



Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas

José Francisco Morales Domínguez
Coordinador



Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas



Generación de hojas y flores a partir de tejido calloso
In vitro de *Cucumis sativus* (pepino) en medio MS.
Foto de José Francisco Morales Domínguez.

Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas

José Francisco Morales Domínguez
Coordinador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas

Primera edición 2022

D.R. © Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria,
Aguascalientes, Ags., C.P. 20100
<https://editorial.uaa.mx/>

D.R. © José Francisco Morales Domínguez (COORDINADOR)

D.R. © Aarón Barraza Celis
Abraham Loera Muro
Ariadna Thalía Bernal Mercado
Carmen Lizette del Toro Sánchez
Carolina Enríquez González
Cindy Damara Anaya Madrigal
Claudia Samantha Díaz de León Gutiérrez
Cristina Garcidueñas Piña
Daniel Alejandro Díaz García
Eugenio Pérez Molphe Balch
Gerardo Castillo Vargas
Gloria Viviana Cerrillo Rojas
Hans Christian Correa Aguado
Jesús Josafath Quezada Rivera
José Francisco Morales Domínguez

Juan Marcos Castro Tapia
Juan Pablo Martínez Vázquez
Julieta Ponce Alonso
Lucia Isabel Chávez Ortiz
Marcela Avendaño González
María de Lourdes de la Rosa Carrillo
María Goretty Caamal Chan
Mariana Georgina Muñoz Carrillo
Mario Alejandro Mejía Mendoza
Mitzy Estefanía Rodríguez Ortega
Nora Lilia Vasco Méndez
Roberto Carlos Valerio García
Ruth Elena Soria Guerra
Sandra Hernández Camacho
Saraí Damaris Dávalos Guzmán

ISBN 978-607-8834-70-9

Hecho en México / *Made in Mexico*

Índice

Introducción	17
Capítulo 1	
Cultivo de Tejidos Vegetales	21
Resumen	21
Conceptos básicos	22
Medios de cultivo para tejidos vegetales	23
Reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas	28
Tipos de cultivos <i>in vitro</i>	32
Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	38
Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales	39
Micropropagación	42
Protocolos	51
Abreviaturas	61
Glosario	62
Bibliografía	62

Capítulo 2	
Propagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal	65
Resumen	65
Cultivo de tejidos vegetales en medios líquidos	66
Biorreactores de inmersión permanente	67
Biorreactores de inmersión temporal	68
Sistema de tanques gemelos	68
Estableciendo un protocolo de micropropagación en sistemas de protocolos	69
Protocolos	71
Abreviaturas	74
Bibliografía	74

Capítulo 3	
Análisis de compuestos fitoquímicos	77
Resumen	77
Fitoquímica	78
Métodos de identificación	79
Metabolitos secundarios	81
Biotecnología vegetal como una alternativa	87
Protocolo	97
Abreviaturas	101
Glosario	101
Bibliografía	102

Capítulo 4	
Aceites esenciales como potenciales nutraceuticos	107
Resumen	107
Introducción	108
Fuentes y Composición de Aceites Esenciales	110
Técnicas de Extracción de Aceites Esenciales	113
Propiedades Bioactivas de Aceites Esenciales con Potencial Nutraceutico	117

Protocolos	134
Abreviaturas	137
Bibliografía	138

Capítulo 5

Síntesis Verde de Nanopartículas	145
Resumen	145
Introducción	146
Síntesis de nanopartículas	147
Caracterización de las nanopartículas	150
Las nanopartículas como antimicrobianos	151
Protocolos	155
Abreviaturas	159
Glosario	160
Bibliografía	161

Capítulo 6

Filogenética de Plantas Basada en Secuenciación de Nueva Generación	165
Resumen	165
Antecedentes	166
Secuenciación masiva de datos	167
Método RAD-seq	168
Filogenética de poblaciones de <i>Bouteloua gracilis</i> (Chloridoideae: Poaceae)	170
Muestreo y análisis de datos	170
Protocolo	173
Glosario	175
Bibliografía	176

Capítulo 7

Fitorremediación	179
Resumen	179
Introducción	180
Contaminación por metales pesados	180
Plantas y metales pesados	181
Estrategias de remediación	182
Fitorremediación	182
Fitoextracción	184
Fitodegradación	184
Fitovolatilización	185
Rizorremediación	185
Mejoras en la capacidad de fitorremediación	186
Leguminosas en la fitorremediación	188
Protocolo	188
Abreviaturas	191
Glosario	191
Bibliografía	193

Capítulo 8

PCR y diseño de oligonucleótidos	195
Resumen	195
Introducción	196
Componentes para la PCR	196
Diseño de oligonucleótidos	197
Proceso de la PCR	199
Tipos de PCR más utilizados	200
PCR anidada	201
PCR múltiple	202
RT-PCR	204
PCR en tiempo real o cuantitativa	206
PCR touchdown	207
RACE	207
Protocolos	208

Abreviaturas	212
Glosario	212
Bibliografía	214
Capítulo 9	
Péptidos antimicrobianos de plantas	219
Resumen	219
Introducción	220
PAMs reportados en plantas	220
Clasificación de PAMs	224
Mecanismos de acción de PAMs	231
Tecnología del DNA recombinante para la producción de PAMs	234
Algunas estrategias para la predicción, diseño y producción de PAMs	241
Análisis bioinformático. ¿Cómo buscar PAMs candidatos?	241
Bibliografía	251
Capítulo 10	
Expresión genética en plantas; transcriptomas y miARNs	255
Resumen	255
Introducción	256
Métodos para analizar la expresión del gen	261
Transcriptomas	262
Pasos para la construcción de un transcriptoma	264
Ejemplos de transcriptomas de novo y diferenciales	268
Los miARN y la regulación genética	269
Construcción de Bibliotecas de miARN	272
Los miARN en el fruto de guayaba	277
Protocolo	278
Glosario	280
Abreviaturas	281
Bibliografía	282

Capítulo 11	
Estudio del estrés abiótico en plantas	285
Resumen	285
Antecedentes	286
Compuestos bioquímicos y moleculares como respuesta	288
Estrés por calor	290
Genes relacionados con el estrés por calor	290
Estrés por frío	292
Estrés por sequía	293
Estudios moleculares de los genes LEA	296
Estrés por salinidad	296
Respuesta de las plantas ante salinidad	297
Identificación de genes al estrés abiótico en <i>Suaeda edulis</i> : un caso de estudio	301
Protocolos	304
Abreviaturas	305
Glosario	305
Bibliografía	306

Capítulo 12	
Transformación genética de plantas	313
Resumen	313
Introducción	314
Métodos para la transformación genética de células vegetales	317
Métodos biológicos	317
Métodos físicos	327
Biobalística	327
Sistemas de transformación en planta	328
Otros sistemas de transformación genética	330
Selección de los tejidos o plantas transformados	331
Protocolos	333
Abreviaturas	337
Bibliografía	338

Capítulo 13	
Estudio y bioinformática de Proteínas	343
Resumen	343
Aminoácidos: bloques constructores de las proteínas	344
Enlace Peptídico	348
Importancia y funciones de las proteínas. Aspectos nutricionales de las proteínas	349
Niveles estructurales de las proteínas	351
Ejemplos funcionales de algunas proteínas	561
Maduración de proteínas después de la traducción	365
Relación entre estructura y función (actividad biológica). Estructura nativa y desnaturalización	367
Proteómica	368
Bioinformática de proteínas	369
Análisis bioinformático	370
Protocolos	379
Bibliografía	386

Capítulo 14	
Estudio de metagenomas en plantas	389
Resumen	389
Introducción	390
Funciones de las comunidades microbianas asociadas a las plantas	392
Interacciones entre las plantas y su microbioma.	394
La metagenómica y la Secuenciación de Nueva Generación (NGS)	397
Análisis bioinformático	399
Plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS)	399
Productos de la secuenciación NGS	400
Procesamiento de los “reads” y control de calidad (QC)	401
Procesamiento de “reads” y generación de tablas de OTUs	404

Análisis de diversidad ecológica microbiana	407
Protocolos	411
Toma de muestras	411
Extracción de ADN	413
Secuenciación de Nueva Generación	415
Análisis bioinformático en MG-Rast	417
Abreviaturas	420
Glosario	421
Bibliografía	422

Capítulo 15

Producción de lípidos en microalgas	427
Resumen	427
Introducción	428
Biosíntesis de lípidos en microalgas	430
Condiciones para estimular la producción de lípidos	434
Limitación de nutrientes	435
Déficit de nitrógeno	435
Sobreexpresión de genes y factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de lípidos	448
Aplicaciones de los lípidos producidos en microalgas	451
Protocolo	455
Cuantificación de lípidos totales	455
Saponificación	456
Cuantificación de lípidos neutros	457
Abreviaturas	459
Glosario	461

Capítulo 16

Ficorremediación	479
Resumen	479
Introducción	480
Microalgas utilizadas para la remoción de metales pesados	480

Microalgas utilizadas para la remoción de fármacos	483
Microalgas utilizadas para la remoción de compuestos fenólicos	485
Abreviaturas	486
Glosario	487
Bibliografía	488

Capítulo 17

Transformación genética de microalgas	495
Resumen	495
Introducción	496
Protocolos	503
Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	528
Abreviaturas	534
Glosario	536
Bibliografía	538



Introducción

Como humanidad vivimos hoy día una época de grandes retos, mismos que nos exigen cambios profundos en nuestros modelos de desarrollo y en la forma como explotamos los recursos del planeta, esto si es que queremos enfrentarlos y superarlos. Muchos de estos retos tienen que ver con asuntos de índole política, económica y social, y deberán ser atendidos en esos ámbitos. Otros retos, igual o más importantes, tienen que ver con sistemas productivos y la manera de aprovechar racionalmente los recursos naturales. Es en éstos en los que la ciencia y el desarrollo tecnológico pueden tener un papel crucial. Algunos de los asuntos más apremiantes que deben resolverse en el corto plazo son la pérdida de la biodiversidad, la necesidad de sistemas productivos más limpios y amigables con el ambiente, la urgencia de enfrentar el cambio climático con cultivos capaces de adaptarse y producir alimentos y materias primas suficientes y de

calidad bajo este contexto, y la necesidad de encontrar estrategias y principios activos que nos permitan enfrentar de manera más eficiente los problemas de salud que afectan a la mayoría de la población. De no resolverse estos problemas será imposible mantener e incrementar el nivel de vida de las sociedades humanas, esto desde el ámbito local hasta el global.

