

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **Grado en Biotecnología**

**“EVALUACIÓN DEL ORIGEN DE LA ACTIVIDAD  
ESTERASA SALIVAL, DIFERENCIAS ENTRE  
INDIVIDUOS CON NORMOPESO Y SOBREPESO Y SU  
MODULACIÓN POR COMPONENTES DE LA DIETA”**

**Autora: INMACULADA ARREAZA LÓPEZ**

Villaviciosa de Odón, a *18 de julio* de 2023

## **ANEXO IX**

**Título del Trabajo: “EVALUACIÓN DEL ORIGEN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA SALIVAL, DIFERENCIAS ENTRE INDIVIDUOS CON NORMOPESO Y SOBREPESO Y SU MODULACIÓN POR COMPONENTES DE LA DIETA”**

Este trabajo ha sido realizado en el **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)**, localizado en la calle Nicolás Cabrera nº 9, en el Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

Tutoras externas: Dra. Carolina Muñoz-González y Dra. Paula Martínez Oca.

Tutora interna: Dra. Sara Gómez Quevedo.

## **INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

La redacción de este Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo en el **Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)**. Dicho Instituto se inauguró el 24 de marzo de 2011, siendo un centro mixto de titularidad compartida entre el CSIC y Universidad Autónoma de Madrid. El Instituto mantiene convenios con universidades, centros de investigación y laboratorios de todo el mundo.

El CIAL se organiza en tres departamentos: Bioactividad y Análisis de Alimentos; Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos; y Biotecnología y Microbiología de los Alimentos, donde se encuentra el grupo de investigación de **Química de Flavor, Fisiología Oral y Percepción Sensorial de los Alimentos (FlavorSen)**. Concretamente, es en este Grupo de Investigación donde se ha desarrollado este trabajo.

Las líneas de investigación del grupo **FlavorSen** están dirigidas al estudio de las moléculas responsables del sabor de los alimentos y el impacto que tienen sobre la percepción sensorial, teniendo en cuenta su comportamiento e interacción con la fisiología oral durante el consumo. Actualmente, la investigación principal se centra en evaluar cómo las diferencias interindividuales en fisiología oral afectan a la percepción de sabor y la aceptabilidad durante el consumo de alimentos.

El presente trabajo se ha realizado dentro del **proyecto AROMABIOTA**, que tiene como objetivo principal estudiar la relación entre el índice de masa corporal, la percepción sensorial y su relación con la fisiología oral. Este proyecto está liderado por la Dra. Carolina Muñoz-González y está financiado por el Programa de Atracción de Talento Investigador de la Comunidad de Madrid (Ref 2019-T1/BIO-13748).



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>8</b>  |
| 1.1. El sabor de los alimentos.....  | 8         |
| 1.1.1. Compuestos volátiles: ésteres.....  | 9         |
| 1.2. Diferencias interindividuales en la percepción del sabor: el caso del sobrepeso.....  | 9         |
| 1.3. La saliva.....  | 10        |
| 1.4. Esterasa oral.....  | 12        |
| <b>2. OBJETIVO .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>15</b> |
| 3.1. Colecta de muestras de saliva.....  | 15        |
| 3.2. Análisis del origen de la actividad esterasa.....   | 16        |
| 3.2.1. Características de los donantes de saliva.....  | 16        |
| 3.2.2. Análisis de la actividad esterasa.....  | 16        |
| 3.3. Análisis de la expresión génica.....  | 17        |
| 3.3.1. Características de los donantes de saliva.....  | 17        |
| 3.3.2. Extracción de ARN bacteriano de la saliva.....  | 17        |
| 3.3.3. Retrotranscripción del ARN bacteriano de la saliva.....   | 18        |
| 3.3.4. Comprobación de la pureza del ARN bacteriano extraído.....  | 19        |
| 3.3.6. Diseño de los cebadores degenerados para el gen de la enzima acetilesterasa.....  | 19        |
| 3.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de la saliva.....   | 21        |
| 3.4. Diferencias en la actividad esterasa en función del IMC.....  | 22        |
| 3.4.1. Características de los donantes de saliva.....  | 22        |
| 3.4.2. Determinación de la actividad esterasa en presencia o ausencia de matrices ricas en polifenoles.....  | 22        |
| 3.5. Análisis estadístico.....   | 23        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>24</b> |
| 4.1. Origen de la actividad esterasa.....  | 24        |
| 4.2. Análisis de la expresión génica.....  | 25        |
| 4.2.1. Comparación de la eficiencia de extracción de ARN entre los dos kits: <i>E.Z.N.A Bacterial RNA Kit</i> y <i>Total RNA Purification NORGEN Kit</i> ..... | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.2. Puesta a punto de la RT-qPCR para el análisis de la expresión génica de la enzima acetilesterasa. ....                        | 30        |
| 4.2.3. Comprobación de la efectividad del cebador degenerado diseñado.....   | 30        |
| 4.3. Diferencia de la actividad esterasa en el grupo con normopeso y el grupo con sobrepeso. ....                                    | 36        |
| 4.4. Efecto de la composición de la matriz alimentaria en la actividad esterasa salival en individuos con normopeso y sobrepeso..... | 38        |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>7. ANEXOS.....</b>  | <b>46</b> |
| ANEXO 1: Reflexión acerca de la aportación del TFG a la sostenibilidad. ....   | 46        |

## RESUMEN

### **“EVALUACIÓN DEL ORIGEN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA SALIVAL. DIFERENCIAS ENTRE INDIVIDUOS CON NORMOPESO Y SOBREPESO Y SU MODULACIÓN POR COMPONENTES DE LA DIETA”.**

La saliva es un fluido biológico de composición compleja que posee un importante papel en la percepción sensorial. Las enzimas esterases salivales tienen la capacidad de degradar y/o metabolizar compuestos volátiles del tipo ésteres presentes en los alimentos, originando metabolitos con características sensoriales diferentes a los ésteres de partida. Esta actividad es individuo-dependiente, lo que podría condicionar la percepción sensorial personal. El objetivo del trabajo fue conocer el origen de la actividad esterasa salival (bacteriano o humano), comprobar si existen diferencias de actividad entre individuos con diferente índice de masa corporal (IMC) y su respuesta frente a matrices alimentarias ricas en polifenoles (té matcha jengibre y *superfruit*). Para ello, se midió la actividad esterasa en el sobrenadante y precipitado de muestras de saliva de 10 donantes. También, se desarrolló un método de análisis de la expresión génica para la enzima acetilesterasa. Por último, se analizaron las diferencias de actividad esterasa en la saliva de individuos con normopeso (n=10) y sobrepeso (n=10) en presencia o ausencia de matrices alimentarias ricas en polifenoles. Los resultados mostraron que la actividad esterasa fue significativamente mayor en el precipitado que en el sobrenadante de las muestras, sugiriendo su origen bacteriano. Los análisis RT-qPCR realizados con los cebadores (degenerado-ES y específico para *Streptococcus mutans* -SMU) para la detección de esterasa bacteriana mostraron que no hubo expresión y podría deberse a una falta de especificidad de los cebadores y/o a una escasez de material genético en las muestras. Por último, se confirmaron diferencias en la actividad esterasa entre los dos grupos de IMC, siendo significativamente mayor en las muestras de saliva del grupo con sobrepeso. Del análisis de actividad esterasa en presencia de matrices alimentarias se observó que su presencia inhibió significativamente la actividad de los individuos con sobrepeso. Por tanto, el metabolismo oral de ésteres estaría disminuido y la percepción sensorial modulada. Esto podría ser una estrategia para la elaboración de alimentos personalizados.

Palabras clave: saliva, actividad esterasa, acetilesterasa, microbiota oral, normopeso, sobrepeso, polifenoles.

## ABSTRACT

### "EVALUATION OF THE ORIGIN OF SALIVARY ESTERASE ACTIVITY. DIFFERENCES BETWEEN NORMAL AND OVERWEIGHT INDIVIDUALS AND THEIR MODULATION BY DIETARY COMPONENTS"

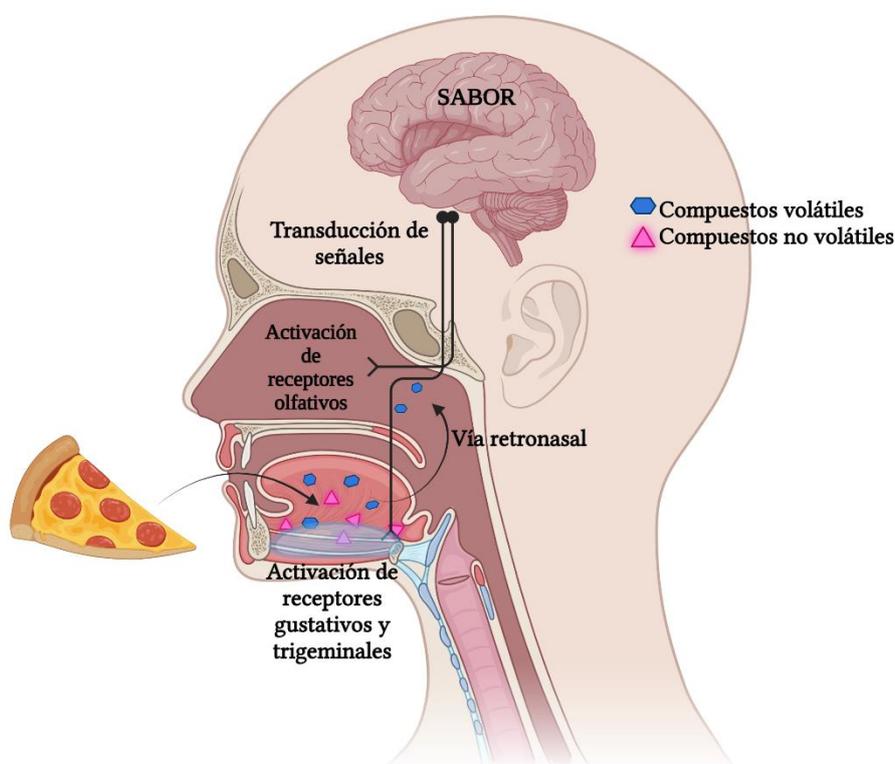
Saliva is a biological fluid of complex composition that plays an important role in sensory perception. Salivary esterase enzymes have the capacity to degrade and/or metabolize volatile ester-like compounds present in food, originating metabolites with sensory characteristics different from the starting esters. This activity is individual-dependent, which could condition personal sensory perception. The aim of this research was to know the origin of salivary esterase activity (bacterial or human), to check if there are differences in activity between individuals with different body mass index (BMI) and their response to food matrices rich in polyphenols (matcha ginger tea and *superfruit*). For this purpose, esterase activity was measured in the supernatant and pellet of saliva samples from 10 donors. Also, a gene expression analysis method was developed for the enzyme acetylcysteine esterase. Finally, differences in esterase activity in the saliva of normal weight (n=10) and overweight (n=10) individuals in the presence or absence of polyphenol-rich food matrices were analyzed. The results showed that esterase activity was significantly higher in the pellet than in the supernatant of the samples, suggesting its bacterial origin. RT-qPCR analyses performed with the primers (degenerate-ES and specific for *Streptococcus mutans-SMU*) for the detection of bacterial esterase showed that there was no expression and could be due to a lack of specificity of the primers and/or a shortage of genetic material in the samples. Finally, differences in esterase activity between the two BMI groups were confirmed, being significantly higher in saliva samples from the overweight group. From the analysis of esterase activity in the presence of food matrices, it was observed that their presence significantly inhibited the activity of overweight individuals. Therefore, oral ester metabolism would be decreased and sensory perception modulated. This could be a strategy for the development of personalized foods.

Key words: saliva, esterase activity, acetylcysteine esterase, oral microbiota, normal weight, overweight, polyphenols.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El sabor de los alimentos.

El sabor de los alimentos es considerado uno de los mayores determinantes de las preferencias alimentarias y, por tanto, uno de los factores clave para entender el comportamiento alimentario. El término “sabor” es un concepto complejo que se compone de la suma de sensaciones gustativas, olfativas y trigeminales que se perciben durante el consumo de alimentos (1). La percepción del sabor se produce cuando ciertos compuestos químicos que forman parte de los alimentos se liberan de los mismos en la cavidad oral, diluyéndose en la saliva, para después activar los quimiorreceptores gustativos y trigeminales, situados en la boca (2). Una parte de ellos, los de naturaleza volátil, viajan a la cavidad nasal, gracias a los flujos de exhalación, por la vía retronasal activando los receptores olfativos (3). Tras la activación de los receptores, se produce un proceso de transducción por el que las señales químicas se convierten en señales eléctricas, siendo procesadas por el cerebro y generando una imagen sensorial que, es lo que comúnmente conocemos como sabor (4) (Figura 1).

