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bustin' Grab*. *BMC. Biotechnology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>
- Ibrahim, A. S., Mansour, M. K., Ahmed, M. M., Ulber, R., & Zayed, A. (2023). *Metabolism of natural and synthetic bioactive compounds in Cunninghamella fungi and their applications in drug discovery*. *Bioorganic Chemistry*, 140, 106801. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106801>

- Islam, M. S., Aryasomayajula Pérez De Mora, A., & Selvaganapathy, P. (2017). *A review on macroscale and microscale cell lysis methods*. *Micromachines*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Joseph, D. B., Henry, G. H., Malewska, A., Reese, J. C., Mauck, R. J., Gahan, J. C., Hutchinson, R. C., Mohler, J. L., Roehrborn, C. G., & Strand, D. W. (2022). *5-Alpha reductase inhibitors induce a prostate luminal to club cell transition in human benign prostatic hyperplasia*. *Journal of Pathology*, 256(4), 427–441. <https://doi.org/10.1002/path.5857>
- Joshi, H., & Jain, V. (2017). *Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein*. *Analytical Biochemistry*, 528, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.04.009>
- Karpiński, A. A., Elguera, J. C. T., Sanner, A., Konopka, W., Kaczmarek, L., Winter, D., Konopka, A., & Bulska, E. (2022). *Study on tissue homogenization buffer composition for brain mass Spectrometry-Based proteomics*. *Biomedicines*, 10(10), 2466. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102466>
- Katsimpouras, C., & Stephanopoulos, G. (2021). *Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development*. *Current Opinion. Biotechnology*, 69, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.003>
- Kennelly PJ, Rodwell VW. Kennelly, P.J., & Rodwell, V.W. Kennelly, Peter J., and Victor W. Rodwell. (2022). *Enzimas: mecanismo de acción*. En: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil P. Rodwell V.W., & Bender D.A., & Botham K.M., & Kennelly P.J., & Weil P(Eds.), Eds. Victor W. Rodwell, *et al. Harper. Bioquímica ilustrada*, 32e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.up.elogim.com/content.aspx?bookid=3284§ionid=272017117>
- Kentache, T., Althoff, C. R., Caligiore, F., Souche, E., Schulz, C., Graff, J., Pieters, E., Stanley, P., Contessa, J. N., Van Schaftingen, E., Matthijs, G., Foulquier, F., Bommer, G. T., & Wilson, M. P. (2024). *The N-glycosylation defect in *Lec5* and *Lec9**

CHO cells is caused by the absence of the DHR5X gene. BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2024.06.18.599300>

- Krishnaswamy, A., Barnes, N., Lotlikar, N. P., & Damare, S. R. (2018). *An Improved Method for Protein Extraction from Minuscule Quantities of Fungal Biomass.* Indian Journal of Microbiology/Indian Journal of Microbiology (Print), 59(1), 100–104. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0752-y>
- Kumar, G., & Barboza-Meca, J. J. (2022). *5-Alpha-Reductase deficiency.* StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539904/>
- Lakshman, D. K., Natarajan, S. S., Lakshman, S., Garrett, W. M., & Dhar, A. K. (2008). *Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of Rhizoctonia solani.* Mycologia, 100(6), 867–875. <https://doi.org/10.3852/08-065>
- Launer, B. M., McVary, K. T., Ricke, W. A., & Lloyd, G. L. (2020). *The rising worldwide impact of benign prostatic hyperplasia.* BJU International, 127(6), 722–728. <https://doi.org/10.1111/bju.15286>
- Lemus, Y. A., Rodríguez, G. M., Cuervo, R. A., Vanegas, J. a. D., Zuluaga, C. L., & Rodríguez, G. (2008). *Determinación de la factibilidad del hongo Metarhizium anisopliae para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (Atta cephalotes).* DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doi.org/10.21500/22563202.517>
- Lippi, G., Musa, R., Aloe, R., Mercadanti, M., & Pipitone, S. (2011). *Influence of temperature and period of freezing on the generation of hemolysate and blood cell lysate.* Clinical Biochemistry, 44(14–15), 1267–1269. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.07.015>
- Lokeshwar, S. D., Harper, B. T., Webb, E., Jordan, A., Dykes, T. A., Neal, D. E., Jr, Terris, M. K., & Klaassen, Z. (2019). *Epidemiology and treatment modalities for the management of benign prostatic hyperplasia.* Translational Andrology and Urology, 8(5), 529–539. <https://doi.org/10.21037/tau.2019.10.01>