La biotecnología vegetal es una disciplina de reciente desarrollo que podría convertirse en una herramienta crucial para enfrentar los problemas mencionados. Los sistemas de cultivo, conservación y propagación masiva *in vitro* de vegetales pueden ser vitales para la conservación y uso racional de la Biodiversidad en el corto y mediano plazo. Además, a través de sistemas de cultivo y producción *in vitro* se pueden obtener metabolitos vegetales de alto valor sin necesidad de sacrificar plantas tomadas de su hábitat natural. Por otro lado, las técnicas de Ingeniería Genética permiten la modificación o edición del genoma de las plantas y microorganismos relacionados, esto con el fin de producir en estos sistemas compuestos químicos de alto valor que no forman parte de manera natural de su bioquímica. De esta forma, las plantas o microorganismos se pueden convertir en “fábricas” que sólo requieren de agua, minerales y luz solar para generar productos de alto valor. Esto en un proceso que no solo no genera CO₂, sino que lo consume de la atmósfera. Los bioplásticos son un ejemplo de productos que se podrían producir de esta manera. Por otro lado, estas mismas herramientas de manipulación genética pueden generar, de forma mucho más rápida que cualquier otra técnica, cultivos adaptados y capaces de producir alimentos y materias primas bajo el contexto del cambio climático. Esto se puede lograr, por ejemplo, localizando genes que confieren resistencia en plantas naturalmente adaptadas a ambientes secos y cálidos, y llevándolos a cultivos de interés comercial. Finalmente, la biotecnología puede generar procesos que nos permitan el uso de organismos vivos para indicarnos la presencia de agentes potencialmente tóxicos en el ambiente, e incluso usar también organismos vivos para limpiar el ambiente de estos contaminantes.

Esta obra, denominada “Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas”, nos presenta una visión actual de muchas de las técnicas de reciente desarrollo dentro de la biotecnología. Esto a través de una serie de capítulos elaborados por investigadoras e investigadores conocedores de cada tema, procedentes de varias instituciones de prestigio. Además, los capítulos están enriquecidos con protocolos que pueden guiar a los interesados en el

desarrollo y aplicación de estas tecnologías. Esta obra está dirigida a estudiantes de pre y posgrado, docentes e investigadores interesados en el campo de la biotecnología aplicada a los vegetales y a las algas.

Los dos primeros capítulos, 1. Cultivo de tejidos vegetales y 2. Propagación de plantas por inmersión temporal, nos presentan un panorama general de las técnicas que ahora nos permiten propagar, mejorar y conservar plantas en sistemas de cultivo artificiales. Estas herramientas son hoy en día fundamentales para la conservación y uso racional de la biodiversidad, esto además de la importancia comercial que los sistemas de producción masiva de plantas, o de compuestos derivados de las mismas, por cultivo de tejidos tienen hoy en día.

Otra serie de capítulos hablan sobre el estudio y aprovechamiento de compuestos químicos producidos por plantas, lo cual es de gran interés para áreas como la salud y nutrición. En este grupo se ubican los capítulos 3. Análisis de compuestos fitoquímicos y 4. Aceites esenciales como potenciales nutraceuticos. Otro tema de importancia que se toca es el uso de plantas o algas como plataformas para la producción de moléculas o compuestos de alto valor. Esto se trata en los capítulos 5. Síntesis verde de nanopartículas de plata y 15. Producción de lípidos en microalgas.

Una de las aplicaciones más interesantes de la biotecnología es la manipulación genética de organismos unicelulares o de plantas con el fin de hacerlas más resistentes ante factores ambientales adversos, o bien darles la capacidad de producir moléculas propias de otros organismos. Este es un tema que se trata en varios de los capítulos de esta obra, tanto desde el punto de vista de las bases de esta metodología, como ya de aplicaciones muy puntuales de esta manipulación a través de ingeniería genética. Este es el caso de los capítulos 13. Proteínas en plantas y Bioinformática de proteínas, 10. Expresión de genes en plantas, 11. Identificación y estudio de genes de estrés abiótico, 12. Transformación genética de plantas, 9. Producción de péptidos antimicrobianos recombinantes provenientes de plantas en sistemas bacterianos, 8. Diseño de oligonucleótidos y PCR, y 17. Transformación genética de microalgas.

La biotecnología no sólo se orienta a la resolución de problemas prácticos o al desarrollo de sistemas productivos. También puede constituirse en una herramienta que nos permita general conocimiento básico y comprender mejor la evolución y funcionamiento de las plantas y de otros organismos. En este sentido, los capítulos 6. Filogenia de plantas y 14. Estudio de metagenomas

en plantas, nos hablan del uso de técnicas de vanguardia con el fin de generar conocimiento en estos campos.

Finalmente, la biotecnología puede también contribuir al manejo adecuado del medio ambiente, llegando incluso a proponer soluciones para remediar entornos ya deteriorados por la actividad humana. Este es el tema que se maneja en los capítulos 7. Fitorremediación y 16. Ficorremediación.

Eugenio Pérez Molphe Balch

Capítulo 1

Cultivo de Tejidos Vegetales

Eugenio Pérez Molphe Balch
Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Resumen

El cultivo de tejidos vegetales consiste en un conjunto de técnicas que permiten mantener y desarrollar células, tejidos, órganos o individuos completos, en un ambiente artificial y bajo condiciones controladas. Esta disciplina tiene aplicaciones muy importantes hoy en día, como la micropropagación de plantas de alto valor, la producción *in vitro* de metabolitos vegetales y otras. Además de esto, puede ser la base para otras aplicaciones biotecnológicas como la generación de plantas transgénicas y la producción de proteínas recombinantes en sistemas basados en células vegetales. En este capítulo se presentan los conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales y se describen los medios y sistemas de cultivo que se emplean. Se incluye información sobre el uso de los reguladores del crecimiento vegetal o fitohor-

monas en el contexto de esta tecnología, así como el proceso de desinfección de los tejidos con el fin de establecer cultivos *in vitro*. Finalmente, se presentan algunas de las aplicaciones más importantes de esta tecnología, con énfasis en la regeneración *in vitro* y la micropropagación. Se incluyen protocolos completos para la preparación de medio de cultivo, la desinfección de tejidos para el establecimiento de cultivos *in vitro* y la micropropagación de algunas especies ornamentales.

Conceptos básicos

El cultivo de tejidos vegetales es una de las disciplinas más ampliamente usadas dentro de la Biotecnología Vegetal. Consiste en un conjunto de técnicas que permiten mantener y desarrollar células, tejidos, órganos o individuos completos, en un ambiente artificial y bajo condiciones controladas. Esto se hace en recipientes cerrados, la mayoría de las veces aislados por completo del medio externo, los cuales contienen un medio de cultivo artificial especialmente formulado para el tipo de tejido y de desarrollo que se busca en el mismo. Estos recipientes se incuban bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Una condición básica para que estos sistemas de cultivo funcionen es mantener en los mismos un ambiente axénico, es decir, libre de cualquier microorganismo contaminante.

Al segmento de tejido vegetal que se utiliza para iniciar un nuevo cultivo se le llama explante. El tipo de explante a utilizar varía dependiendo de la respuesta que se busque, pero de manera general los tejidos jóvenes se adaptan más fácilmente y responden mejor a las condiciones de cultivo *in vitro*. El tipo de desarrollo o respuesta que se obtenga en un cultivo depende de la interacción del explante inoculado con el medio de cultivo. Si esta interacción no es la adecuada, la respuesta observada será la necrosis o muerte del tejido. Sin embargo, si el explante se adapta al medio de cultivo y las condiciones de incubación son correctas, se iniciará la división celular y se podrán observar diferentes tipos de respuestas. Una de ellas es la generación de tejido calloso, el cual está constituido por masas de células que se dividen rápidamente, pero manteniéndose en un estado indiferenciado, sin formar tejidos u órganos reconocibles. Otra respuesta frecuente es el desarrollo del tejido. En este caso, el explante, al adaptarse a las condiciones *in vitro*, continuará desarrollándose,

siguiendo el mismo patrón que tendría dicho tejido en la planta completa en condiciones naturales. Por ejemplo, una yema brotará y producirá una nueva rama, una raíz continuará creciendo como tal o una semilla germinará y generará una plántula. Otro tipo de respuestas implican una alteración de los patrones normales del desarrollo. Ejemplos de estas respuestas son la organogénesis y la embriogénesis somática. En el primer caso, algunas de las células del explante se rediferencian produciendo estructuras que en condiciones naturales no se generarían en el tejido original. Estas estructuras pueden ser raíces o brotes adventicios. En la embriogénesis somática, ciertas células contenidas en el tejido se desdiferencian hasta llegar a un estado similar al cigoto. Posteriormente se rediferencian hasta formar un embrión completo, pasando por etapas muy similares a las de embriogénesis que ocurre en condiciones naturales. Sin embargo, estos embriones no proceden de un proceso de fecundación, sino que se originan de células somáticas y son genéticamente iguales a la planta madre. Estos embriones somáticos pueden germinar y convertirse en plantas completas. La organogénesis y la embriogénesis somática pueden ocurrir directamente sobre el explante inoculado en el medio de cultivo, o bien en un cultivo ya establecido de tejido calloso al que se le altera la composición del medio u otras condiciones de cultivo. En el primer caso se les denomina organogénesis o embriogénesis somática directas, mientras que cuando se pasa por una etapa de tejido calloso se les llama indirectas.

Muchas de las respuestas de los tejidos al cultivo *in vitro*, como las antes mencionadas, se deben a la adición al medio de fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal. Los más usados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, y en menor medida se usan las giberelinas y el ácido abscísico. El cultivo de tejidos vegetales tiene varias aplicaciones, mismas que se discutirán más adelante.