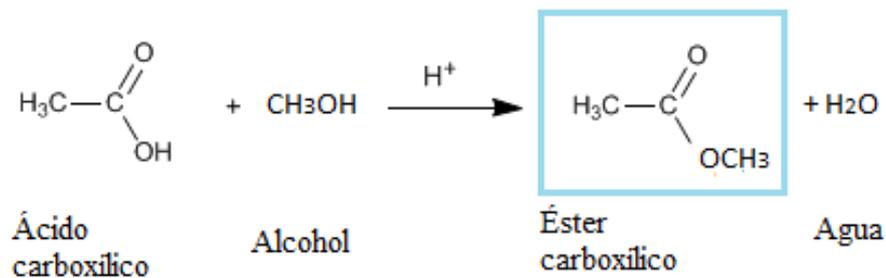


**Figura 1. Proceso de la percepción del sabor durante el consumo de alimentos.** Elaboración propia usando la herramienta *BioRender*.

Existe un elevado número de compuestos químicos responsables del sabor, pudiéndose clasificar de diferentes maneras, como por ejemplo, su naturaleza volátil o no volátil. Los compuestos no volátiles son, en general, responsables de las sensaciones gustativas (dulce, salado, amargo, ácido y umami) y trigeminales (5). Los compuestos de naturaleza volátil tienen una enorme relevancia sensorial y se estima que un 80% de lo que comúnmente conocemos como sabor viene determinado por el aroma retronasal.

### 1.1.1. Compuestos volátiles: ésteres.

Los compuestos volátiles presentes en los alimentos poseen una amplia diversidad respecto a sus características físico-químicas. Como característica general, presentan un peso molecular bajo y una elevada volatilidad. De acuerdo a su estructura, se pueden clasificar en diferentes familias químicas, como los ésteres, los aldehídos y los alcoholes (6). Concretamente, la familia de los ésteres tiene una gran relevancia a nivel sensorial, ya que están presentes en numerosos alimentos aportando notas frutales (tales como plátano, manzana, etc.) lo que contribuye a una mayor apreciación y aceptación de los alimentos por parte del consumidor (7). Los ésteres más comunes son compuestos orgánicos formados por la reacción química, conocida como esterificación, de un alcohol y un ácido carboxílico y originando los denominados ésteres carboxílicos (Figura 2).



**Figura 2. Reacción de esterificación.** Formación de éster carboxílico a partir de la reacción química de un ácido carboxílico y un alcohol.

## 1.2. Diferencias interindividuales en la percepción del sabor: el caso del sobrepeso.

Como se ha comentado previamente, la percepción del sabor se inicia al introducir un alimento en la cavidad oral. Es aquí cuando se producen un conjunto de procesos que

permiten la desestructuración del alimento mediante la masticación, su mezclado con saliva y la formación del bolo alimenticio, así como el proceso de deglución (8).

Este procesamiento oral permite además que se liberen del alimento las moléculas responsables del sabor y que activen los receptores gustativos, trigeminales y olfativos, percibiéndose así el sabor de los alimentos (9). En este sentido, la fisiología oral (estado bucodental, fuerza de masticación, flujo y composición salival) juega un papel muy importante en la percepción del sabor. Tanto es así, que se considera que la percepción del sabor depende no solo de la composición de los alimentos, sino de la interacción de éstos con la fisiología oral de cada individuo (10). Este hecho contribuiría a explicar las variaciones a nivel de percepción del sabor entre individuos, así como las diferencias en preferencias alimentarias en los consumidores (11).

En este sentido, se ha encontrado que determinados factores como la edad o el sexo de los individuos pueden modificar la fisiología oral, contribuyendo así a una diferente liberación de compuestos responsables del sabor durante el consumo de los alimentos y, por tanto, a la percepción del sabor (12, 13). Otro factor que se ha relacionado recientemente con las diferencias en percepción del sabor y fisiología oral es el índice de masa corporal (IMC). Dicho índice, se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su altura en metros ( $IMC = \text{kg}/\text{m}^2$ ). En concreto, las personas con IMC superior a 25 (sobrepeso y obesidad) presentan una intensidad disminuida o atenuada con respecto a las personas con normopeso (IMC: 18,5 – 24,9) (14). Además, se ha encontrado que estas personas también presentan diferencias en parámetros salivales en comparación con las personas con normopeso (15). El incremento de la obesidad en la población a nivel mundial supone un desafío para la sanidad pública, implica que el estudio de los mecanismos que condicionan las preferencias alimentarias en obesidad, tales como la percepción del sabor, sea de extrema relevancia (14, 15).

### **1.3. La saliva.**

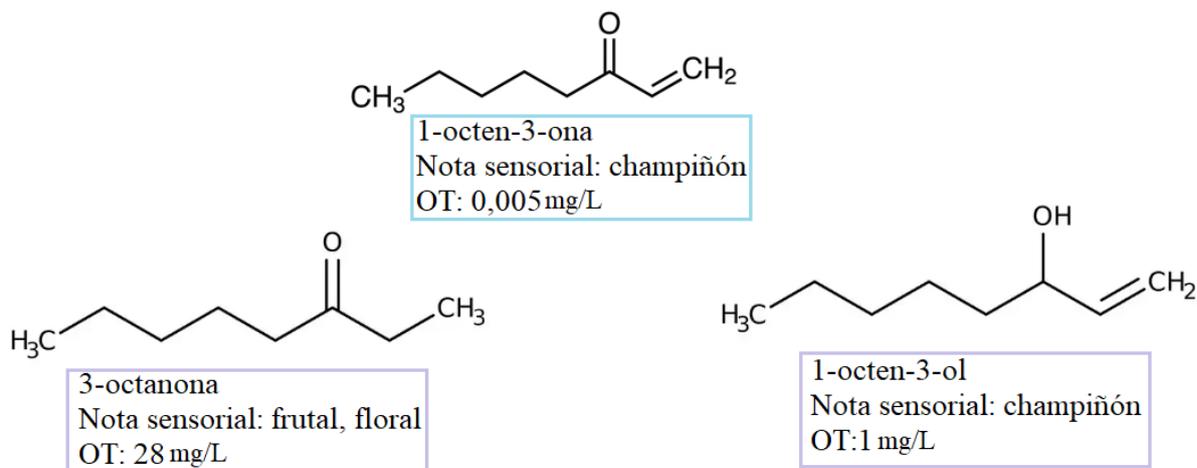
La saliva es una mezcla compleja de fluidos hipotónicos y ligeramente ácidos, siendo el 99% de su composición agua y el 1% restante sólidos orgánicos e inorgánicos, como proteínas y electrolitos (16). La secreción de saliva se lleva a cabo por tres glándulas salivales principales: las glándulas sublinguales,

submandibulares y parótidas, las cuales producen el 90% de la saliva secretada. El 10% restante de saliva secretada procede de componentes de origen no glandular, tales como restos de alimentos, microorganismo y células epiteliales descamadas, entre otros (17). En este sentido, la comunidad bacteriana oral es una de las más diversas y abundantes del organismo después de la microbiota intestinal. Además, en la saliva existen numerosas enzimas que favorecen la hidrólisis enzimática de las moléculas que forman los alimentos que pueden tener origen bacteriano o humano.

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que catalizan múltiples reacciones químicas en el organismo. Su actividad viene determinada por su estructura tridimensional, debido al plegamiento que presentan. Los centros activos se localizan en dicha estructura y son los encargados de interactuar con las moléculas de interés para ser catalizadas y obtener un producto. Concretamente, la enzima salival más estudiada es la amilasa, de origen humano, que hidroliza el almidón presente en los alimentos (17). Sin embargo, existen numerosas actividades enzimáticas en la cavidad oral mucho menos estudiadas y de las que aún se desconoce su origen.

La saliva tiene un importante papel en la percepción del sabor y aroma de los alimentos, ya que interactúa con los compuestos químicos sensorialmente activos durante el procesamiento oral de los alimentos (16). La saliva es el vehículo de transporte de los compuestos gustativos y trigeminales e interacciona fuertemente mediante distintos fenómenos (dilución, interacción química, metabolismo) con los compuestos volátiles antes de ser percibidos (9). En los últimos años, se ha descrito que las enzimas salivales son capaces de metabolizar ciertos compuestos volátiles de los alimentos (19), como aldehídos, ésteres y dicetonas. Este hecho podría tener consecuencias a nivel sensorial ya que, una mayor degradación de los compuestos de origen, y, por tanto, una mayor formación de metabolitos con características sensoriales diferentes al compuesto de partida, podría condicionar la intensidad y la calidad percibida (20). En la figura 3 se muestra un ejemplo. Como se puede observar, en presencia de saliva, el compuesto 1-octen-3-ona, caracterizado por notas de sabor a champiñón y un umbral de olfacción (OT) de 0,0005 mg/L que se metaboliza dando lugar a los metabolitos 3-octanona y 1-octen-3-ol con

características sensoriales y notas frutales, florales y de champiñón y umbrales de olfacción mucho mayores (21).



**Figura 3. Degradación del compuesto 1-octen-3-ona en sus respectivos metabolitos.**

De esta manera, las personas que metabolizan en mayor proporción los compuestos volátiles, percibirán los estímulos sensoriales de manera diferente a las personas que no los metabolizan o lo hagan en menor medida. Por tanto, las enzimas salivales son unos componentes principales de la saliva que contribuyen a la percepción organoléptica que requieren de más estudio.

#### **1.4. Esterasa oral.**

Entre las enzimas orales capaces de metabolizar compuestos responsables del aroma de los alimentos, se encuentran las esterases orales, responsables del metabolismo de ésteres (22). Este metabolismo, además de afectar a la intensidad y calidad percibidas, afecta a la persistencia en la que los compuestos son percibidos. Así, el metabolismo oral de ésteres implica que sean uno de los compuestos que desaparecen más rápidamente de la cavidad bucal y que, por tanto, su sabor se extinga de una manera precoz.

Las esterases salivales son enzimas que pueden ser sintetizadas por diferentes vías tales como las glándulas salivales mayor y menor, la microbiota oral y las células epiteliales (17). Sin embargo, a día de hoy se desconocen las enzimas específicas responsables de la degradación de ésteres durante el consumo de alimentos, así como si su origen es humano o bacteriano.

Las enzimas de tipo esterasa, con nomenclatura EC.3.1.1.X, pertenecen al grupo de hidrolasas (23). Las hidrolasas de ésteres carboxílicos, generalmente conocidas como esterasas, son enzimas que catalizan reacciones de síntesis e hidrólisis de enlaces éster en sus subproductos: alcoholes y ácidos carboxílicos. La presencia de enzimas esterasas es común en tejidos humanos y microorganismos. Es necesario considerar que otros tipos de enzimas influyen en la actividad esterasa salival total. Algunas de estas enzimas son las acetilesterasas, las carboxilesterasas o las lipasas (24). Además, los componentes de la matriz alimentaria, como los polifenoles, pueden modificar la actividad esterasa salival (22). Un ejemplo de una matriz alimentaria rica en polifenoles es el té matcha, que presenta un alto contenido en catequinas, siendo estas un antioxidante polifenólico que al interactuar con las esterasas orales, modificará su actividad enzimática.

## **2. OBJETIVO**

El principal objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado ha sido caracterizar el origen de la actividad esterasa salival, las diferencias en actividad esterasa entre individuos con diferente IMC y su distinta modulación por matrices alimentarias de polifenoles.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el origen de la esterasa salival mediante el análisis de su actividad en el sobrenadante y precipitado de muestras de saliva (n=10), así como el desarrollo de un método de la expresión génica dirigido a una esterasa específica.
- Analizar la actividad de la esterasa salival en individuos con diferente IMC (n=20).
- Analizar los cambios en la actividad esterasa salival en individuos con diferentes IMC en presencia de matrices ricas en polifenoles.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Colecta de muestras de saliva.

La recolección de muestras de saliva se realizó mediante el método de salivación pasiva. Las pautas para la donación de saliva consistían en no haber consumido ningún alimento 2 horas antes y haberse lavado los dientes tras la última comida. La recogida de saliva se realizó durante 10 minutos en un tubo de 50mL estéril que debía conservarse en hielo para evitar la degradación de la muestra.