- Mayta-Hanco, J., Trujillo, A. J., & Juan, B. (2020). *La homogeneización a ultra-alta presión (UHPH)*. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(2), e17934. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17934>
- Mehmannaavaz, M., & Nickavar, B. (2022). *Biotransformation of testosterone by the filamentous fungus Penicillium pinophilum*. *Archives of Microbiology*, 204(9). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03191-3>
- Nassar GN, Leslie SW. (2023) *Physiology, Testosterone*. *StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526128/>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). *Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019*. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- O'Brien, R. O., Hayes, M., Sheldrake, G., Tiwari, B., & Walsh, P. (2022). *Macroalgal Proteins: A Review*. *Foods*, 11(4), 571. <https://doi.org/10.3390/foods11040571>
- Pandey, A., Larroche, C., Gnansounou, E., Khanal, S. K., Dussap, C., & Ricke, S. (2019). *Biomass, biofuels, biochemicals: Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels (2.^a ed.)*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00957-3>
- Pang, H. W., & Barrientos, A. (2023). *Rapid cryopurification of the yeast mitochondrial ribosome*. *Methods in Molecular Biology*, 133–141. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3171-3_9
- Pérez-De-Mora, A., Reuter, B., Lucio, M., Ahne, A., Schloter, M., & Pritsch, K. (2012). *Activity of native hydrolytic enzymes and their association with the cell wall of three ectomycorrhizal fungi*. *Mycorrhiza*, 23(3), 185–197. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0461-z>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. In Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. (2021). *Advances in Lipid Extraction Methods—A Review*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13643. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>
- Sardella, D., Gatt, R., & Valdramidis, V. P. (2018). *Turbidimetric assessment of the growth of filamentous fungi and the antifungal activity of zinc oxide nanoparticles*. *Journal of Food Protection*, 81(6), 934–941. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-17-448>
- Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., & O'Malley, M. A. (2015). *Robust and effective methodologies for cryopreservation and DNA extraction from anaerobic gut fungi*. *Anaerobe*, 38, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.11.008>
- Wang, X., Cho, K., & Son, A. (2015). *Ultrasonication as a rapid and high yield DNA extraction method for bacterial gene quantification by NanoGene assay*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1133–1140. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0465-6>
- Xiao, Q., Wang, L., Supekar, S., Shen, T., Liu, H., Ye, F., Huang, J., Fan, H., Wei, Z., & Zhang, C. (2020). *Structure of human steroid 5 α -reductase 2 with anti-androgen drug finasteride*. *Research Square* (Research Square). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-40159/v1>

ANEXOS:

Anexo 1: Curva de calibración

Solución estándar de albumina sérica bovina

Preparar la solución madre disolviendo 2.5 mg de albumina sérica bovina en 5 mL de agua. Preparar los estándares de proteína con concentración de 25, 50, 75, y 100 $\mu\text{g/mL}$ a partir de la solución madre, para esto agregar en 4 tubos Eppendorf 5, 10, 15 y 20 μL respectivamente de la solución madre y completar el volumen con agua destilada a 100 μL . En un quinto tubo agregar 100 μL de agua destilada, este tubo será el blanco.

Agregar a cada tubo 1 mL del reactivo de Bradford mezclar y dejar incubar la reacción durante dos minutos a temperatura ambiente, posterior a esto medir la λ a 595 nm en un espectrofotómetro. Graficar la absorbancia contra la concentración de proteína estándar.

TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS ESPECIALIZADOS.
XXXIII Congreso de Educación Química Farmacéutica Biológica/ XXIX Reunión de Estudiantes de Farmacia



F-012307

**El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
México, A. C.**
y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a: **Irving Daniel Muñoz Murillo, Dra. Marisa Cabeza Salinas**




Por su participación como **PONENTES** del trabajo titulado:
“**Optimización del proceso de lisis de la pared y membrana celulares de *Penicillium crustosum* para la obtención de proteínas**”
en el **XXXIII Congreso de Educación Química Farmacéutica Biológica
y la XXIX Reunión de Estudiantes de Farmacia,**
realizado los días 12 al 14 de marzo de 2025.

CDMX, Mex., a 14 de marzo de 2025


Dra. Liliana Schifter Aceves
Jefa del Departamento Sistemas Biológicos
UAM Unidad Xochimilco


DAR Juan José Díaz Esquivel
Presidente Comisión de Educación
del CNQFBM, A.C.


Dr. Roberto Díaz Torres
Presidente Comisión de Reunión
de Estudiantes de Farmacia del CNQFBM, A.C.


QFB Agustín Azcatl Romero
Presidente
Colegio Nacional de Químicos
Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

CRC's = Créditos para el Refrendo de la Certificación (0.6 Crc's por hora de capacitación), avalado por la Subcomisión de Educación Continua del COMECEP. Registro de Idoneidad DGP-SEP: SEP/DGP/CP089/17.

NOTA: Para ser válida en términos de certificación, esta constancia deberá estar impresa, contar con el sello del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. y cuando menos, una firma autógrafa.