Medios de cultivo para tejidos vegetales

La formulación adecuada del medio de cultivo es un elemento fundamental para el éxito del cultivo de tejidos vegetales. El medio debe aportar todos los elementos inorgánicos y moléculas orgánicas que son necesarias para mantener vivo al tejido, y además debe contener compuestos que promuevan el desarrollo del tejido en las condiciones *in vitro*, siendo los más importan-

tes en este grupo los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas. En la actualidad se han formulado y reportado en la literatura una gran cantidad de medios de cultivo diferentes. Cada uno de ellos difiere de los demás en aspectos como cantidad total de solutos (fuerza iónica), forma de suministrar el nitrógeno, cantidad y forma de suministro de macro y micronutrientes, fuente de carbono y vitaminas y otras moléculas orgánicas incluidas. Algunos medios de cultivo se consideran de uso general, ya que son aptos para una amplia gama de especies y procesos. Este es el caso de los medios de Murashige y Skoog (MS), Linsmaier y Skoog (LS) y Gamborg (B5). Por otro lado, hay medios desarrollados para un tipo de planta o un proceso en específico. Por ejemplo, los medios de Lloyd y McCown (WPM) y el de Driver y Kuniyuki (DKW) se recomiendan para especies leñosas, mientras que el medio de Nitsch y Nitsch (NN) se diseñó para el cultivo de anteras para la generación de plantas haploides.

No obstante, hay una gran cantidad de medios de cultivo diferentes reportados en la literatura especializada, todos éstos contienen los siguientes grupos de compuestos:

a) Macronutrientes minerales:

Son los iones que la planta en condiciones normales toma del suelo y son requeridos en concentraciones de medias a altas.

Elemento	Cantidad presente en los medios de cultivo	Formas de suministrarlo
Nitrógeno (N)	25 - 60 mM	Nitrato (NO_3^-) en concentraciones de 25-40 mM y/o de amonio (NH_4^+) en concentraciones de 2-20 mM. La proporción entre estas dos formas de nitrógeno es una variable importante para considerar cuando se experimenta con diferentes medios de cultivo. El suministro de nitrógeno puede complementarse con alguna fuente de nitrógeno orgánico, principalmente en forma de aminoácidos.
Fósforo (P)	1 - 3 mM	Se suministra en forma de fosfatos de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o potasio (KH_2PO_4).

Elemento	Cantidad presente en los medios de cultivo	Formas de suministrarlo
Potasio (K)	20 - 30 mM	Se suministra en forma de nitrato (KNO_3), fosfato (KH_2PO_4) o cloruro (KCl).
Calcio (Ca)	1 - 3 mM	Es adicionado en forma de cloruro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o de nitrato [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$].
Magnesio (Mg)	1 - 3 mM	Es suministrado como sulfato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
Azufre (S)	1 - 3 mM	Se adiciona al medio de cultivo como sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Los sulfatos de manganeso, zinc, cobre y fierro suelen usarse como fuente de micronutrientes.

b) Micronutrientes minerales:

Además de los macronutrientes antes mencionados, tanto las plantas normales como los tejidos cultivados *in vitro* requieren de otros elementos inorgánicos en concentraciones generalmente mucho menores. Estos son fierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co) y yodo (I). Las concentraciones de estos micronutrientes van de 0.1 hasta 100 μM , a excepción del Fe que se requiere en cantidades mayores (1 mM). Este elemento suele ser problemático por su tendencia a precipitar, por lo que normalmente se suministra en forma quelada con EDTA, o bien como citrato o tartrato de fierro.

c) Fuente de carbono:

Las plantas en condiciones naturales utilizan el CO_2 atmosférico como fuente de carbono para la síntesis de carbohidratos, esto mediante la fotosíntesis. Posteriormente, usan estos carbohidratos como precursores para la síntesis del resto de las moléculas orgánicas que requieren. Sin embargo, los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tienen una capacidad fotosintética muy reducida o nula. Esto se debe en gran medida a la limitada concentración de CO_2 en los recipientes de cultivo y a la también baja intensidad luminosa en que son mantenidos. Esto además de que muchos de los tejidos que se cultivan *in vitro* no contienen células con capacidad fotosintética. Por lo anterior, a los tejidos mantenidos *in vitro* se les debe proveer de una fuente de carbono orgánico que compense su baja o nula capacidad fotosintética. La gran mayoría de los me-

dios de cultivo utilizan sacarosa en concentraciones del 2 al 3% (p/v), aunque esta concentración puede ser mayor para algunas especies. La sacarosa es la principal forma de transporte y almacenamiento temporal de carbono en las plantas, por lo que resulta el compuesto más adecuado para ser usado en los medios de cultivo, esto además de presentar ventajas como su gran solubilidad y su bajo costo. La sacarosa, además de servir al tejido como fuente de carbono, tiene un papel muy importante como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo, ya que es el soluto más abundante en el mismo. Esto debe tomarse en cuenta cuando se altera su concentración o se prueban fuentes alternas de carbono. Además de la sacarosa, se ha reportado el uso de fuentes de carbono como la glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, rafinosa, maltosa e incluso almidón, sin embargo, estos compuestos sólo son eficientes en algunos tipos de tejido y procesos particulares y no son de amplia aplicación.

d) Compuestos orgánicos:

En condiciones naturales, las plantas tienen la capacidad de sintetizar todos los compuestos orgánicos requeridos para su metabolismo, por lo que no requieren de un aporte externo de los mismos. Sin embargo, se sabe que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* pierden total o parcialmente esta capacidad y se vuelven dependientes del suministro externo de algunos de estos nutrientes, sobre todo de algunas vitaminas. Esto puede estar relacionado con la baja capacidad fotosintética de estos tejidos. Casi todas las células o tejidos vegetales cultivados *in vitro* requieren tiamina, y en algunos casos, se ha observado que resulta benéfica la adición de piridoxina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, riboflavina y ácido p-aminobenzoico. Otro elemento orgánico importante en los medios de cultivo es el mioinositol, cuya adición en concentraciones estimula el crecimiento de la mayoría de los tejidos. Por lo anterior, la mayoría de los medios de cultivo incorporan una mezcla de compuestos orgánicos como los antes mencionados, además de la fuente de carbono, a su formulación.

e) Otros:

Además de los ingredientes antes mencionados, que están presentes en prácticamente todos los medios de cultivo, hay algunos otros que pueden ser

incorporados al medio para incrementar la respuesta de los tejidos, o bien para cambiar algunas condiciones del propio medio. Algunos de éstos son:

- **Nitrógeno orgánico.** Además del nitrógeno inorgánico suministrado como nitrato o amonio, algunos medios de cultivo utilizan una fuente adicional de nitrógeno orgánico como complemento. Para esto se utilizan aminoácidos, ya sea en forma de mezclas complejas o como compuestos individuales. Las mezclas de aminoácidos más utilizadas son hidrolizados proteínicos, como el de caseína. Los aminoácidos individuales utilizados como fuente de nitrógeno orgánico son la glutamina, la asparagina y la glicina.
- **Complejos orgánicos.** En ocasiones se adicionan mezclas orgánicas complejas en los medios de cultivo, ya que en algunos casos estimulan el crecimiento de los tejidos o incluso son indispensables para obtener la respuesta deseada. El efecto de los complejos orgánicos se debe a la presencia en ellos de sustancias no identificadas, pero requeridas por las células. Estas pueden ser micronutrientes, compuestos orgánicos o incluso reguladores del crecimiento. Con este fin se utilizan el agua de coco, el extracto de levadura y de malta, el endospermo de maíz, el jugo de tomate, naranja o piña, y el extracto de plátano, entre otros. La utilización de este tipo de productos en el medio de cultivo debe tomarse como último recurso, dado el poco control que se tiene sobre los componentes de los mismos y la dificultad de obtener lotes homogéneos en cuanto a su composición de estos productos.
- **Gelificantes.** Cuando se trabaja con medio semisólido, debe utilizarse un gelificante para darle la consistencia adecuada. Este debe ser no reactivo y no digerible por el tejido vegetal. Los gelificantes más utilizados son el agar y el Phytigel o Gelrite (marcas comerciales). Dado que los gelificantes suelen ser uno de los ingredientes más costosos de los medios de cultivo, se han probado diversas opciones para dar soporte a los tejidos cultivados *in vitro* sin necesidad de incorporar un gelificante. Algunas opciones para esto son los soportes de poliuretano o de papel filtro.
- **Antioxidantes.** De manera natural, los tejidos vegetales heridos excretan compuestos fenólicos que al entrar en contacto con la atmósfera se oxidan obscureciendo al tejido. Este fenómeno se conoce como

oxidación y es una causa frecuente de necrosis en los tejidos recién inoculados en medios de cultivo *in vitro*. Hay especies de plantas, como las leñosas, que son especialmente proclives a oxidarse. Por este motivo es relativamente común incorporar antioxidantes con ácido cítrico y ácido ascórbico a los medios de cultivo. También se pueden incorporar resinas como la polivinilpirrolidona (PVP) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP) que adsorben los compuestos fenólicos excretados impidiendo su oxidación sobre el tejido.

Otro factor para tomar en cuenta en el medio de cultivo es el pH, el cual generalmente se fija entre 5.5 y 5.8, ajustándolo una vez hecha la mezcla de los componentes. Cada uno de los medios de cultivo de uso común sugieren un valor de pH preciso dentro de este rango. El pH se ajusta con KOH, NaOH y HCl 0.1 N.

Finalmente, antes de su utilización, el medio deberá ser esterilizado, esto se realiza en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.05 kg/cm² (15 - 20 Psi). El tiempo de esterilización depende del volumen de medio colocado en cada recipiente, sin embargo, no es recomendable sobrepasar los 20 min ya que esto puede provocar la caramelización de la sacarosa contenida en el medio, cambiando las propiedades del mismo. Los componentes termolábiles, como lo son algunos compuestos orgánicos, deben ser esterilizados por filtración y añadidos al medio ya estéril. Para esto se emplean filtros de membrana de .22 a .45 µm de tamaño de poro.

Reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas

La adición de reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas es en la mayoría de las ocasiones fundamental para obtener la respuesta deseada de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Los compuestos más utilizados son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en las plantas. En menor grado se utilizan algunos reguladores no pertenecientes a estos grupos como las giberelinas y el ácido abscísico. En cuanto a los dos primeros grupos mencionados, se utilizan tanto compuestos naturales, idénticos a los que se presentan en las plantas, como moléculas

sintéticas que por alguna similitud estructural con los reguladores naturales muestran una actividad similar a los mismos. Aunque la actividad de las auxinas y citocininas naturales es similar a la de sus equivalentes sintéticos, su comportamiento en los tejidos es diferente. Esto se debe a que las células vegetales poseen mecanismos para degradar o inactivar a los compuestos de origen natural, más no a los sintéticos. Debido a esto, la actividad de los compuestos naturales añadidos al medio de cultivo puede perderse o disminuirse con el paso del tiempo, mientras que los sintéticos tienen una permanencia mayor.