Inmediatamente tras la toma de muestras, se procedió a su preparación antes de ser almacenadas. La preparación se realizó en una cabina de bioseguridad P2 para mantener las condiciones de esterilidad y evitar posibles contaminaciones. Antes de la congelación, las muestras fueron sometidas a diferentes pretratamientos en función del tipo de análisis posterior.

En el caso de las muestras de saliva dirigidas a la determinación de la actividad esterasa (n=10), se mezclaron todas en un tubo de 50mL estéril y se centrifugaron (T=4°C; t= 15 minutos; 15.000rpm) para separar el precipitado del sobrenadante. Se guardaron a -80°C hasta su análisis.

En el caso de las muestras dirigidas al análisis de la expresión génica (n=10), se procedió a realizar un mezclado de las salivas recolectadas pertenecientes a 10 panelistas. Para ello, las muestras de saliva recogidas se juntaron en un matraz previamente esterilizado en una estufa de calor seco (T=80°C; t=45 minutos). El volumen total de muestra obtenido fue de 50mL. A continuación, este volumen se dividió en dos tubos de 50mL y se centrifugó (T=4°C; t= 15 minutos; 15.000rpm). Una vez centrifugados, se procedió a su separación de la siguiente manera:

- 25mL de muestra de saliva se guardaron a -80°C
- 25mL de muestra de saliva que posteriormente se trató con un agente protector de ARN: *RNAprotect Bacteria Reagent* (QIAGEN). Para ello, los 25mL se dividieron en alícuotas (1mL) que se centrifugaron (T=4°C; t=15 minutos; 15.000rpm) para poder separar el sobrenadante del precipitado. En este último, se añadió 1mL del reactivo *RNAprotect Bacteria Reagent* (QIAGEN), con la finalidad de proteger el ARN que contenían las muestras de saliva. Esta mezcla

se guardó a 4°C y se dejó actuar durante una noche. A la mañana siguiente, se llevó a cabo el lavado de las muestras con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a concentración 1X. Las muestras se guardaron a -80°C hasta la posterior extracción del ARN.

Las muestras destinadas al análisis de las diferencias de actividad esterasa en la saliva de individuos con normopeso (n=10) y sobrepeso (n=10) en presencia o ausencia de matrices alimentarias ricas en polifenoles, se centrifugaron (T=4°C; t= 15 minutos; 15.000rpm) para extraer el precipitado de cada una de ellas y se guardaron a -80°C.

### **3.2. Análisis del origen de la actividad esterasa.**

#### **3.2.1. Características de los donantes de saliva.**

La medida de la actividad esterasa se realizó con muestras de voluntarios de 10 donantes con normopeso (IMC: 18,5 – 24,9). Las muestras correspondían a 5 mujeres y 5 hombres, con un rango de edades comprendidas entre 23 y 33 años.

#### **3.2.2. Análisis de la actividad esterasa.**

La medida de la actividad esterasa salival se realizó mediante un método colorimétrico, previamente descrito (25), basado en la hidrólisis del sustrato 4-paranitrofenil-butilato (4-NPB) a 4-nitrofenol. Esta hidrólisis está catalizada por la actividad esterasa de las enzimas salivales y genera un cambio colorimétrico que es medible por absorbancia. El objetivo del análisis era conocer el origen de la actividad esterasa (bacteriano o humano) comprobando si existían diferencias de actividad entre el sobrenadante y el precipitado de las muestras de saliva.

Para generar el cambio colorimétrico, se prepararon los reactivos necesarios para la mezcla de reacción adaptada a muestras de saliva. Dicha mezcla estaba compuesta por el reactivo Tris-HCl 50mM (pH=8) y el tampón *McIlvaine* (pH=5). Se realizó una dilución 1:10 del sustrato 4-NPB 70mM diluido con el tampón *McIlvaine*. La absorbancia se midió en un fotómetro de microplacas *Multiskan™ FC* (*Thermo Scientific*) para medir la absorbancia ( $\lambda$ ) a 405nm cada 5 minutos en un periodo total de 35 minutos a 37°C.

### **3.3. Análisis de la expresión génica.**

#### **3.3.1. Características de los donantes de saliva.**

El análisis de la expresión génica de la enzima acetilesterasa se llevó a cabo con muestras de saliva procedentes de 10 donantes con normopeso. Los voluntarios que participaron en la donación de muestras pertenecían a ambos géneros y el rango de edades comprendía desde los 23 a los 33 años.

#### **3.3.2. Extracción de ARN bacteriano de la saliva.**

Este estudio formaba parte de una nueva línea de investigación, por lo que se realizó la prueba con dos kits de extracción de ARN bacteriano. De esta forma, se quería comprobar cuál de ellos es más eficiente para realizar este proceso en futuras extracciones. Además, se quería comprobar si el uso del reactivo *RNAprotect* era efectivo a la hora de conservar el ARN de las muestras.

##### **3.3.2.1. *E.Z.N.A Bacterial RNA kit***

El primer kit de extracción que se utilizó fue el *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)*. Para ello, se siguió el protocolo descrito, teniendo en cuenta las indicaciones de la casa comercial.

Las muestras de precipitado guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron en hielo y se les añadió  $350\mu\text{L}$  de tampón de lisis OTRK (*Omega Bio-tek*) reconstituido con  $40\mu\text{L}$  de 2-betamercaptoetanol y  $50\mu\text{L}$  de lisozima a  $30\text{mg/mL}$ , para llevar a cabo la lisis química, reconstituida con tampón Tris-EDTA. Este volumen se transfirió a los tubos *FastPrep* que contienen  $50\text{mg}$  de cuentas de vidrio, que proporcionaron una lisis física bacteriana, y se agitaron a máxima velocidad en un *vórtex* durante 5 minutos. Se realizó una incubación en un baño de agua ( $T=30^{\circ}\text{C}$ ;  $t= 10$  minutos). Pasado este tiempo, se realizó una centrifugación ( $t= 5$  minutos;  $13.000\text{g}$ ) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de  $1,5\text{mL}$  estéril, siendo incubado de nuevo en un baño de agua ( $T=70^{\circ}\text{C}$ ;  $t= 5$  minutos). Se volvió a centrifugar ( $t= 2$  minutos;  $13.000\text{g}$ ) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, añadiéndole  $280\mu\text{L}$  de etanol absoluto.

A continuación, en una campana de seguridad P2, se transfirió el volumen a la columna aportada por el kit (*HiBind RNA mini Column*) colocada en un tubo de  $2\text{mL}$  y se centrifugó ( $T=4^{\circ}\text{C}$ ;  $t= 30$  segundos;  $10.000\text{g}$ ). De esta forma, los ácidos

nucleicos quedaron adheridos a la columna. Se añadió tampón de lavado I de ARN y se centrifugó en iguales condiciones. Posteriormente, se añadió tampón de lavado II de ARN y se volvió a centrifugar. Ambos pasos de lavado se repitieron de nuevo. Por último, se añadió agua libre de nucleasas, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó (T=4°C; t= 1 minuto; 10.000g). El proceso se repitió para realizar una segunda elución y el volumen obtenido (100µL) se guardó a -80°C.

### **3.3.2.2. Total RNA Purification kit**

En segundo lugar, se procedió a utilizar el kit de extracción bacteriano *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)*. Se siguió el protocolo redactado, teniendo en cuenta las indicaciones de la casa comercial.

A las muestras de precipitado guardadas a -80°C se les añadió 100µL de lisozima 3mg/mL directamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el tampón RL, para la lisis y homogenización de la muestra, y etanol absoluto. A continuación, en una campana de seguridad P2, se transfirió el volumen a una columna y se centrifugó (T=4°C; t= 3 minutos; 14.5000 rpm). Se añadió tampón de lavado A y se centrifugó en iguales condiciones. Este paso se repitió dos veces más para realizar tres lavados de la muestra. Después, se añadieron 50µL de solución de elución A, se centrifugó (14.500rpm; t=3min; T=4°C) y volvió a repetirse este procedimiento. El volumen obtenido (100µL) se guardó a -80°C.

### **3.3.3. Retrotranscripción del ARN bacteriano de la saliva.**

El proceso de retrotranscripción del ARN da como resultado un ADN complementario (ADNc) a través del cual será posible el análisis de la expresión génica. Este ADNc es necesario para realizar posteriormente la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Para la obtención ADNc, se disolvió un volumen de muestra correspondiente a 1µg de ARN con una mezcla de reacción compuesta por la enzima retrotranscriptasa, los cebadores aleatorios, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), el tampón para la transcripción reversa y agua ultra estéril. Las proporciones de cada compuesto se eligieron según las indicaciones de la casa comercial del kit *High-*

*Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (4368814, *Thermo Fisher Scientific*). La reacción se desarrolló en un termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> *Programmable Thermal Controller*) en las condiciones siguientes: 25°C- 10 minutos; 37°C- 2 horas; 85°C- 5 minutos. El ADNc obtenido se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

#### **3.3.4. Comprobación de la pureza del ARN bacteriano extraído.**

Una vez extraído el ARN bacteriano de las muestras, se cuantificó la pureza del ácido nucleico de interés. La pureza de ARN se midió con un *Nanodrop<sup>TM</sup> One/One<sup>C</sup>* (*Thermo Fisher Scientific*). Para ello, se realiza una doble lectura espectrofotómica a 260nm y 280nm. Esto se debe a que los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción de 260nm y los aminoácidos aromáticos a 280nm. De esta manera, el ratio 260nm - 280nm es un indicador de pureza de las muestras. En condiciones óptimas, dicho ratio debe situarse entre 1,8-2 (26).

#### **3.3.5. Comprobación de la integridad del ARN bacteriano extraído.**

La integridad del ARN extraído se analizó en el equipo *BioAnalyzer 2100* de *Agilent* del Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Dicho equipo se basa en un sistema de electroforesis localizado en un chip microfluídico en el cual se cargaron las muestras de ARN, que son marcadas con una molécula fluorescente y se desplazan a través de microcanales. La detección de fluorescencia fue traducida en imágenes tipo gel y electroferogramas (26). La integridad de la muestra se determina mediante el número de integridad del ARN, denominado RIN, basado en un algoritmo que recoge todo el perfil electroforético. El ratio oscila entre 1 (perfil más degradado) y 10 (perfil intacto).

#### **3.3.6. Diseño de los cebadores degenerados para el gen de la enzima acetilesterasa.**

Con el fin de analizar la expresión génica de una enzima con capacidad esterasa oral, se realizó una búsqueda en bases de datos (*Rhea-Annotated Reactions Database* y *UniProtKB*) y se seleccionó como objetivo la enzima acetilesterasa debido a que era la enzima que más resultados ofrecía y, por tanto, la que más caracterizada estaba. Este diseño se desarrolló utilizando diferentes herramientas bioinformáticas.

En primer lugar, se hizo una búsqueda bibliográfica para saber cuáles eran los géneros mayoritarios presentes en la cavidad oral, siendo *Streptococcus* y *Prevotella* (23, 27). Después, con la base de datos *Integrated Microbial Genomes & Microbiomes* y los criterios de búsqueda *acetilesterase*, *Streptococcus* y *Prevotella* que, teóricamente, desempeñaban la actividad acetilesterasa. Con ello, se realizó un alineamiento, con la herramienta bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, con las secuencias de aminoácidos de las especies seleccionadas para comprobar la homología entre sus secuencias. Esto se hizo con el objetivo de comprobar en la bibliografía si, anteriormente se había caracterizado esa región y, por lo tanto, se conocía su función. Una vez revisado que esto se cumplía, se realizó otro alineamiento en el mismo programa con las secuencias de nucleótidos correspondientes a esos aminoácidos. Como resultado, se obtuvieron las regiones más homólogas entre las secuencias de nucleótidos de las especies cribadas, sirviendo de molde para el diseño del cebador degenerado. Finalmente, utilizando los programas *DNASTAR* y *Primer-BLAST*, se diseñó y comprobó su eficiencia teórica. Además, se continuó con la búsqueda bibliográfica y se seleccionó el cebador que codifica para el gen de la esterasa en *Streptococcus mutans* (SMU) (23) y como control de presencia bacteriana, se seleccionó el cebador *Total Bacteria* (TB) (28), cuyas secuencias aparecen en la tabla 1.