Las características más importantes de las auxinas y citocininas son:

- Auxinas. Son un grupo de compuestos derivados del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos como el crecimiento celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces). En las plantas completas las auxinas tienen que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos, como por ejemplo el ácido 4-cloroindol-3-acético, el ácido indol-3-acrílico o el ácido indolbutírico (AIB). El AIA y el AIB se utilizan frecuentemente en los medios de cultivo. Por ser compuestos que se encuentran naturalmente en la planta, tienden a ser metabolizados por los tejidos; además, éstos se desnaturalizan con relativa rapidez en el medio. Esto hace que la disponibilidad real de estas auxinas en el medio de cultivo disminuya paulatinamente, lo cual resulta útil en aquellos procesos que requieren altas concentraciones de auxinas sólo para la inducción inicial de los mismos (por ejemplo, el enraizamiento). Por otro lado, se conocen y utilizan varios compuestos sintéticos que tienen una fuerte actividad de auxinas, como los ácidos fenoxiacéticos, que son utilizados como herbicidas en altas concentraciones. Estos compuestos artificiales suelen ser más activos, ya que las células vegetales carecen en muchos casos de sistemas enzi-

máticos para degradarlos. Ejemplos de auxinas artificiales son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram).

- Citocininas. Son derivados de la adenina y se sintetizan en tejidos jóvenes y raíces. Poseen dos propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; por un lado, estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. Junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular. Debido a lo anterior, el balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido. Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Estas citocininas naturales se caracterizan por poseer un esqueleto de adenina con una cadena lateral isoprenoide. Las citocininas sintéticas benciladenina (BA) y cinetina son las más utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales. Algunos herbicidas sintéticos como las fenilureas tienen actividad de citocinina en bajas concentraciones. Un ejemplo de esto último es el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea (Tidiazurón).
- Otros reguladores del crecimiento vegetal utilizados en cultivos *in vitro*. El ácido giberélico (GA₃) se utiliza para estimular el crecimiento (alargamiento) de los tallos. También puede ser útil para romper la dormancia estimulando así la germinación de algunas semillas y la brotación de yemas. El ácido abscísico se utiliza en la etapa de maduración de los embriones somáticos y en la inducción de la formación de microtubérculos en cultivos *in vitro* de papa.

En el cuadro siguiente se presentan algunas características de los reguladores del crecimiento vegetal más empleados en el cultivo *in vitro*.

Nombre	Abreviatura	PM	Concentración de trabajo (mg/L) ^a	Solvente ^b	Método de esterilización ^c	Usos más comunes
AUXINAS						
Ácido indolacético	AIA	175.2	0.01-3.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Enraizamiento de brotes, organogénesis (combinado con una citocinina).
Ácido naftalenacético	ANA	186.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave	Organogénesis (combinado con una citocinina).
Ácido indolbutírico	AIB	203.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Enraizamiento.
Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético	2,4-D	221.0	0.01-5.0	NaOH 1N Etanol	Autoclave	Generación de tejido calloso, embriogénesis somática.
Ácido aminotricloropicolínico	Picloram	241.5	0.1-10.0	DMSO	Autoclave	Generación de tejido calloso, embriogénesis somática.
CITOCININAS						
Benciladenina o 6-bencilamino-purina	BA	225.3	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Cinetina	Cin	215.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Isopentiladenina	2iP	203.2	1.0-30.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
meta-Topolina	MT	241.5	0.01-5.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Feniltidiazol urea o tidiazurón	TDZ	220.2	0.001-0.1	DMSO	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Zeatina	Zea	219.2	0.01-5.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Ribósido de zeatina	---	351.4	0.01-5.0	NaOH 1N	Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)

Nombre	Abreviatura	PM	Concentración de trabajo (mg/L) ^a	Solvente ^b	Método de esterilización ^c	Usos más comunes
OTROS						
Ácido abscísico	ABA	264.3	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Maduración de embriones somáticos, formación de microtubérculos.
Ácido giberélico	Ga ₃	346.4	0.01-5	Etanol	Autoclave Filtración	Crecimiento de tallos, rompimiento de la dormancia en semillas y yemas.

^a Se refiere al rango de concentraciones en que suele presentarse una respuesta en el tejido. Concentraciones menores al límite inferior no generan respuesta alguna, mientras que las mayores al límite superior pueden ser tóxicas para los tejidos.

^b El compuesto en polvo se disuelve en la mínima cantidad posible del solvente y luego el volumen debe completarse con agua destilada o desionizada. El NaOH puede substituirse por KOH.

^c Autoclave: Se agrega al resto de los componentes del medio y se esteriliza en autoclave. Filtración: Compuestos termolábiles que debes esterilizarse por filtración y agregar al medio después de su esterilización en autoclave. Cuando se mencionan las dos opciones significa que el compuesto soporta la esterilización por autoclave pero puede perder algo de actividad. Para experimentos que requieran concentraciones precisas se recomienda filtrar.

Tipos de cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de vegetales pueden clasificarse con base en dos criterios. El primero de ellos se refiere al tejido o parte de la planta que se está cultivando, mientras que el segundo tiene que ver con la consistencia del medio de cultivo y el tipo de recipiente a utilizar. En cuanto al primer criterio, los tipos de cultivos *in vitro* son:

- A. *Cultivo de células*. Lo que se cultiva en este caso son células aisladas unas de otras, o bien formando pequeños acúmulos, pero nunca tejidos organizados. Esto se logra usando medios de cultivo líquidos en los que las células o acúmulos se encuentran suspendidos. Los medios se agitan permanentemente con el fin de oxigenarlos y de que las células se mantengan separadas unas de otras, sin formar tejidos, por lo que se les llama cultivos de células en suspensión (Fig. 1.1a). Este tipo de cultivos se emplea para estudios bioquímicos o fisiológicos, para la producción

de metabolitos secundarios o como etapa inicial en algunos protocolos de regeneración a través de la embriogénesis somática. Un derivado de este tipo es el cultivo de protoplastos, que son células a las que se le ha eliminado la pared celular por métodos enzimáticos.

- B. *Cultivo de tejidos*. Se trata del cultivo de masas de células unidas unas con otras formando un tejido. El más común es el tejido calloso o callo (Fig. 1.1b), el cual está formado por células poco diferenciadas que están continuamente dividiéndose, pero sin formar órganos funcionales (Fig. 1.1c). Este tejido se puede mantener y propagar por tiempo indefinido sólo fragmentándolo y resemebrándolo en medio de cultivo fresco. Se utiliza entre otras cosas para estudios bioquímicos o fisiológicos, como paso intermedio para la regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática indirectas o para el estudio y producción de metabolitos de interés. Al estar formado por células indiferenciadas en rápida división es frecuente que en el tejido calloso se presenten errores o alteraciones durante la mitosis. Estos errores se acumulan a lo largo del tiempo, por lo que en tejidos callosos mantenidos por tiempos prolongados es frecuente que se presenten cambios en el genotipo y en ocasiones en el fenotipo. A esto se le denomina variación somaclonal y se puede presentar también en otros sistemas de cultivo, aunque con una frecuencia menor a la del tejido calloso.
- C. *Cultivo de órganos o segmentos de plantas*. Se trata del cultivo de órganos diferenciados, constituidos éstos por varios tipos celulares. Es posible establecer cultivos *in vitro* usando como explantes segmentos de hojas y tallos. Sin embargo, estos órganos se diferencian rápidamente en otros tipos de tejidos y no es posible mantener cultivos de los mismos a largo plazo. En el caso de las raíces, si es posible mantener cultivos que conserven de manera indefinida sus características propias, por lo que el cultivo de raíces es el cultivo de órganos más utilizado. Las raíces que se cultivan pueden ser naturales o más comúnmente provenir de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* (Fig. 1.1d). En este caso se les llama raíces pilosas o transformadas. El uso más importante hoy en día de los cultivos de raíces es la producción en los mismos de metabolitos de alto valor.
- D. *Cultivo de plantas completas*. En este caso se mantienen plantas completas, parte aérea y raíz, en condiciones *in vitro*. En el caso de plantas

de talla pequeña (Fig.1. 1e), pueden mantenerse por largos períodos de tiempo, e incluso en algunos casos las plantas pueden completar su ciclo de vida en estas condiciones. En el caso de plantas de talla grande (Fig. 1.1f), sólo pueden mantenerse un tiempo corto en condiciones *in vitro* y luego deben ser transferidas a suelo. Normalmente, el cultivo de plantas completas es la última etapa del proceso de micropropagación, pero este sistema también puede emplearse para estudiar de una forma controlada las respuestas de la planta ante diversos fenómenos que pueden emularse bajo las condiciones *in vitro*.

- E. *Coocultivo*. Un requisito fundamental para que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tenga éxito es mantenerlo libre de microorganismos contaminantes. Sin embargo, en ocasiones es necesario incorporar de manera intencional un microorganismo específico como parte del proceso a realizar. Ejemplo de esto es la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, o la inoculación de plántulas con hongos micorrícicos en la última etapa de la propagación *in vitro*. A esta etapa en la que se agrega un microorganismo al medio de cultivo se le llama coocultivo.