**Tabla 1. Listado de los tres cebadores utilizados para detectar el gen de la enzima acetilesterasa.**

| <i>Gen</i>                  | <i>Símbolo</i> | <i>Secuencia (5'-3')</i>                       |
|-----------------------------|----------------|--|
| <i>Acetilesterasa</i>       |                | YGTNYTSMAVTAYCGBWYGSCD                         |
|                             | ES             | TGDCCVCCDGC MGARAAKC                           |
| <i>Total bacteria</i>       |                | AACGCGAAGAACCTTAC                              |
|                             | TB             | CGGTGTGTACAAGACCC                              |
| <i>Streptococcus mutans</i> |                | TTGTATTTCCAGGGCATGAAACA ACTATCAAAAAATAAAATATTT |
|                             | SMU_118c       | CAAGCTTCGTCATCATGGTTCTTTCCTTAATCCCAAATAGT      |

### **3.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de la saliva.**

La RT-qPCR combina la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una molécula reportera capaz de emitir fluorescencia. De esta forma, se controla la amplificación del molde con una mayor especificidad y sensibilidad (29). La molécula reportera se intercala en el ADN de doble cadena durante la extensión de los cebadores por la acción de la enzima polimerasa (29). El aumento de fluorescencia es registrado por la técnica. Una de las moléculas reporteras más utilizadas para realizar esta técnica es el *SYBR Green*, un compuesto orgánico que se asocia en la doble hélice del ADN, acoplándose energéticamente a los ácidos nucleicos e implementa su emisión de fluorescencia (30). Se trata de una metodología ampliamente utilizada para el análisis de la expresión génica bacteriana.

En este trabajo, se utilizó el ADNc obtenido de la retrotranscripción del ARN bacteriano extraído de las muestras de saliva. Se eligieron aquellas muestras con la mayor concentración detectadas en el *Nanodrop*. La placa diseñada se cargó con una concentración de 50ng/ $\mu$ L de ADNc procedente del ARN con mayor concentración, previamente cuantificada.

Se trabajó con diluciones seriadas (1/10) para comprobar qué concentración de ADNc era la adecuada para la reacción.

La temperatura de hibridación estaba condicionada por el cebador TB, siendo de 52°C. La concentración de los cebadores utilizada fue: 2,5 $\mu$ M para ES y 0,3 $\mu$ M para TB y SMU. Asimismo, se utilizó una muestra de ARN sin retrotranscribir como control de presencia de ADN genómico. La ADN polimerasa utilizada fue la Taq polimerasa y el diseño de la RT-qPCR fue el siguiente:

- Etapa de desnaturalización inicial (T=95°C; t= 20 segundos).
- 40 ciclos de PCR, cada uno de ellos formado por las etapas de desnaturalización (T=95°C; t=15 segundos), etapa de alineamiento (T=52°C; t=30 segundos) y la etapa de elongación (T=72°C; t= 15 segundos).
- Etapa de elongación final (T=60°C; t= 1 minuto).

### **3.4. Diferencias en la actividad esterasa en función del IMC.**

#### **3.4.1. Características de los donantes de saliva.**

La medida de la actividad esterasa se realizó con muestras de voluntarios seleccionados según el sexo, la edad y el índice de masa corporal (IMC). Se reclutaron los siguientes panelistas:

- Normopeso (IMC comprendido entre 19,9 y 23,8): 5 mujeres y 5 hombres.
- Sobrepeso (IMC comprendido entre 25,4 y 32,3): 5 mujeres y 5 hombres.

El rango de edades de los voluntarios comprendía desde los 22 años hasta los 33 años.

#### **3.4.2. Determinación de la actividad esterasa en presencia o ausencia de matrices ricas en polifenoles.**

Se procedió a realizar la medida de la actividad esterasa de las muestras de saliva procedente de los donantes de distinto IMC para observar si existían diferencias de la actividad entre ambos grupos. Además, se quería comprobar si la presencia de polifenoles afectaba a dicha actividad enzimática. Ambas mediciones se realizaron con el precipitado de las muestras, previamente separado del sobrenadante tras una centrifugación y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En primer lugar, se preparó una placa de 96 pocillos en ausencia de polifenoles. Para ello, en cada pocillo, se cargaron los siguientes volúmenes:

- 25 $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50mM
- 74 $\mu\text{L}$  de dilución 1:2 de muestra de saliva
- 25 $\mu\text{L}$  de disolución 4-NPB 1mM + tampón *McIlvaine*

Se procedió a la medida de absorbancia en un fotómetro de microplacas *Multiskan<sup>TM</sup> FC (Thermo Scientific)*, en las condiciones mencionadas anteriormente (apartado 3.2.2).

A continuación, para determinar la actividad esterasa en presencia de polifenoles, se prepararon tres placas de 96 pocillos, cada una de ellas conteniendo una matriz alimentaria. Las matrices alimentarias ricas en polifenoles fueron: té matcha (Drasanvi-Superalimentos), jengibre (El Granero Integral Jengibre BIO Plus) y

*superfruit* (Biotina Superalimentos Premium). La concentración de los polifenoles utilizada fue de 0,75mg/mL, diluido en el reactivo Tris-HCl 50mM. Los volúmenes cargados en los pocillos fueron los mismos que en el caso anterior. La de medida de absorbancia se realizó en el fortómetro microplacas *Multiskan™ FC* (*Thermo Scientific*), manteniendo las mismas condiciones.

Todas las muestras se cargaron en las placas por triplicado, en presencia de un blanco.

### **3.5. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó aplicando el método ANOVA de una vía considerando los factores estudiados:

- Diferencias en actividad esterasa en sobrenadante y precipitado.
- Diferencias en actividad esterasa en personas con normopeso y con sobrepeso.
- Determinación de la inhibición de la actividad esterasa por polifenoles de la dieta.

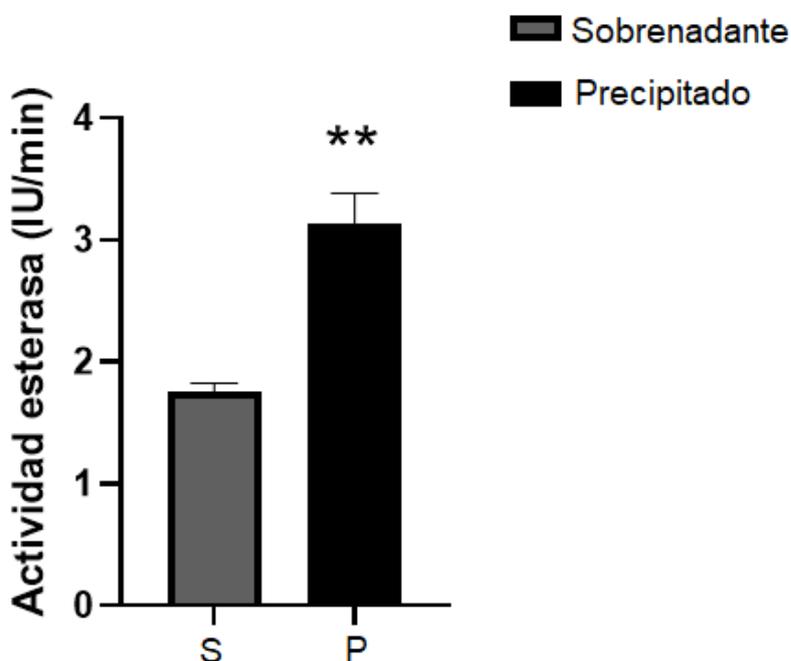
El nivel de significación fue del 95% ( $p < 0,05$ ) y los resultados fueron analizados con el software *GraphPad Prism 8*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Origen de la actividad esterasa.

Con la finalidad de conocer el origen de la actividad esterasa oral, se realizó la medida de dicha actividad en el sobrenadante y el precipitado de las muestras de saliva para observar si había diferencias entre ambas fases.

Los resultados obtenidos tras este análisis, indicaron que existía una actividad esterasa significativamente mayor en el precipitado de las muestras respecto a la fase del sobrenadante de las mismas (figura 4).



**Figura 4. Gráfica comparativa de la actividad esterasa oral en el sobrenadante y el precipitado de saliva.** Los datos representan la medida  $\pm$  ESM. Los asteriscos (\*\*) indican un mayor nivel significativo ( $p < 0,01$ ) de actividad en el precipitado en comparación con el sobrenadante. Actividad esterasa medida en Unidad de actividad enzimática (IU) por minuto.

La mayor actividad esterasa en el precipitado sugiere el origen bacteriano de la misma, ya que esta fase de la muestra presenta una carga elevada de microbiota oral con respecto al sobrenadante.

## **4.2. Análisis de la expresión génica.**

Tras observar la diferencia de actividad esterasa entre ambas fases de la saliva, se procedió a realizar un análisis de la expresión génica en una enzima esterasa de origen microbiano (23). Para llevar a cabo este análisis génico, se utilizaron las muestras que habían sido tratadas con el reactivo *RNAprotect* con el objetivo de conservar las muestras en las mejores condiciones posibles, y con ello el ácido nucleico de interés.

### **4.2.1. Comparación de la eficiencia de extracción de ARN entre los dos kits: *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* y *Total RNA Purification NORGEN Kit*.**

Como se ha comentado anteriormente, este ensayo formaba parte de la puesta a punto de un nuevo protocolo y por ello, se utilizaron dos kits de extracción. Por ello, se procedió a hacer la comparativa entre ambos. Los kits utilizados (*E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* y *Total RNA Purification NORGEN Kit*) presentaban las siguientes diferencias:

- Para el uso del *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* era necesario descongelar previamente las muestras, antes de iniciar con el proceso de extracción. Sin embargo, en el caso del *Total RNA Purification NORGEN Kit* las muestras debían permanecer sin descongelar.
- En el caso del *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* se realizó una lisis física mediante el uso de los tubos FastPrep que contenían cuentas de vidrio, proporcionados por el propio kit. En ambos kits se realizó una lisis química por el uso de la lisozima.
- Las muestras procesadas con el *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* se incubaron dos veces en baños de agua.
- Antes de transferir las muestras a la columna de filtración de ácidos nucleicos, las muestras tratadas con el *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit* se centrifugaron.
- Las muestras extraídas con el *Total RNA Purification NORGEN Kit* se lavaron tres veces con etanol.

Una vez extraído el ARN con ambos kits, se procedió a medir la pureza e integridad del ARN bacteriano extraído, con la finalidad de conocer si:

- La calidad del ARN era viable para seguir trabajando con el ácido nucleico.
- La adición del reactivo RNAprotect cumplió su función protectora sobre las muestras a las que se adicionó.
- Existían diferencias de pureza e integridad entre los ARN extraídos con los diferentes kits.

#### **4.2.1.1. Pureza del ARN extraído.**

La medida de pureza indica la concentración (ng/μL) del ácido nucleico extraído y un ratio de absorbancia 260nm-280nm situado entre 1,8 y 2 señala que los valores de pureza del ARN son óptimos y se encuentran libres de contaminación.

Los datos de pureza de las muestras se obtuvieron mediante el uso de un *Nanodrop<sup>TM</sup> One/One<sup>C</sup>* (Thermo Fisher Scientific). En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados procedentes de las muestras procesadas con ambos kits de extracción de ARN bacteriano.

Las muestras extraídas con el kit *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)* y tratadas con el reactivo *RNAprotect* presentaron una concentración de ARN mayor, como se resalta en la tabla 2, con respecto a las que no se trataron con el reactivo. Estas medidas confirmaron que el uso del reactivo resultó eficaz, ya que ejerció su función protectora y ayudó a la conservación del ácido nucleico. Los valores de absorbancia obtenidos, con un ratio entre 1,97-2,35, indicaron que las condiciones de pureza del ARN eran óptimas para seguir trabajando, siendo además señal de que no había habido contaminaciones durante la manipulación de las muestras. En el caso de la muestra *sin RNAprotect 2*, el valor negativo de concentración pudo deberse a la degradación del ácido nucleico en la muestra. Por tanto, este resultado volvió a confirmar que el uso del reactivo *RNAprotect* era esencial para una buena conservación de las muestras.

**Tabla 2. Medidas de pureza del kit de extracción E.Z.N.A.** Valores de concentración de ARN de las muestras procesadas con *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)*.

| <i>Muestra</i>             | <i>ng/μL</i>   | <i>Absorbancia 260/280nm</i> |
|----------------------------|----------------|------------------------------|
| <i>Sin RNAProtect 1</i>    | 4,220          | 2,359                        |
| <i>Sin RNAProtect 2</i>    | -0,305         | 0,135                        |
| <b><i>RNAProtect 1</i></b> | <b>74,831</b>  | <b>1,976</b>                 |
| <b><i>RNAProtect 2</i></b> | <b>113,713</b> | <b>2,014</b>                 |

Por otro lado, se obtuvieron los valores de pureza de las muestras obtenidas con el kit *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)* (Tabla 3). Los resultados obtenidos en este caso presentaron similitud en las concentraciones de ARN en todas las muestras, independientemente de si habían sido tratadas con el *RNAProtect* o no. Esto pudo deberse a que el protocolo seguido para este kit constaba de menos pasos con respecto al *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)* y no había que descongelar la muestra antes de empezar a añadir los reactivos de lisis. En referencia a los niveles de absorbancia, comprendidos entre 1,93-1,96, se concluyó que el ARN se encontraba libre de contaminaciones.