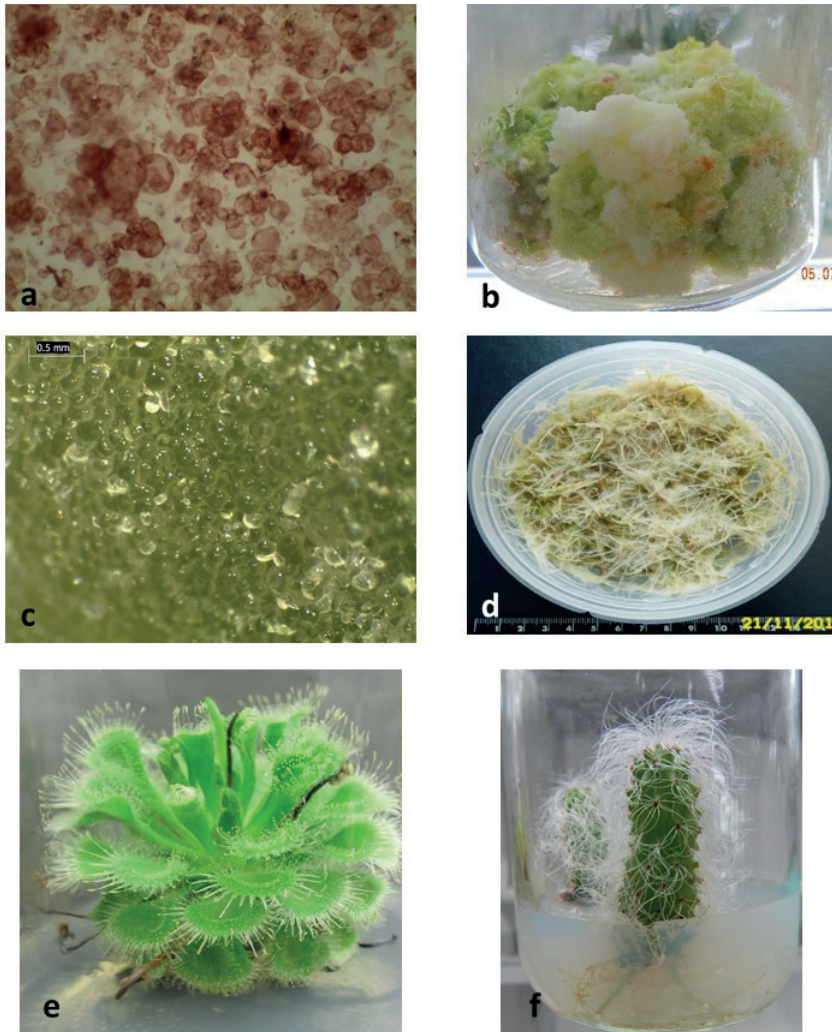


Figura 1.1. Tipos de cultivos *in vitro* de acuerdo con el tejido cultivado. a) Cultivo de células en suspensión de *Mammillaria*, la coloración rojiza se debe a la producción de pigmentos del grupo de las betalaínas; b) Cultivo de tejido calloso de *Mammillaria*; c) Vista ampliada del tejido calloso de *Mammillaria* en la que son visibles las células no diferenciadas y homogéneas que lo constituyen; d) Cultivo de raíces transformadas de *Turbinicarpus*; e) Cultivo de plantas completas de *Drosera burmanii*, y f) de *Cephalocereus senilis*.

Por lo que respecta al segundo criterio de clasificación, de acuerdo con el medio y recipiente de cultivo, los tipos de cultivo son:

- I. *Cultivo en medios semisólidos*. Consiste en el cultivo sobre medios gelificados que le den un soporte físico al explante (Fig. 1.2a). Es el tipo de cultivo más empleado hoy en día, ya que resulta fácil de realizar. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como el alto costo de los gelificantes, la poca disponibilidad de nutrientes para los segmentos del tejido que quedan alejados del medio de cultivo, y la dificultad para escalarlo, ya que la capacidad de los recipientes empleados es limitada.

- II. *Cultivo en medios líquidos*. El uso de medios de cultivo líquidos presenta ventajas como la mejor y más rápida distribución de los nutrientes hacia el tejido y el no requerir gelificantes. También es sencillo de escalar usando recipientes de mayores capacidades. Su desventaja principal radica en la dificultad para que el oxígeno se difunda dentro del medio y llegue a los tejidos. Esto se resuelve utilizando volúmenes muy pequeños de medio, o bien manteniendo los cultivos bajo agitación constante, lo que promueve la oxigenación. El uso de medios líquidos agitados es muy adecuado para procesos que requieren de una rápida producción de biomasa, como el cultivo de raíces (Fig. 1.2b) o de células en suspensión. Sin embargo, resulta poco adecuado para procesos en los que se requiere de desarrollo y diferenciación de los tejidos.

- III. *Cultivo en biorreactores*. Los biorreactores son recipientes de cultivo especializados que utilizan medio líquido, pero incorporan a su diseño sistemas que permiten la oxigenación de los tejidos y el control de algunos de los parámetros importantes para éxito del cultivo. Existe una gran cantidad de diseños de biorreactores que se han desarrollado con diferentes fines dentro de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo, el sistema más eficiente, y con un uso más extendido hoy en día, es el llamado biorreactor de inmersión temporal. Este dispositivo permite que los tejidos estén en contacto o dentro del medio líquido por cortos períodos de tiempo, mientras que el resto del tiempo permanece fuera del mismo. Esta inmersión frecuente permite la toma de nutrientes y reguladores del crecimiento, mientras que los períodos fuera del medio

facilitan la oxigenación. Los dos diseños de biorreactores de inmersión temporal más usados son el llamado RITA[®] (Fig. 1.2c), en el que el medio de cultivo y el tejido se encuentran en compartimentos diferentes de un solo recipiente, y el de tanques gemelos, en el que se usan recipientes separados para el medio y para el tejido (Fig. 1.2d).



Figura 1.2. Tipos de cultivos *in vitro* de acuerdo con el sistema utilizado. a) Brotes de *Yucca* cultivados sobre medios semisólidos; b) Cultivo de raíces transformadas de *Turbinicarpus* en medio líquido agitado; c) Micropropagación de piña en un biorreactor RITA[®], y; d) Micropropagación de agaves en sistemas de biorreactores de tanques gemelos.

Establecimiento de cultivos *in vitro*

En teoría, cualquier tejido vegetal que contenga células vivas puede emplearse para el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Sin embargo, en la práctica es conveniente seleccionar tejidos jóvenes, ya que estos responderán y se adaptarán más fácilmente a las condiciones de cultivo en sistemas artificiales. Por otro lado, un paso indispensable en esta etapa es la desinfección superficial del tejido. Esto puede ser un proceso relativamente sencillo en estructuras como las semillas, o muy complejo en tejidos vegetativos tomados de condiciones de campo. La desinfección se logra lavando los tejidos varias veces con agua corriente y un jabón antiséptico. Posteriormente se tratan con agentes desinfectantes como alcoholes (etanol o isopropanol) y con desinfectantes a base de cloro (hipoclorito de calcio o de sodio). En este último caso pueden utilizarse blanqueadores comerciales ajustando la concentración de acuerdo con la cantidad de ingrediente activo en el producto. Una vez realizado el proceso de desinfección, se procede a la disección de los explantes en condiciones asépticas (campana de flujo laminar) y a su inoculación en el medio de cultivo apropiado.

Hay algunos tejidos que por su naturaleza son muy difíciles de desinfectar y los métodos convencionales como el antes descrito no resultan suficientes. En estos casos se recomienda:

- a) Extender el tiempo de los lavados previos e incorporar un fungicida comercial a la solución. Los tejidos pueden lavarse por varias horas o hasta toda la noche manteniéndolos en agitación suave.
- b) Incorporar al protocolo de desinfección otros agentes como cloruro de mercurio (con precaución por su alta toxicidad), compuestos a base de plata (nitrato de plata, plata coloidal o nanopartículas), peróxido de hidrógeno, tintura de yodo o cloruro de benzalconio. La aplicación de estos compuestos debe incorporarse como una etapa más en el protocolo de desinfección, no se recomienda mezclarlos con otros agentes.
- c) Ciertos tipos de tejidos son difíciles de desinfectar debido a su superficie irregular o porque están cubiertos de ceras, vellosidades o tricomas, lo que dificulta la penetración de los agentes desinfectantes a toda su superficie. En esta situación es recomendable realizar el proceso de desinfección en un matraz kitasato y aplicar algunos ciclos cortos de vacío (30 seg) durante los tratamientos. Con esto se elimina el aire atrapado en

las irregularidades del tejido permitiendo la penetración completa del desinfectante.

- d) Los explantes susceptibles a la contaminación deben inocularse con una densidad lo más baja posible, de preferencia uno solo por recipiente de cultivo. De esta manera el hecho de que un explante se contamine no repercutirá en la pérdida de otros. Bajo la misma lógica, entre más pequeño sea el explante, menos probable es que lleve contaminantes, por lo que se recomienda reducir su tamaño si el tejido es difícil de desinfectar.

Algunos tejidos contienen microorganismos endófitos (que habitan en el interior del tejido). Bajo esta situación la desinfección superficial antes mencionada no resulta eficiente. En este caso se pueden incorporar antibióticos o compuestos antifúngicos al medio de cultivo con el fin de inhibir el crecimiento de estos organismos. Sin embargo, esta solución no es del todo eficiente ya que es muy posible que los organismos se vuelvan a desarrollar en cuanto estos agentes sean retirados del medio. Por lo anterior, lo más recomendable en estos casos puede ser buscar una fuente alterna de tejidos que esté libre de estos organismos. Una forma relativamente sencilla para detectar la presencia de endófitos es inocular segmentos del tejido sospechoso en medios de cultivo ricos diseñados para microorganismos. En este caso el desarrollo del endófito será más rápido que en el medio de cultivo para vegetales y será fácilmente detectable.

Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

En sus inicios, los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales se emplearon como sistema para el estudio de fenómenos relacionados con la nutrición, fisiología y bioquímica de las plantas. Posteriormente surgieron aplicaciones prácticas de esta tecnología, destacando las que se ubican en las áreas de la propagación masiva *in vitro* o micropropagación, el mejoramiento de las plantas, la producción de metabolitos o moléculas de interés en cultivos *in vitro* y la conservación de germoplasma. Por su importancia, la micropropagación será descrita de forma más amplia en otra sección de este documento. En cuanto al resto de las áreas de aplicación, se puede mencionar lo siguiente:

- A. Mejoramiento de plantas a través del cultivo *in vitro*. Esto puede lograrse a través de:
- a. Selección *in vitro*. Para esto se someten tejidos o células a niveles crecientes de algún factor que genere estrés, ya sea biótico o abiótico. Esto inhibirá el desarrollo de las células sensibles, permitiendo seleccionar a las de mayor resistencia. Esto se puede hacer por varios ciclos incrementando la dosis del agente estresante y finalmente regenerando plantas completas a partir de los tejidos resistentes. Con esta estrategia ha sido posible regenerar plantas con una resistencia incrementada a la salinidad, a metales pesados y a diversos compuestos tóxicos.
 - b. Hibridación somática. Los protoplastos son células vegetales vivas a las que se les ha eliminado la pared celular por métodos enzimáticos. Al carecer de esta estructura son capaces de fusionarse unos con otros bajo ciertos estímulos. En algunas especies o combinaciones de especies es posible regenerar plantas completas a partir de las células híbridas producto de estas fusiones. A esto se le llama hibridación somática y es una forma de mezclar por una vía no sexual los genomas de dos individuos que pueden ser incluso de especies diferentes. Esta técnica ha tenido un éxito importante en el mejoramiento de varios grupos de plantas, entre ellos los cítricos.
 - c. Modificación del nivel de ploidía. Aun cuando hay varias excepciones, la mayoría de las plantas cultivadas son diploides. Las técnicas de cultivo y regeneración *in vitro* permiten generar plantas con niveles de ploidía diferentes a éste. Por ejemplo, a través de la regeneración de plantas partiendo de gametos masculinos o femeninos es posible generar plantas haploides. Por otro lado, regenerando plantas a partir de endospermo es posible obtener individuos triploides. Finalmente, la técnica de fusión de protoplastos permite duplicar en un solo evento el número de ploidía de una línea celular, y también hace posible obtener diferentes resultados finales al fusionar líneas celulares con niveles de ploidía diferentes. Algunas de las plantas que se pueden generar con niveles de ploidía alterados pueden tener un valor agronómico por sí mismas, mientras que otras, como las haploides, sólo son valiosas al integrarlas a otros esquemas de fitomejoramiento.

- d. Regeneración de plantas modificadas genéticamente. Las técnicas de transformación genética permiten la introducción de nueva información a las células vegetales, esto incluye la posibilidad no solo de incorporar nuevas características, sino de bloquear o incluso editar características existentes. Sin embargo, estos procesos normalmente se llevan a cabo sobre células, por lo que la regeneración de plantas completas que posean estas características modificadas requiere del proceso de regeneración *in vitro* mediante la organogénesis o embriogénesis somática. Estas vías permiten la obtención de plantas completas partiendo de células individuales, por lo que pueden convertir una sola célula modificada genéticamente en un individuo completo.
- B. Producción de metabolitos o compuestos de interés en cultivos *in vitro*. Algunos sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* son capaces de generar biomasa a una tasa superior a la de las plantas creciendo en condiciones naturales. Estos sistemas pueden ser cultivos de células en suspensión, de tejido calloso o de raíces transformadas obtenidas mediante la inoculación con *Agrobacterium rhizogenes*. En algunos casos, estos tejidos conservan la capacidad biosintética de la planta completa, por lo que pueden ser usados como fuente de metabolitos de interés en lugar de la planta misma. Por lo anterior, el cultivo *in vitro* se ha convertido en una alternativa muy atractiva para la producción de metabolitos secundarios de alto valor sintetizados por las plantas, pero difíciles de obtener a partir de ejemplares completos. Esta dificultad puede deberse a la rareza o grado de amenaza de las especies, a su distribución natural limitada, o a su baja tasa de crecimiento, factores que dejan de ser limitantes cuando se cuenta con cultivos *in vitro*. Una segunda posibilidad que ofrecen los sistemas de cultivo *in vitro* es la de producir en estas moléculas de alto valor que no son propias de la especie cultivada. Esto se logra a través de la modificación genética de las células o tejidos cultivados, con el fin de que produzcan péptidos o proteínas propias de otro organismo.
- C. Conservación *in vitro* de germoplasma. La rápida pérdida de la biodiversidad vegetal es una de las mayores preocupaciones en la actualidad. El cultivo *in vitro* puede ofrecer herramientas que pueden disminuir el impacto de este problema, como por ejemplo, la creación de bancos de germoplasma *in vitro*. Éstos son colecciones de tejidos viables manteni-

dos en condiciones de cultivo *in vitro* por tiempo indefinido, y a partir de los cuales es posible regenerar y multiplicar plantas completas cuando esto es necesario. El principal obstáculo para mantener estas colecciones de tejidos viables es la necesidad de renovar periódicamente el medio de cultivo. Sin embargo, se han desarrollado ya técnicas de crecimiento retardado que permiten prolongar considerablemente el tiempo entre subcultivos, facilitando el mantenimiento de estos bancos. Este retardo en el crecimiento se puede lograr cultivando a bajas temperaturas, añadiendo agentes osmóticos que reduzcan la disponibilidad de agua en el medio, añadiendo inhibidores del crecimiento, o combinando las estrategias mencionadas. Una variante de esta tecnología es la criopreservación, que es el mantener células o tejidos congelados en Nitrógeno líquido. Esta opción sería más eficiente ya que el mantenimiento requerido es mínimo. Sin embargo, los procesos de congelación y descongelación en las células vegetales son especialmente complicados debido a la presencia de paredes celulares rígidas y vacuolas, por lo que esta tecnología sólo se ha desarrollado para un número limitado de especies.

Micropropagación

Una de las posibilidades más interesantes que brinda el cultivo de tejidos vegetales es la regeneración de plantas completas a partir de las células o tejidos cultivados *in vitro*. Esto permite generar grandes cantidades de propágulos en tiempos relativamente cortos. A esta técnica se le llama micropropagación, propagación *in vitro* o clonación *in vitro* de plantas.

La micropropagación es un proceso que consta de cinco etapas que se llevan a cabo de manera secuencial. Estas etapas son:

- A. Etapa 0. Selección y preparación de la planta madre. Se trata de una etapa previa al trabajo de laboratorio. En ésta se seleccionan las plantas madre de las que serán tomados los explantes para iniciar los cultivos *in vitro*. Esta etapa es fundamental para el éxito de la micropropagación, ya que ésta es un sistema de propagación clonal, por lo que todas las plantas generadas tendrán las características genotípicas de la planta madre. Si se parte de una planta elite con características deseables superiores

al promedio, las plantas generadas tendrán un alto valor. También debe buscarse que la planta madre se encuentre en excelentes condiciones fitosanitarias y que crezca en un ambiente limpio. Esto con la finalidad de facilitar la etapa de establecimiento de cultivos *in vitro*. Cuando esto es factible, es recomendable dar pretratamientos a la planta madre, como lavados y aplicación de fungicidas y/o bactericidas de forma periódica. Esto con el fin de que los tejidos lleven la menor cantidad posible de contaminantes potenciales al momento de hacer la desinfección superficial y establecer los cultivos *in vitro*.

- B. Etapa 1. Establecimiento de cultivos *in vitro*. Para esto es indispensable la desinfección de tejidos viables que luego son inoculados en los medios de cultivo artificiales. Este proceso se describió en un punto anterior. Para un programa de micropropagación, hay dos formas de obtener los cultivos iniciales.
 - a. Desinfectar semillas e inocularlas en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento para que germinen. Las plántulas que así se obtienen (Fig. 1.4a) se usan como fuente de tejidos para iniciar la micropropagación, ya sin necesidad de desinfectar estos explantes ya que provienen de un cultivo axénico. Las ventajas de esta opción es la facilidad con la que se pueden desinfectar las semillas debido a que la testa protege a los tejidos susceptibles de los agentes desinfectantes, y la mayor diversidad genética que se obtiene en las plantas generadas cuando los cultivos iniciales proceden de semillas. En otro sentido, las desventajas de esta opción son la baja o nula disponibilidad de semillas en muchas especies vegetales, y el que esta técnica no es la adecuada cuando se desea conservar la totalidad de las características genéticas de un material especialmente valioso.
 - b. Colectar y desinfectar tejidos vegetativos de plantas creciendo en condiciones naturales, preferentemente brotes jóvenes. En este caso el proceso de desinfección suele ser mucho más complejo y menos eficiente que cuando se parte de semillas. Los tejidos vegetativos son mucho más sensibles que las semillas a los agentes y tratamientos desinfectantes, por lo que resulta difícil encontrar un protocolo que elimine los contaminantes de forma eficiente sin causar la necrosis del

tejido. A pesar de esto, esta es la única opción viable cuando no se dispone de semillas o cuando el objetivo es conservar las características de una variedad en particular.

C. Etapa 2. Multiplicación. La etapa anterior tiene como objetivo únicamente el disponer de algunos tejidos ya adaptados a las condiciones *in vitro* y creciendo libres de contaminantes. No es necesario contar con una gran cantidad de estos tejidos, ya que en esta etapa 2 es cuando se multiplicarán masivamente. Esta multiplicación se puede hacer por tres vías o caminos diferentes. Esto es algo que se debe tener claro al plantear un proyecto de micropropagación, ya que las características y estrategias para inducir cada una de estas vías es diferente. Estas vías de regeneración son:

- a. *A través de tejidos meristemáticos (yemas, ápices o segmentos nodales).* Los meristemas, contenidos en las yemas apicales y axilares, son los puntos de crecimiento naturales de las plantas y tienen la capacidad de formar nuevos brotes (parte aérea de la planta). Esta capacidad la mantienen cuando se establecen y cultivan *in vitro*, por lo que el cultivo de yemas apicales o axilares es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir así nuevas plantas completas. Muchas veces las yemas son capaces de brotar en un medio de cultivo basal, carente de reguladores del crecimiento. Sin embargo, la adición de citocininas al medio de cultivo romper la dormancia y estimula la división celular en el meristemo, por lo que su presencia acelera la brotación y puede provocar que se generen varios brotes en cada yema (brotación múltiple) (Fig. 1.3a, 1.4b y 1.4c).
- b. *Organogénesis.* Este término se refiere a la formación *de novo* de órganos en los explantes cultivados (organogénesis directa) (Fig. 1.3b) o en cultivos previamente establecidos de tejido calloso (organogénesis indirecta) (Fig. 1.3c). El fundamento de la organogénesis es la formación en el tejido de meristemas ectópicos a partir de los cuales se generan órganos. Los órganos que se pueden formar sobre el explante son raíces o brotes adventicios, pero sólo uno de ellos a la vez. Los brotes adventicios son estructuras muy similares a una yema que tienen la capacidad de originar toda la parte aérea de una nueva planta. Cuando estos brotes son separados del explante original y transferidos a un

medio apropiado crecen y forman raíces, convirtiéndose en un propágulo listo para ser adaptado y transferido a suelo. Entre los factores que contribuyen a la inducción de los brotes adventicios destacan los reguladores del crecimiento, en particular, las citocininas y las auxinas, que cuando se suministran combinadas en el medio de cultivo pueden desencadenar la organogénesis. Sin embargo, el tipo, cantidad y proporción de citocininas y auxinas depende de la especie y se deben determinar experimentalmente en caso de no encontrarse referencias en la literatura.

c. *Embriogénesis somática*. En esta vía, algunas de las células somáticas contenidas en el explante o en un cultivo de tejido calloso se convierten en células indiferenciadas similares a un cigoto y posteriormente inician una vía de división y diferenciación que las convierte en embriones, llamados somáticos por su origen diferente a la fecundación sexual (Fig. 1.3d). Los embriones somáticos tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. La embriogénesis somática no sucede únicamente en cultivos *in vitro*, es relativamente común en condiciones naturales en algunas familias de plantas y se conoce como apomixis. Si bien la embriogénesis somática *in vitro* puede ocurrir directamente en algunas células del explante (embriogénesis directa), lo más común es que este proceso se inicie en un cultivo de tejido calloso, o células en suspensión, previamente establecido (embriogénesis indirecta). Las etapas en las que ocurre la embriogénesis somática indirecta son:

- i. Inducción. En esta etapa la célula somática se convierte en una célula capaz de dar origen a un embrión (célula proembriónica). Los factores que más influyen en este paso son el genotipo, ya que no todas las células cultivadas *in vitro* tienen esta capacidad, así como la presencia de auxinas, sobre todo sintéticas, en el medio de cultivo.
- ii. Histodiferenciación o embriogénesis propiamente dicha. En esta etapa las células proembriónicas se multiplican y diferencian formando embriones somáticos. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación normalmente

se requiere la eliminación o disminución de las auxinas exógenas. Uno de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriogénicas. Esta polaridad se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión. Durante la etapa de histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledoneas estos estadios son globular, de corazón y de torpedo, mientras que en las monocotiledoneas son globular, coleoptilar y escutelar.