**Tabla 3. Medidas de pureza del kit de extracción NORGEN.** Valores de concentración de ARN de las muestras procesadas con *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)*.

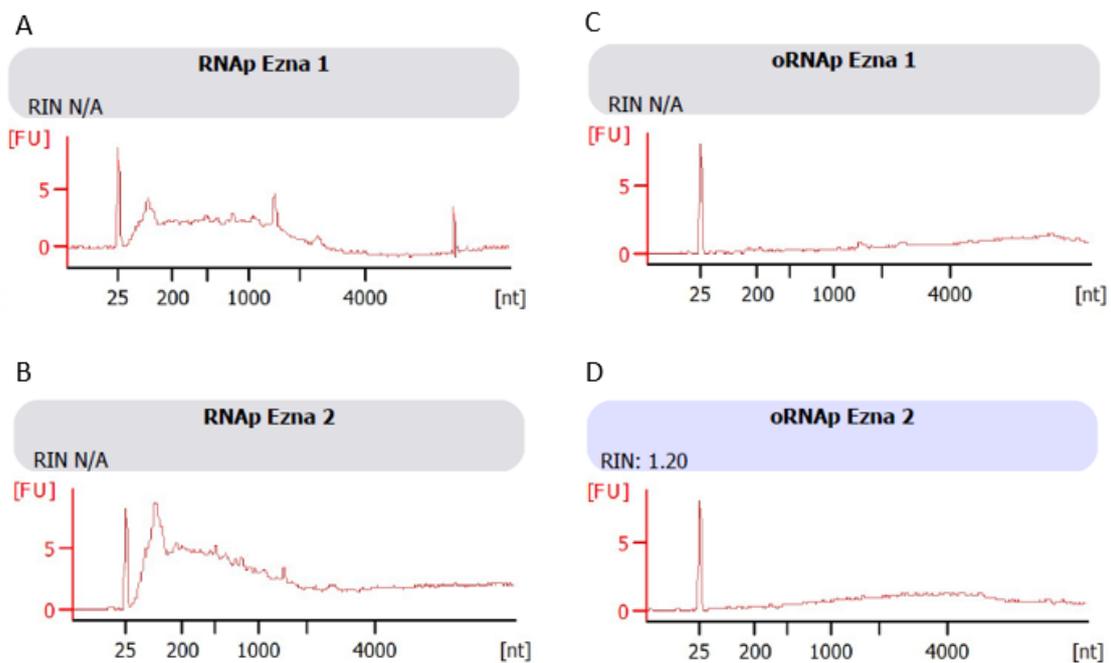
| <i>Muestra</i>             | <i>ng/μL</i>  | <i>Absorbancia 260/280nm</i> |
|----------------------------|---------------|------------------------------|
| <i>Sin RNAProtect 1</i>    | 54,568        | 1,951                        |
| <i>Sin RNAProtect 2</i>    | 43,380        | 1,962                        |
| <b><i>RNAProtect 1</i></b> | <b>65,359</b> | <b>1,940</b>                 |
| <b><i>RNAProtect 2</i></b> | <b>34,576</b> | <b>1,936</b>                 |

#### 4.2.1.2. Integridad del ARN extraído.

La integridad es un indicador de la calidad del ARN extraído. El valor RIN hace referencia a estos valores de integridad, en una escala del 1 (perfil degradado de la muestra) al 10 (perfil intacto de la muestra). La integridad del ARN presente

en las muestras se analizó mediante el equipo *BioAnalyzer 2100* de *Agilent*, que relaciona los ARN ribosómicos (ARNr) y el número RIN.

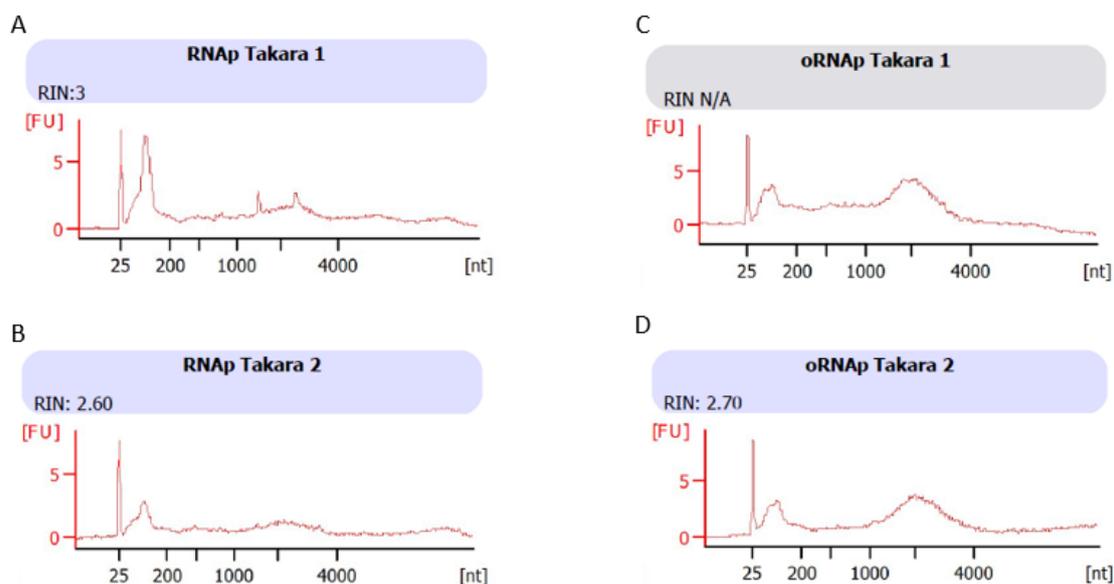
Por un lado, en la figura 5, se muestran los resultados obtenidos del análisis del ARN extraído con el *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)*. En las gráficas 5A y 5B se representan las muestras con *RNAprotect*, cuyo valor RIN: R/A no llegó a ser detectado. En las gráficas 5C y 5D aparecen representadas las muestras sin *RNAprotect*, que de igual manera, no obtuvieron valor RIN o indicaba un perfil de degradación muy elevado (RIN: 1,20). Los diferentes picos que aparecen en las gráficas tendrían que relacionarse con las bandas de las subunidades ribosómicas de procariontas, 16S y 23S, del ARN, lo que indicaría valores de buena integridad.



**Figura 5.** Gráficas obtenidas tras la medición de la integridad de ARN extraídas con *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)*. En las gráficas Ay B se representan los valores obtenidos de las muestras tratadas con *RNAprotect* y en las gráficas C y D los valores procedentes de las muestras no tratadas con dicho reactivo. Representada la fluorescencia [FU] frente al número de nucleótidos [nt].

Por otro lado, en la figura 6, se representan los resultados de integridad de las muestras extraídas con el *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)*. En las gráficas 6A y 6B, muestras con *RNAprotect*, presentan unos valores RIN de 3 y 2,6, respectivamente. A pesar de que en este caso las muestras tengan un

valor RIN mayor, sigue siendo de baja calidad. En las gráficas 6C y 6D, no tratadas con *RNAprotect*, los valores RIN obtenidos son indetectables o siguen presentando valores de integridad muy bajos.



**Figura 6.** Gráficas obtenidas tras la medición de la integridad de ARN extraídas con *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)*. En las gráficas A y B se representan los valores obtenidos de las muestras tratadas con *RNAprotect* y en las gráficas C y D los valores procedentes de las muestras no tratadas con dicho reactivo. Representada la fluorescencia [FU] frente al número de nucleótidos [nt].

El principal motivo de haber obtenido unos valores RIN tan bajos y el hecho de que los picos de las gráficas no coincidan con los esperados, puede deberse a que las medidas se realizaron usando como referencia valores eucariotas en lugar de procariotas. En este caso, el equipo de análisis trataba de reconocer las subunidades ribosómicas de eucariotas (18S y 28S), lo cual no era viable ya que el material que interesaba detectar era el de origen bacteriano.

Teniendo en cuenta todas estas valoraciones, se decidió que las futuras extracciones de ARN se realizarían con el kit *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)*. Aunque los valores de pureza e integridad del ARN extraído con ambos kits eran similares, el *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)* carecía de una lisis física en el proceso de extracción, lo cual impide la extracción total del material genético de interés.

Respecto al uso del reactivo *RNAprotect*, los resultados obtenidos señalan que dicho reactivo es eficaz para una mejor conservación del ARN contenido en las muestras, por lo que también se utilizará siempre en futuros ensayos.

Aun siendo bajos los valores de integridad (RIN), se continuó trabajando con las muestras de ARN extraído con el *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)* al tener unos valores aptos para ser sometidos al siguiente análisis por RT-qPCR.

#### **4.2.2. Puesta a punto de la RT-qPCR para el análisis de la expresión génica de la enzima acetilesterasa.**

Una vez extraído el ARN del precipitado de las muestras, se procedió a detectar la expresión del gen de la enzima acetilesterasa salival, mediante una prueba RT-qPCR. Dicha enzima fue seleccionada al comprobar, mediante el uso de la herramienta bioinformática *Rhea-Annotated Reactions Database*, que la reacción que lleva a cabo estaba descrita. Para la realización de la RT-qPCR, se diseñó un cebador degenerado para la enzima acetilesterasa (ES), se seleccionó un cebador específico para la especie *Streptococcus mutans* (SMU) y un cebador control (TB) para confirmar la presencia de bacterias en el ARN extraído (apartado 3.3.6). Los resultados se describen a continuación.

#### **4.2.3. Comprobación de la efectividad del cebador degenerado diseñado.**

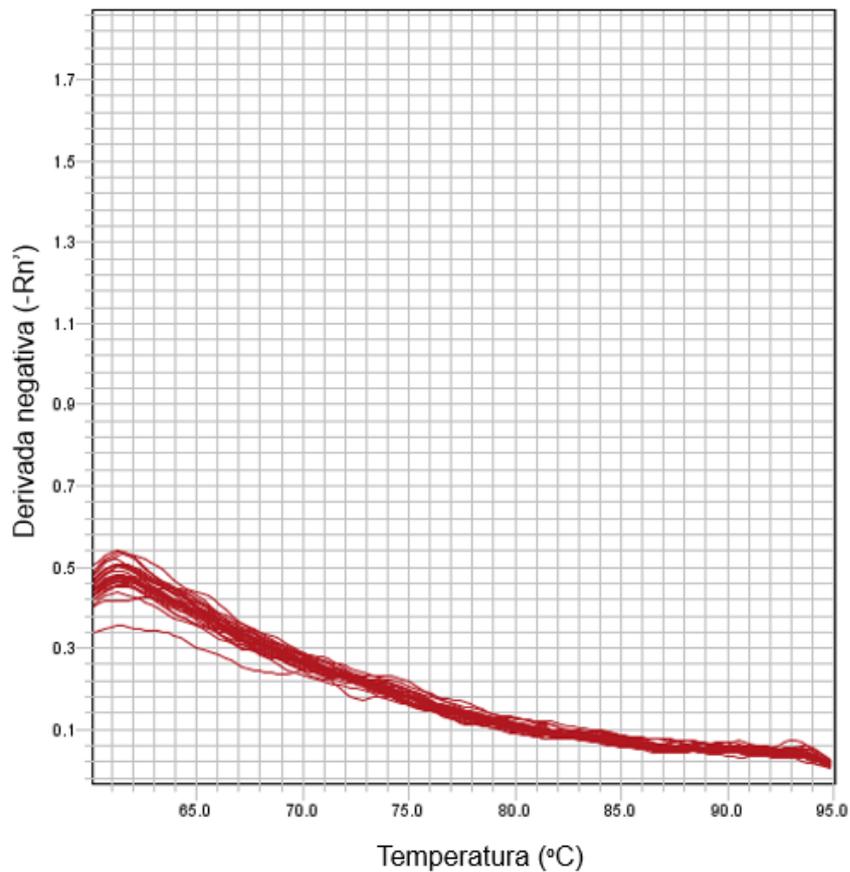
Para comprobar la viabilidad de los tres cebadores seleccionados y ver si se producía expresión génica de la enzima de interés, se realizaron diferentes comprobaciones.