- iii. Maduración. Los embriones recién formados, tanto por la vía somática como por la vía normal o cigótica, no tienen usualmente la capacidad de germinar. Para adquirirla requieren de un período de maduración, el cual en condiciones naturales ocurre al mismo tiempo que la desecación y en el que participa de manera importante el ácido abscísico (ABA). Por tanto, en la embriogénesis somática *in vitro* la maduración se puede lograr incluyendo ABA en el medio de cultivo y/o favoreciendo la desecación paulatina de los embriones.
- iv. Germinación o conversión. En esta etapa los embriones completamente formados y maduros se desarrollan convirtiéndose en plantas completas. Para que esto suceda se requieren estímulos como la luz, el ácido giberélico o citocininas. Los embriones somáticos carecen de tejidos de reserva por lo que su germinación solo ocurre *in vitro* en donde el medio de cultivo aporta los nutrientes necesarios para el proceso.

D. Etapa 3. Crecimiento y enraizamiento. Esta etapa permite que los brotes generados en la etapa anterior crezcan, adquieran vigor y formen un sistema radical que los hará capaces de sobrevivir a la última etapa del proceso, que es su adaptación y transferencia al medio externo (Fig. 1.4d). El enraizamiento sólo procede cuando la multiplicación se hace a través de meristemos o de organogénesis. Los embriones somáticos desde su origen cuentan con un polo radical por lo que el proceso por el que deben de pasar es diferente y se describe en la sección respectiva. El enraizamiento de los brotes puede lograrse en medios basales carentes de reguladores del crecimiento, ya sea a su concentración normal o diluidos

al 50-75%. La adición al medio de carbón activado o de auxinas como el ácido indolbutírico (AIB) estimulan el enraizamiento.

- E. Etapa 4. Adaptación y transferencia al medio externo. En esta etapa las plantas generadas *in vitro* son adaptadas primero, y luego transferidas, a condiciones naturales (Fig. 1.4e). Para esto se requiere de un proceso paulatino ya que las plantas generadas *in vitro* presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo.

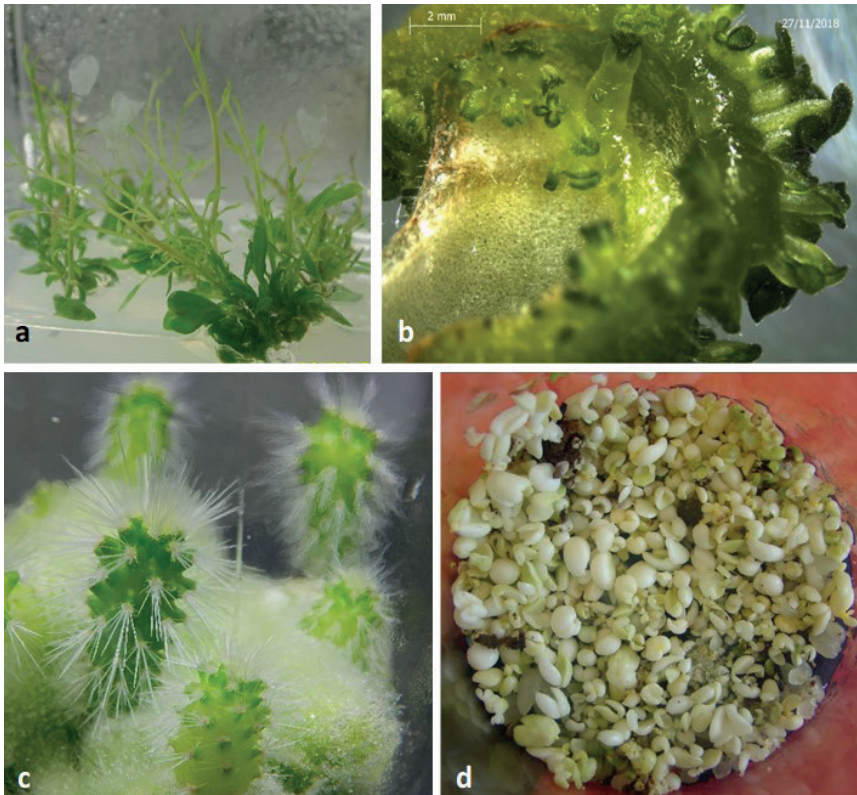


Figura 1.3. Vías para la regeneración *in vitro* de plantas. a) Propagación por yemas de alcaparro; b) Organogénesis directa sobre un segmento de hoja de violeta africana; c) Organogénesis indirecta sobre callo de *Echinocereus*, y; d) Embriogénesis somática en laurel mexicano (*Litsea*).

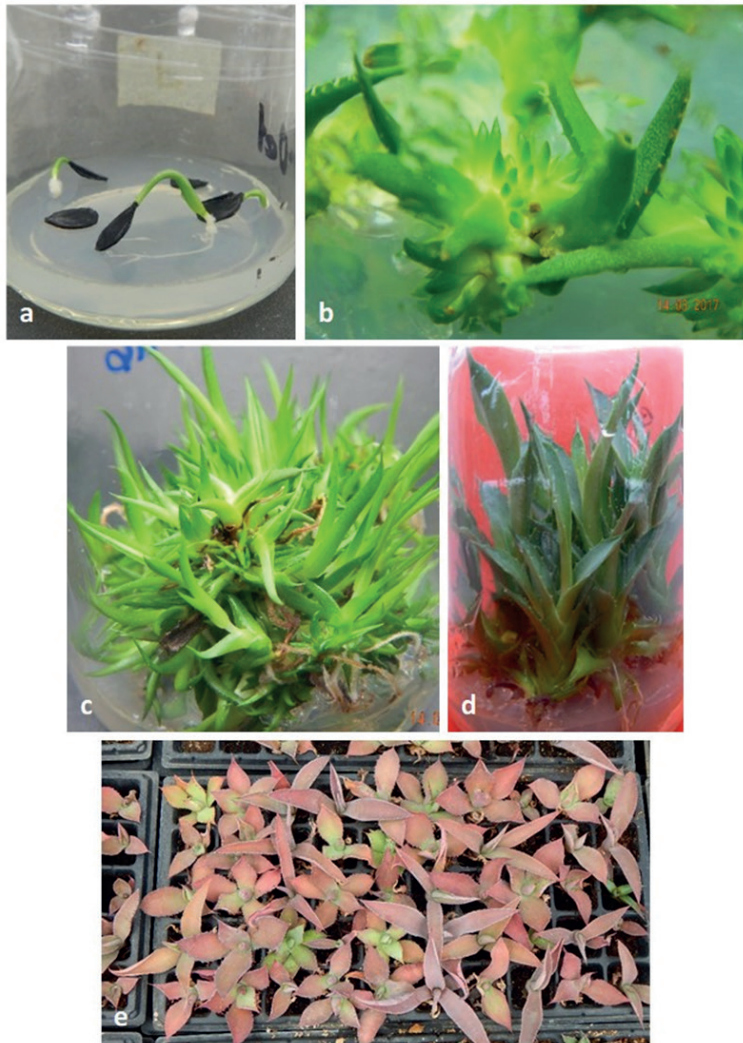


Figura 1.4. Micropropagación de Agaves. A) Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Agave potatorum* a través de la germinación de semillas desinfectadas.; b) Multiplicación: Aspecto inicial de la generación de brotes en un meristemo basal de *A. kerchovei*; c) Aspecto avanzado de la generación de brotes en un meristemo basal de *A. peacocki*; d) Enraizamiento y crecimiento de brotes de *A. palmeri*; e) Plantas micropropagadas de *A. potatorum* desarrollándose ya en suelo.

A continuación, se detallan las más importantes:

- a. La humedad relativa dentro de los recipientes de cultivo es siempre alta, lo que provoca que las plantas carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua. Su cutícula esta poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado. Por ello, el proceso de adaptación al ambiente externo de una planta generada *in vitro* debe ser lo más gradual posible. Se recomienda una reducción lenta de la humedad relativa, primero en el recipiente de cultivo y luego fuera de éste para permitir así el desarrollo paulatino de los sistemas de protección de la planta contra la desecación.
- b. Las plantas durante su cultivo *in vitro* no realizan una fotosíntesis normal, sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo. El paso de estas plantas hacia la autotrofia debe ser gradual, exponiéndoseles a incrementos paulatinos en la intensidad luminosa. De cualquier forma, es de esperarse un balance negativo en la adquisición de carbono durante las primeras semanas a partir de que se eliminó el medio de cultivo, las plantas deberán ser lo suficientemente vigorosas para soportar esto.
- c. Por tratarse de sistemas de cultivo axénicos, las plantas no han generado resistencias naturales contra los microorganismos patógenos, por lo que es recomendable trabajar durante las primeras fases de la adaptación bajo las condiciones más higiénicas posibles. Asimismo, se recomienda eliminar cualquier remanente del medio de cultivo que pudiera quedar adherido a la planta, ya que este por su alto contenido de sacarosa podría favorecer el crecimiento de estos microorganismos. Darles a las plantas generadas *in vitro* un tratamiento con un enraizador comercial al momento de sembrarlas en suelo suele hacer más eficiente el proceso. Estos productos contienen como ingrediente activo auxinas que aceleran el desarrollo de las raíces ya en suelo, pero también contienen fungicidas, que evitan la penetración al tejido de hongos fitopatógenos en este momento crítico para la supervivencia de la planta.