##### **4.2.3.1. Curvas de fusión.**

Las curvas de fusión de las RT-qPCR sirven como indicador de la especificidad del ensayo que se está llevando a cabo. En este caso, se obtuvieron tres curvas de fusión, pertenecientes a cada uno de los cebadores utilizados en la reacción.

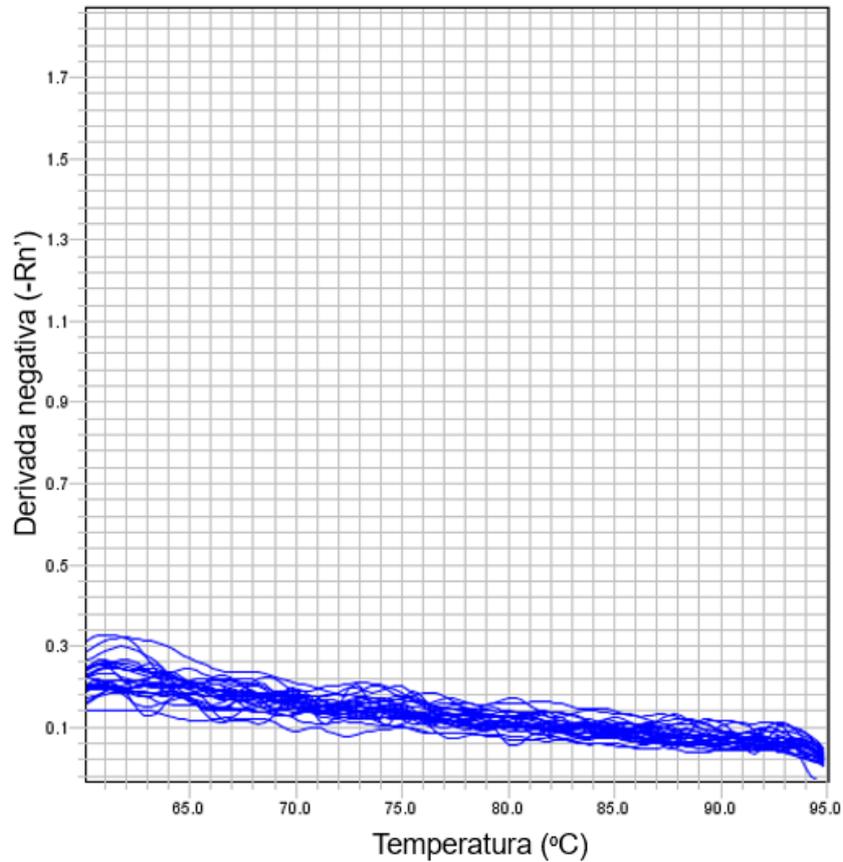
Por un lado, en la figura 7, la curva de fusión obtenida del cebador degenerado ES indicó que no se habían formado productos de reacción y, por lo tanto, que la especificidad del cebador no era la adecuada para producirse la expresión del gen de la acetilesterasa. Esta falta de especificidad pudo deberse al diseño del cebador

degenerado, por lo que debería revisarse la secuencia seleccionada para volver a realizar otra RT-qPCR y comprobar si la especificidad se ve mejorada.



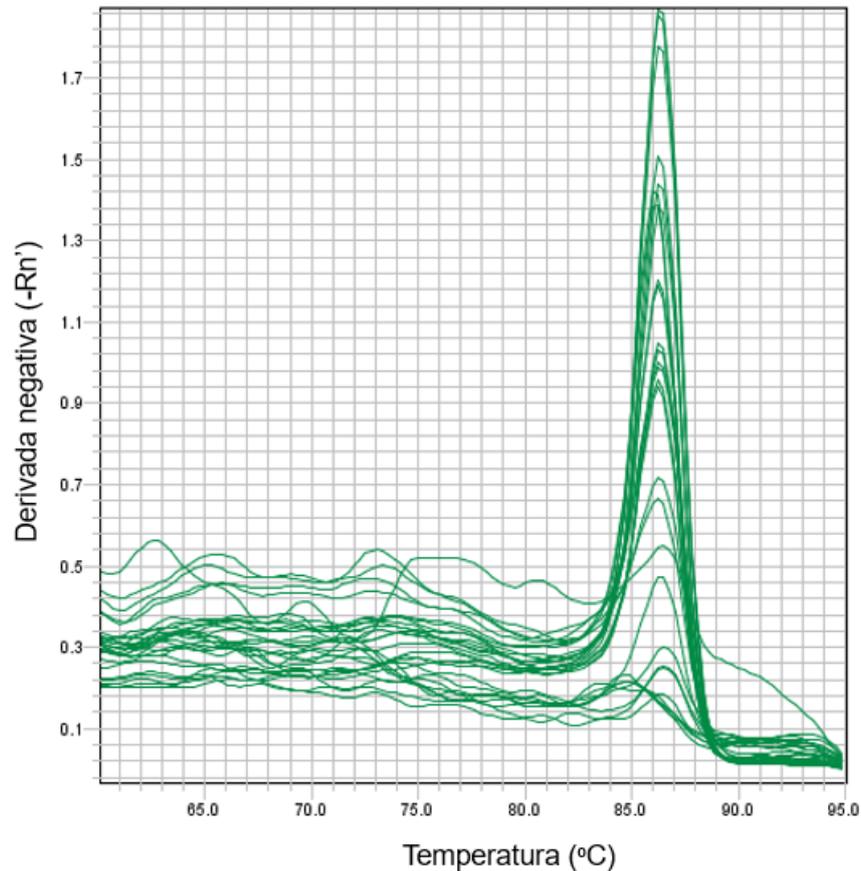
**Figura 7. Curva de fusión del cebador degenerado ES.** Representación de la derivada negativa (-Rn') de la fluorescencia frente a la temperatura (°C).

De igual manera, la curva de fusión perteneciente al cebador específico de *S.mutans*-SMU (figura 8) tampoco resultó ser la esperada. No se observó formación de producto, lo que indicó que la especificidad del cebador tampoco era la adecuada. Esto pudo deberse a que la longitud del cebador SMU era demasiado elevada, lo que dificultó su unión en los fragmentos del ADNc.



**Figura 8. Curva de fusión del cebador SMU.** Representación de la derivada negativa (-Rn') de la fluorescencia frente a la temperatura (°C).

Por último, en la figura 9 se muestra la curva de fusión perteneciente al cebador control de presencia bacteriana (TB) que sí indicó la formación de producto, obteniéndose unas longitudes de onda que reflejan que se ha producido amplificación, lo que confirma que hay presencia bacteriana en las muestras analizadas.

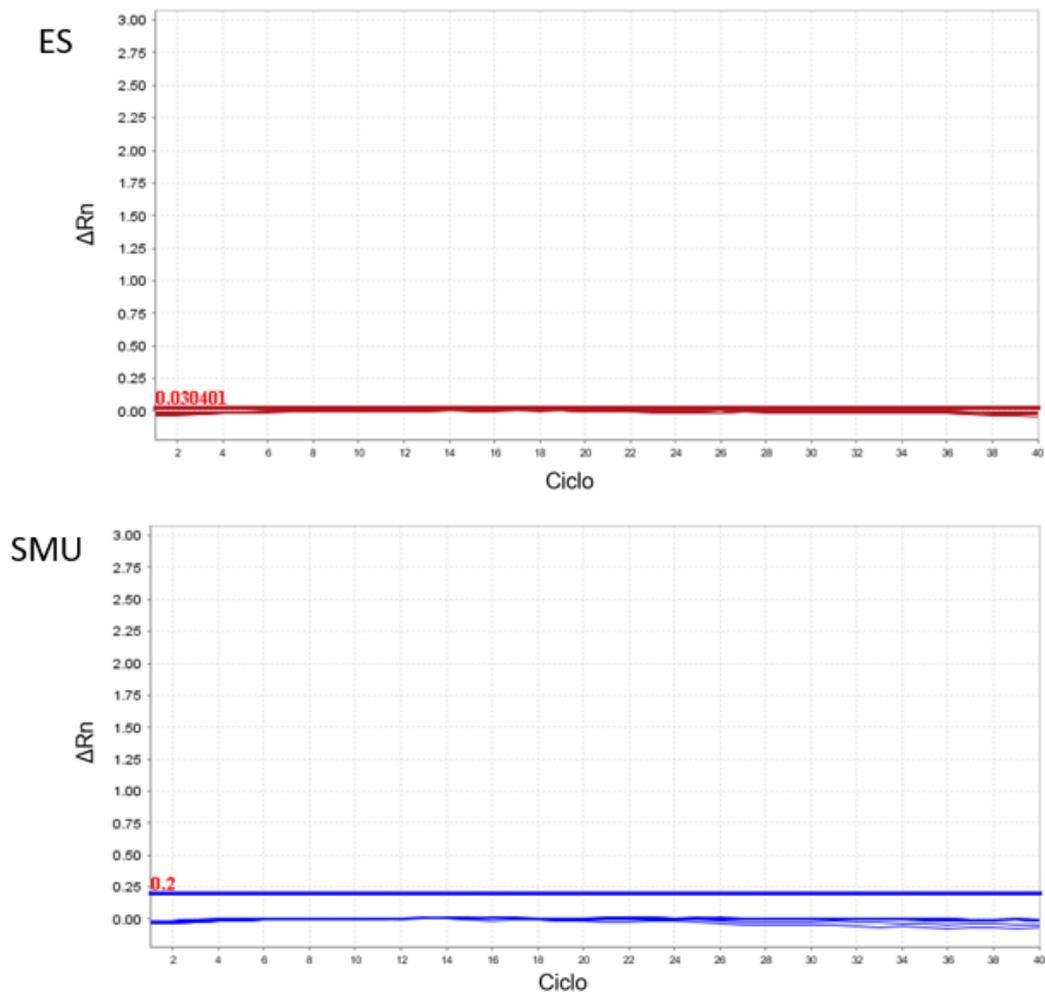


**Figura 9. Curva de fusión del cebador TB.** Representación de la derivada negativa ( $-Rn'$ ) de la fluorescencia frente a la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.2.3.2. Ciclos de la RT-qPCR

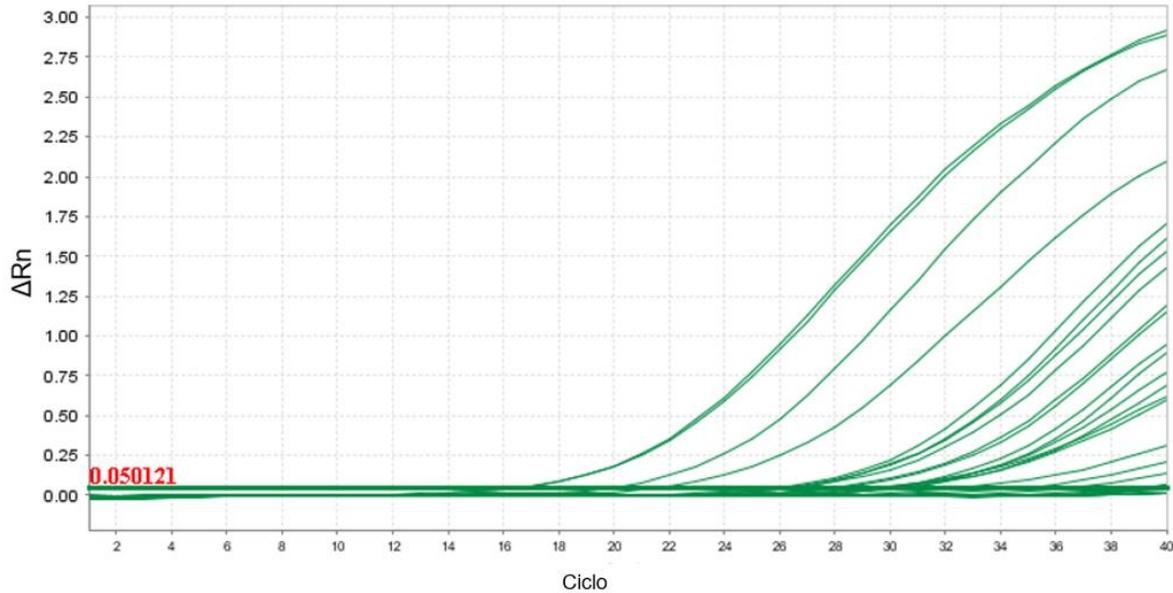
El número de ciclos en la RT-qPCR hace referencia al nivel de expresión del gen de interés de la muestra tratada, generándose una amplificación de la nueva cadena de ADN. La expresión génica es menor conforme avanzan los ciclos de la reacción, lo que se relaciona con una concentración del ácido nucleico es más baja.

En el caso de los cebadores ES y SMU, las gráficas de amplificación (figura 10) no mostraron señales de amplificación. Este suceso pudo deberse a que la temperatura de hibridación elegida ( $T=52^{\circ}\text{C}$ ) era baja para que los cebadores pudieran hibridar con el fragmento de interés. En el caso del cebador ES, su temperatura de hibridación óptima era de  $54^{\circ}\text{C}$  mientras que la del cebador SMU era de  $74^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 10. Curvas de amplificación de los cebadores ES y SMU.** Representación del incremento de la fluorescencia respecto al número de clico.

Por otro lado, en la curva de amplificación obtenida del cebador TB (figura 11), sí mostró amplificación de todas las muestras. El inicio de formación de producto de produjo a partir del ciclo 18, siendo este un valor intermedio con respecto a los 40 ciclos totales. Esto indica que la concentración de ADN era adecuada para llevar a cabo la RT-qPCR. En caso de que la amplificación se produzca en ciclos más bajos, podría suponer una saturación de la técnica.



**Figura 11. Curva de amplificación del cebador TB.** Representación del incremento de la fluorescencia respecto al número de ciclo.

En referencia al número de ciclos, en el caso de las muestras no diluidas mostraron un número de ciclos mayor, lo que significa que el nivel de expresión era más bajo (tabla 4). Sin embargo, conforme las muestras estaban más diluidas, el número de ciclos era menor y por lo tanto, el nivel de expresión era más elevado (tabla 5).

Respecto a la muestra control de ARN no retrotranscrito (tabla 4), amplificó antes que el ADNc. Esto puede estar indicando que la cantidad de ADN genómico arrastrado a lo largo de la extracción era elevada. Asimismo, habría que tener en cuenta que el volumen que se añadió no fue sometido a las diluciones del ADNc, fue añadido directamente al resto de reactivos de la RT-qPCR. Por eso, al encontrarse más concentrado, era más susceptible a expresarse antes.

**Tabla 4. Amplificación del cebador TB y muestra control sin diluir.**

| <i>Muestra</i>    | <i>Cebador</i> | <i>Nº de ciclo</i> |
|-------------------|----------------|--------------------|
| <i>RNApE1 TB</i>  | TB             | 32,592             |
| <i>RNApE2 TB</i>  | TB             | 37,391             |
| <i>NTC RNA TB</i> | TB             | 28,323             |

**Tabla 5. Amplificación del cebador TB con muestras diluidas seriadamente 1/10.**

| <i>Muestra</i>              | <i>Cebador</i> | <i>Nº de ciclo</i> |
|-----------------------------|----------------|--------------------|
| <i>RN<i>Ap</i>1E 10</i>     | TB             | <b>18,640</b>      |
| <i>RN<i>Ap</i>1E 100</i>    | TB             | 21,721             |
| <i>RN<i>Ap</i>1E 1.000</i>  | TB             | 28,022             |
| <i>RN<i>Ap</i>1E 10.000</i> | TB             | 31,941             |

Viendo los resultados obtenidos tras realizar la RT-qPCR, habría que rediseñar la prueba, adaptando las condiciones de trabajo a los cebadores ES y SMU para ver si logran amplificar. Respecto al análisis de la expresión génica llevado a cabo con el cebador control (TB), mostró una adecuada detección de bacterias orales en las muestras de saliva. Sin embargo, los análisis RT-qPCR realizados con los otros dos cebadores (degenerado-ES y específico para *S.mutans*-SMU) para la detección de acetilesterasa bacteriana mostraron que no hubo expresión, lo que podría ser debido a una falta de especificidad de los cebadores y/o una escasez de material genético de las muestras extraídas.

#### **4.3. Diferencia de la actividad esterasa en el grupo con normopeso y el grupo con sobrepeso.**

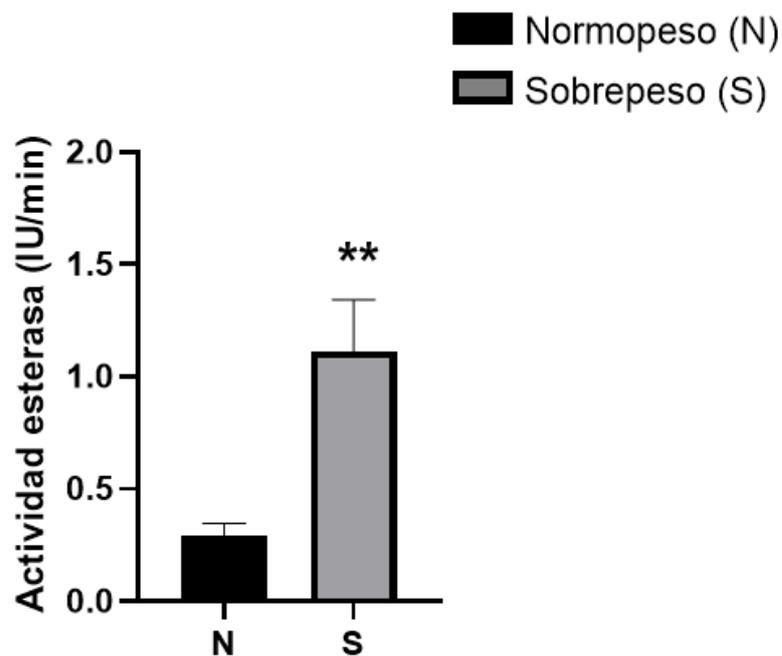
Con el fin de investigar si el IMC influía en la actividad de la enzima esterasa salival, se realizaron medidas de su actividad mediante el método colorimétrico, previamente descrito, en el precipitado de muestras de saliva obtenidas de 10 personas con normopeso y 10 personas con sobrepeso. Ambos grupos estaban equilibrados por género y edad.

En la figura 12, se muestra gráficamente representada la diferencia de la actividad esterasa del precipitado de las muestras salivales pertenecientes a los individuos del grupo normopeso y sobrepeso. Como se puede observar, los valores de actividad esterasa fueron considerablemente más elevados en los panelistas del grupo sobrepeso.

Por lo tanto, estos resultados apoyan a resultados previos que han sugerido que existen diferencias en composición de saliva entre personas con normopeso y personas con

sobrepeso (12). Estos resultados podrían indicar que las personas con sobrepeso, al presentar una mayor actividad esterasa salival respecto a los individuos con normopeso, tendrían un mayor metabolismo oral de ésteres durante el consumo de alimentos y, por tanto, una menor percepción de estos compuestos.

Estas diferencias de composición de saliva entre grupos podrían deberse a la alimentación llevada a cabo por las personas. Como resultado de estudios realizados, se ha observado que dependiendo del tipo de alimentación seguida por los individuos, se secretarán mayores concentraciones de ciertas enzimas salivales. Por ejemplo, la población que lleva a cabo dietas en almidón, presenta una mayor expresión del gen de la amilasa salival (31). Respecto al IMC, se ha comprobado que las personas con normopeso presentan una menor actividad amilasa en comparación con individuos con sobrepeso (12, 11). Estos resultados coinciden con los observados en este trabajo respecto a la actividad esterasa.



**Figura 12. Gráfica comparativa de la actividad esterasa en el precipitado de panelistas con normopeso y sobrepeso.** Los datos representan la medida  $\pm$ ESM. Los asteriscos (\*\*) indican un mayor nivel significativo ( $p < 0,01$ ) de actividad en el grupo sobrepeso respecto al grupo normopeso. Actividad esterasa medida en Unidad de actividad enzimática (IU) por minuto.

#### 4.4. Efecto de la composición de la matriz alimentaria en la actividad esterasa salival en individuos con normopeso y sobrepeso.

El siguiente paso del trabajo fue comprobar si los niveles de actividad esterasa en individuos con normopeso y sobrepeso se veían afectados de manera diferente al interactuar con matrices alimentarias ricas en polifenoles. Para ello, se incubaron los precipitados de saliva de 10 personas con normopeso y 10 personas con sobrepeso con 3 polifenoles diferentes: té matcha, jengibre y *superfruit*.

A continuación, la figura 13 muestra los resultados obtenidos, representando de manera gráfica las variaciones de la actividad esterasa en ambos grupos de IMC.

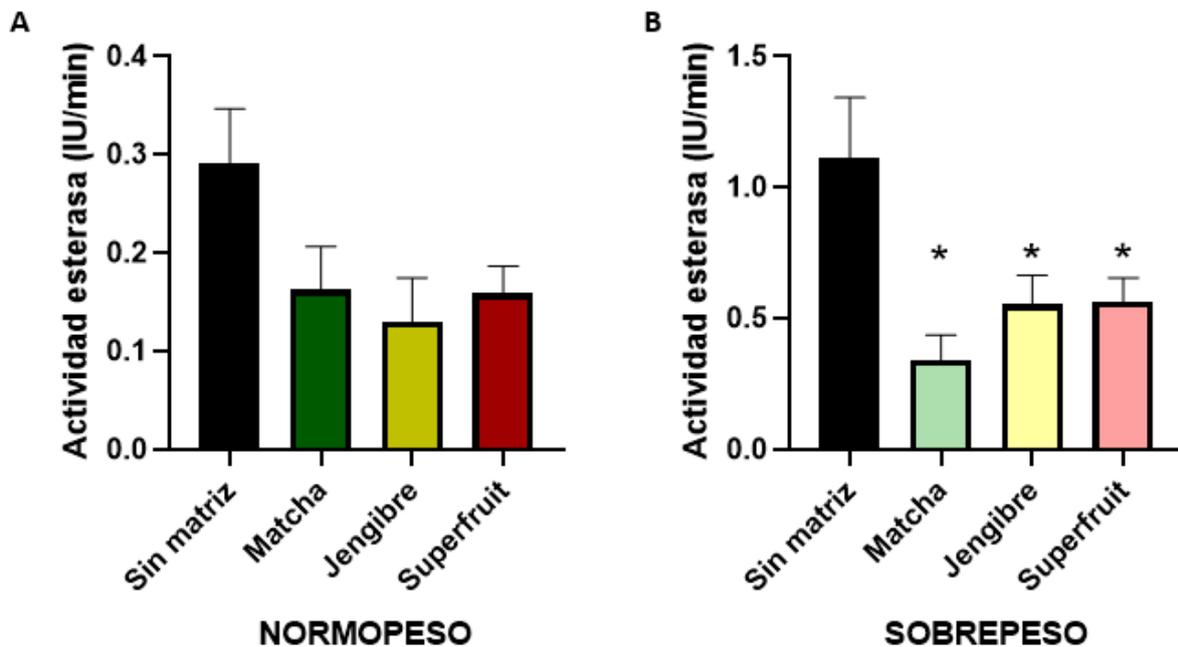
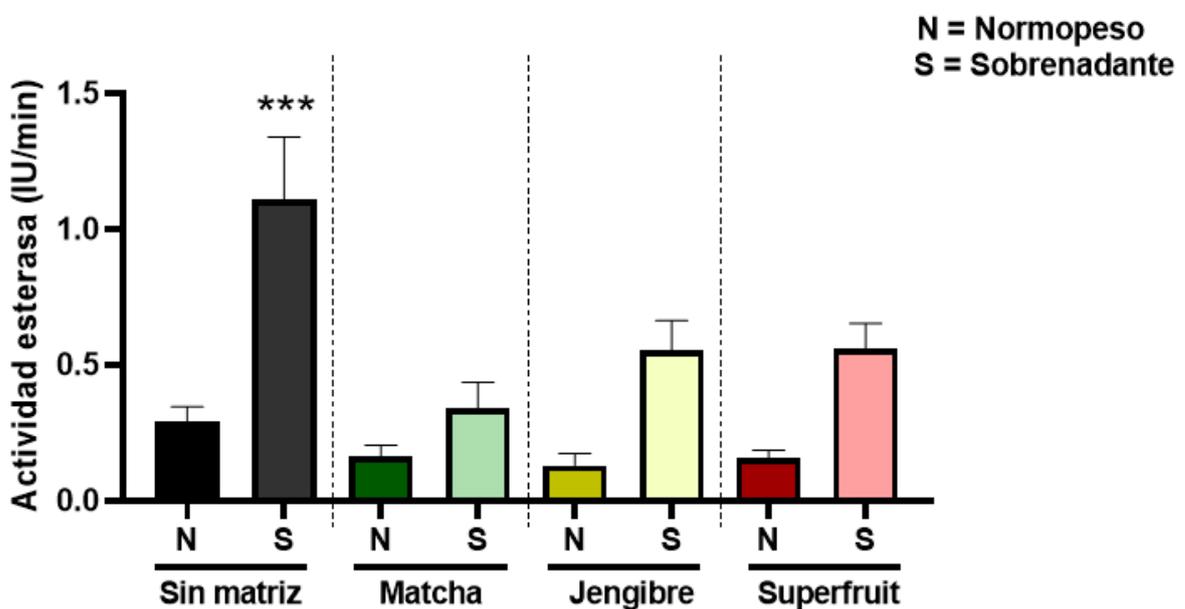


Figura 13. Representación gráfica de los niveles de actividad esterasa salival al interactuar el precipitado de saliva con las matrices alimentarias. En la gráfica A se han representado los valores obtenidos de las muestras de los panelistas con normopeso y en la gráfica B los valores de las muestras de los panelistas con sobrepeso. Los asteriscos (\*) indican una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad esterasa. Actividad esterasa medida en Unidad de actividad enzimática (IU) por minuto.

Como se muestra en las gráficas, la actividad esterasa disminuyó en presencia de polifenoles en ambos grupos IMC. Esta disminución de actividad indica que los polifenoles presentan una capacidad inhibitoria sobre la actividad de la esterasa, coincidiendo con los resultados de trabajos previos ya realizados por otros investigadores (24). Sin embargo, esta disminución fue mucho más marcada para los individuos con sobrepeso, alcanzando la significación estadística ( $p < 0,05$ ) en este solo

caso (gráfica 13B). Así, dicha gráfica muestra que el nivel de actividad esterasa de las muestras incubadas con todos los polifenoles disminuyó significativamente con respecto a la muestra control (sin matriz). De manera interesante, este efecto fue más acusado en la muestra de té matcha, lo que estaría condicionado por su composición de polifenoles.

Con el fin de tener una visión global de las diferentes medidas de la actividad esterasa, se realizó una gráfica representativa con el conjunto de variables integradas (figura 14).



**Figura 14. Representación gráfica de los niveles de la actividad esterasa teniendo en cuenta todas las variables analizadas.** Gráfica global obtenida de la integración de las diferentes características estudiadas (grupos con diferente IMC, medida de actividad sin matriz y con matriz alimentaria). Disminución significativa ( $p < 0,01$ ). Actividad esterasa medida en Unidad de actividad enzimática (IU) por minuto.

La figura 14 permite observar que solo se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de IMC en la muestra incubada sin matriz. Sin embargo, en presencia de polifenoles, no se encontraron diferencias significativas en actividad esterasa salival entre ambos grupos. Los resultados indican que las diferencias de actividad esterasa entre individuos con normopeso y sobrepeso se atenúan en presencia de una matriz rica en polifenoles. Por tanto, la presencia de polifenoles contribuiría a potenciar la

percepción de ésteres, minimizando las diferencias entre personas con distinto IMC. Estos resultados podrían ser el punto de partida para la elaboración de dietas adaptadas sensorialmente para personas con sobrepeso y obesidad.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Fin de Grado han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La actividad esterasa determinada en muestras de saliva (n=10) fue significativamente mayor en el precipitado que en el sobrenadante. La mayor presencia de actividad en el precipitado, formado fundamentalmente por microbiota oral, sugiere que su origen es principalmente bacteriano.
2. La extracción del ARN bacteriano procedente del precipitado de saliva, fue más eficiente en términos de integridad y pureza utilizando el kit *E.Z.N.A Bacterial RNA Kit (R6950-01, Omega Bio-tek)* que el kit *Total RNA Purification Kit (17240-NORGEN Bio-tek)* debido a las diferencias de los protocolos de extracción de ambos kits. Además, se demostró que el uso del reactivo *RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN)* ayudó a una mejor conservación del ARN.
3. El análisis de la expresión génica RT-qPCR llevado a cabo con el cebador control (TB) mostró la adecuada detección de bacterias orales en las muestras de saliva. Sin embargo, los análisis RT-qPCR realizados con los dos cebadores (degenerado-ES y específico para *S.mutans*-SMU) para la detección de esterasa bacteriana mostraron que no hubo expresión, lo que podría deberse a una falta de especificidad de los cebadores y/o a una escasez de material genético en las muestras extraídas.
4. Se observaron diferencias significativas en la actividad esterasa determinada en muestras de saliva procedentes de individuos con normopeso (n=10) y sobrepeso (n=10). Así, los individuos con sobrepeso mostraron una actividad significativamente más alta que los individuos con normopeso. Esta diferencia podría indicar que las personas con sobrepeso ejercían un metabolismo oral de ésteres más elevados que las personas con normopeso, lo que podría influir en el sabor percibido.
5. La presencia de matrices alimentarias ricas en polifenoles (té matcha, jengibre y extracto de *superfruit*®) produjo una disminución en la actividad esterasa salival que fue solo estadísticamente significativa para los individuos con sobrepeso. Esto podría sugerir que la actividad esterasa, y por tanto el metabolismo oral de ésteres

y su percepción, podría modularse de manera individuo-dependiente en presencia de polifenoles. Estos resultados son el punto de partida para la elaboración de dietas adaptadas sensorialmente para personas con sobrepeso y obesidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Canon F, Neiers F, Guichard E. Saliva and Flavor Perception: Perspectives. *J Agric Food Chem.* 1 de agosto de 2018;66(30):7873-9.
2. Filiou RP, Lepore F, Bryant B, Lundstrom JN, Frasnelli J. Perception of Trigeminal Mixtures. *Chem Senses.* 1 de enero de 2015;40(1):61-9.
3. Braud A, Boucher Y. Intra-oral trigeminal-mediated sensations influencing taste perception: A systematic review. *J Oral Rehabil.* febrero de 2020;47(2):258-69.
4. Taylor AJ, Roozen JP. Volatile flavor release from foods during eating. *Crit Rev Food Sci Nutr.* diciembre de 1996;36(8):765-84.
5. Muñoz-González C, Feron G, Canon F. Main effects of human saliva on flavour perception and the potential contribution to food consumption. *Proc Nutr Soc.* noviembre de 2018;77(4):423-31.
6. Muñoz-González C, Rodríguez-Bencomo JJ, Moreno-Arribas MV, Pozo-Bayón MÁ. Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption. *Anal Bioanal Chem.* septiembre de 2011;401(5):1497-512.
7. Muñoz-González C, Pérez-Jiménez M, Pozo-Bayón MÁ. Oral persistence of esters is affected by wine matrix composition. *Food Res Int.* septiembre de 2020;135:109286.
8. Chen J. Food oral processing—A review. *Food Hydrocoll.* enero de 2009;23(1):1-25.
9. Bornhorst GM, Singh RP. Bolus Formation and Disintegration during Digestion of Food Carbohydrates. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* marzo de 2012;11(2):101-18.
10. Mosca AC, Chen J. Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends Food Sci Technol.* agosto de 2017;66:125-34.
11. López-Dávalos PC, Requena T, Pozo-Bayón MÁ, Muñoz-González C. Decreased retronasal olfaction and taste perception in obesity are related to saliva biochemical and microbiota composition. *Food Res Int.* mayo de 2023;167:112660.
12. Mosca AC, Stieger M, Neyraud E, Brignot H, Van De Wiel A, Chen J. How are macronutrient intake, BMI, ethnicity, age, and gender related to the composition of unstimulated saliva? A case study. *J Texture Stud.* febrero de 2019;50(1):53-61.
13. Vandenberghe-Descamps M, Labouré H, Prot A, Septier C, Tournier C, Feron G, et al. Salivary Flow Decreases in Healthy Elderly People Independently of Dental Status and Drug Intake: SALIVARY FLOW DECREASES IN HEALTHY ELDERLY PEOPLE. *J Texture Stud.* agosto de 2016;47(4):353-60.
14. Besnard P, Christensen JE, Bernard A, Collet X, Verges B, Burcelin R. Fatty taste variability in obese subjects: the oral microbiota hypothesis. *OCL.* 2020;27:38.

15. Uchida H, Ovitt CE. Novel impacts of saliva with regard to oral health. *J Prosthet Dent.* marzo de 2022;127(3):383-91.
16. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent.* enero de 2019;80:S3-12.
17. Chauncey HH, Lionetti F, Winer RA, Lisanti VF. Enzymes of Human Saliva: I. the Determination, Distribution, and Origin of whole Saliva Enzymes. *J Dent Res.* junio de 1954;33(3):321-34.
18. Ramírez JR, de I. ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? 2014;15.
19. Muñoz-González C, Feron G, Brulé M, Canon F. Understanding the release and metabolism of aroma compounds using micro-volume saliva samples by ex vivo approaches. *Food Chem.* febrero de 2018;240:275-85.
20. Muñoz-González C, Brulé M, Martin C, Feron G, Canon F. Molecular mechanisms of aroma persistence: From noncovalent interactions between aroma compounds and the oral mucosa to metabolization of aroma compounds by saliva and oral cells. *Food Chem.* marzo de 2022;373:131467.
21. Muñoz-González C, Feron G, Brulé M, Canon F. Corrigendum to “Understanding the release and metabolism of aroma compounds using micro-volume saliva samples by ex vivo approaches” [*Food Chem.* 240 (2018) 275–285]. *Food Chem.* noviembre de 2018;265:85.
22. Pérez-Jiménez M, Rocha-Alcubilla N, Pozo-Bayón MÁ. Effect of saliva esterase activity on ester solutions and possible consequences for the *in-mouth* ester release during wine intake. *J Texture Stud.* febrero de 2019;50(1):62-70.
23. Huang B, Siqueira WL, Cvitkovitch DG, Finer Y. Esterase from a cariogenic bacterium hydrolyzes dental resins. *Acta Biomater.* abril de 2018;71:330-8.
24. Pérez-Jiménez M, Muñoz-González C, Pozo-Bayón MÁ. Specificity of Saliva Esterases by Wine Carboxylic Esters and Inhibition by Wine Phenolic Compounds Under Simulated Oral Conditions. *Front Nutr.* 4 de noviembre de 2021;8:761830.
25. María PJ, Carolina MG, María Ángeles PB. Understanding human salivary esterase activity and its variation under wine consumption conditions. *RSC Adv.* 2020;10(41):24352-61.
26. Anglada M, Prieto R. Gestora Plataforma Genòmica UAT. (01).
27. Kumar N, Lin M, Zhao X, Ott S, Santana-Cruz I, Daugherty S, et al. Efficient Enrichment of Bacterial mRNA from Host-Bacteria Total RNA Samples. *Sci Rep.* 7 de octubre de 2016;6(1):34850.
28. Louis P, Flint HJ. Development of a Semiquantitative Degenerate Real-Time PCR-Based Assay for Estimation of Numbers of Butyryl-Coenzyme A (CoA) CoA Transferase Genes in Complex Bacterial Samples. *Appl Environ Microbiol.* 15 de marzo de 2007;73(6):2009-12.

29. Biochem Molecular Bio Educ - 2021 - Harshitha - Real-time quantitative PCR A tool for absolute and relative quantification.pdf.
30. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. J Fluoresc. julio de 2012;22(4):1189-99.
31. Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. Arch Oral Biol. mayo de 2012;57(5):556-66.

## **7. ANEXOS**

### **ANEXO 1: Reflexión acerca de la aportación del TFG a la sostenibilidad.**

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido conocer la diferencia y modulación de la actividad esterasa teniendo en cuenta las características individuales de las personas y, en concreto, su IMC. Este análisis puede servir de base para entender mejor las diferencias en percepción sensorial entre individuos, lo que influye en sus preferencias alimentarias y, por tanto, en el establecimiento de hábitos alimentarios. La información obtenida en este trabajo puede ser, por tanto, utilizada para la elaboración de dietas personalizadas, adaptadas nutricional y sensorialmente a las necesidades de individuos con sobrepeso y obesidad. Estos individuos generalmente se caracterizan por el consumo de dietas desequilibradas nutricionalmente y con un alto contenido en grasas, azúcares, sodio y proteínas de origen animal. En este sentido, la información generada en este trabajo podría ser utilizada para el diseño de nuevos alimentos saludables y sostenibles, como los enriquecidos en proteínas alternativas (vegetales, leguminosas, insectos o algas) que tuvieran características sensoriales mejoradas y que satisfagan las preferencias alimentarias de los individuos.