Una evidencia para determinar el momento en que la adaptación puede considerarse exitosa es el reinicio del crecimiento después de la transferencia a las condiciones *ex vitro*. En este momento es cuando deberá reducirse la humedad e incrementarse la luz. La eficiencia de adaptación de las plantas

generadas *in vitro* a las condiciones externas es un factor determinante para la costeabilidad de un sistema de micropropagación.

- Finalmente, las ventajas de los sistemas de propagación *in vitro* con respecto a los convencionales son:
- Se trata de un sistema de propagación clonal, mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado. Debido a esto es un sistema ideal para la multiplicación masiva de plantas con características sobresalientes o para la conservación del acervo genético de las especies silvestres.
- Debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambientes controlados, se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas. Por lo anterior no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales.
- El número de plantas que se puede obtener mediante esta tecnología es prácticamente ilimitado. El único límite que se puede tener es la capacidad misma del laboratorio en que se realiza el proceso.
- El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que puede realizarse el proceso es considerablemente más corto en comparación con los métodos convencionales de propagación.
- Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides. Por este motivo, las plántulas producidas mediante sistemas de micropropagación presentan una mayor calidad si se les compara con las obtenidas por métodos tradicionales.

La micropropagación es susceptible de combinarse con otras tecnologías de vanguardia con el fin de generar sistemas productivos completos más eficientes. Ejemplo de esto son las combinaciones micropropagación-microinjerto, micropropagación-hidroponia y micropropagación-aeroponia.

Protocolos

Protocolo 1.1

Preparación de medio de Murashige y Skoog para el cultivo de tejidos vegetales.

La forma más sencilla de preparar el medio de cultivo es partir de una serie de soluciones concentradas que aportan uno o varios de los compuestos que lo integran. Estas soluciones se preparan con anticipación y se tienen disponibles en el laboratorio, almacenadas a 4-5 °C. Para preparar el medio, las soluciones se mezclan en agua destilada en la proporción que se indica más adelante. Posteriormente se añaden compuestos que van en concentraciones mayores, como los nitratos y la sacarosa. Después de esto se ajusta el pH y en caso de medios semisólidos se añade y funde el gelificante.

Soluciones concentradas para la preparación del medio MS

SOLUCION A.		
Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL		
Cloruro de calcio	CaCl ₂ - 2 H ₂ O	22.000 g
SOLUCION B.		
Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL		
Yoduro de potasio	KI	41.50 mg
Cloruro de cobalto	Co Cl ₂ - 6 H ₂ O	1.25 mg
SOLUCION C.		
Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL		
Fosfato monobásico de K	KH ₂ PO ₄	3.400 g
Ac. bórico	H ₃ BO ₃	0.124 g
Molibdato de sodio	NaMoO ₄	0.005 g

SOLUCION D.

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Sulfato de magnesio	$MgSO_4 - 7 H_2O$	7.400 g
Sulfato de manganeso	$Mn SO_4 - H_2O$	0.340 g
Sulfato de zinc	$Zn SO_4 - 7 H_2O$	0.172 g
Sulfato de cobre	$Cu SO_4 - 5 H_2O$	0.50 mg

SOLUCION E.

Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL

Sulfato ferroso	$Fe SO_4 - 7 H_2O$	0.557 g
EDTA disódico	Na_2EDTA	0.745 g

Disolver ambos componentes por separado, para lo cual puede requerirse calentar. Agregar poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y aforar. Debe quedar de color amarillo sin precipitados.

SOLUCION F.

Concentración 100 X. Volumen: 100 mL

Glicina	20.00 mg
Piridoxina HCl	5.00 mg
Ac. nicotínico	5.00 mg
Tiamina HCl	1.00 mg
Mio inositol	1.00 g

Procedimiento para preparar 1 L de medio MS*Material de laboratorio*

Vaso de precipitados de 1 L, pipetas, recipientes de cultivo y tapas.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, balanza analítica, potenciómetro, horno de microondas, autoclave.

Reactivos

Soluciones concentradas del medio MS, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sacarosa, agar u otro gelificante, NaOH y HCl 0.1 N para ajustar pH.

Procedimiento

- Tomar un vaso de precipitados de 1 L con unos 850 mL de agua destilada y colocar bajo agitación suave. Agregar la cantidad indicada de las soluciones concentradas.

Solución	Volumen mL
A	1.0
B	1.0
C	2.5
D	2.5
E	5.0
F	10.0

- Pesar, añadir y agitar hasta disolver, los siguientes compuestos:

a	Sacarosa	30.00 g
b	Nitrato de potasio	1.90 g
c	Nitrato de amonio	1.65 g

- Ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N. Aforar a 1 L con agua destilada.
- Añadir 8 g L⁻¹ de Agar como gelificante¹ y agitar para suspender. En caso de que se requiera medio líquido omitir este paso.
- Disolver el gelificante calentando el medio en horno de microondas hasta el punto de ebullición y posteriormente agitando (debe hacerse en varios ciclos hasta que ya no sean visibles partículas suspendidas del gelificante).

¹ Se puede substituir por goma gellam (Phytigel, Gelrite o Gelzan, marcas comerciales) usando 2-3 g L⁻¹. Dependiendo de la especie a cultivar y la respuesta buscada un tipo de gelificante puede ser más eficiente que otro.

6. En caso de que el medio lleve reguladores del crecimiento, agregarlos en este momento².
7. Verificar el volumen del medio ya que pudo haber pérdida por evaporación. De ser así, aforar nuevamente a 1 L.
8. Distribuir el medio en los recipientes de cultivo, taparlos, marcarlos y esterilizar a 121 °C por 15-20 min³.
9. Sellar los recipientes con el medio estéril y almacenarlos hasta su uso. Si el medio no contiene reguladores del crecimiento se recomienda usarlo dentro de las siguientes 72 h, si los contiene no debe almacenarse más de 24 h.

Protocolo 1.2

Desinfección y germinación *in vitro* de semillas para el establecimiento de cultivos de tejidos vegetales

Material biológico

Semillas.

Material de laboratorio

Vaso de precipitados de 250 mL, probetas, papel aluminio, cribas metálicas y pinzas de disección.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, campana de flujo laminar.

Reactivos

Blanqueador comercial (Cloralex), etanol al 70%, jabón antiséptico líquido (Dermocleen), tween 20, agua destilada, agua destilada estéril.

2 En caso de reguladores termolábiles se esterilizan por filtración y se agregan al medio ya esterilizado y tibio.

3 Depende del volumen de medio en cada recipiente. Hasta 50 ml esterilizar 15 min, volúmenes mayores esterilizar 20 min.

Medio de cultivo

Medio de Murashige y Skoog (MS) pH 5.7 con 3 % de sacarosa y 0.8 % de agar como gelificante. Ver protocolo 1.1.

Procedimiento

1. Seleccionar semillas limpias y sin daño, colocarlas en un vaso de precipitados de 250 mL.
2. Dar 2 lavados de 5 min c/u con agua corriente con jabón líquido Dermoclean (10 mL L⁻¹). Los lavados se dan colocando el vaso de precipitados en el agitador magnético y agitando a velocidad media. Pasados los 5 min se elimina la solución de lavado⁴ y se substituye por solución nueva y se repite el proceso.
3. Lavar con etanol al 70% por 45 seg.
4. Enjuagar con agua corriente hasta eliminar todo el etanol.
5. Desinfectar con cloralex diluido al 15% adicionado con 5-10 gotas de tween 20 por 20 min. Tapar el vaso de precipitados con papel aluminio y no abrir hasta estar en la campana de flujo laminar.
6. Ya en la campana de flujo laminar, decantar la solución de cloralex y enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril.
7. Distribuir las semillas en los recipientes con medio MS. No colocar más de 10 semillas por recipiente de cultivo.
8. Sellar y marcar cada uno de los recipientes de cultivo anotando la fecha y nombre de la especie.
9. Llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.
10. A los 5-7 días eliminar los frascos contaminados de cada tratamiento⁵.

4 En el caso de semillas pesadas al detener la agitación se acumularán en el fondo del vaso y las soluciones se eliminan por decantación. En semillas menos densas que flotan. Debe utilizarse una criba o coladera para eliminar las soluciones reteniendo a las semillas.

5 En caso de detectarse tasas de contaminación superiores al 20% de los recipientes en un lote de semillas, se recomienda usar un método de desinfección más severo en las siembras subsecuentes. Las opciones que se pueden probar son: a) Incrementar el número y/o tiempo de los lavados iniciales, puede incorporarse un fungicida y prolongar el tiempo del primer lavado hasta toda la noche; b) Incrementar el tiempo de exposición al desinfectante a base de cloro hasta 30 min, no se recomienda incrementar la concentración del desinfectante, y; c) Inocular a una densidad más baja para que una semilla contaminada no afecte a otras. Se pueden utilizar tubos de ensayo como recipientes de cultivo e inocular una sola semilla por tubo.

11. Dependiendo de la especie, la germinación puede ocurrir a las 2-8 semanas. Se debe permitir que las plántulas crezcan hasta alcanzar al menos 1 cm para utilizarlas como fuente de explantes para otros procedimientos.

Protocolo 1.3

Propagación *in vitro* de plantas ornamentales de la familia Gesneriaceae

En este protocolo se presenta el proceso completo de micropropagación de plantas de ornato de la familia Gesneriaceae, esto tomando como base las cinco etapas descritas en el texto.

A. Etapa 0. Selección de la planta madre

Este protocolo es eficiente para violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) y gloxínea (*Sinningia speciosa*). Deben seleccionarse plantas con hojas sanas, sin manchas o heridas. Dado que el valor ornamental de estas especies radica en sus flores, es importante que se conozcan las características de las mismas en los ejemplares seleccionados. Dado que se llevará a cabo una propagación clonal, es importante partir de plantas elite de alto valor.

B. Etapa 1. Establecimiento de cultivos in vitro a partir de tejidos vegetativos

C. Etapa 2. Multiplicación (Organogénesis)

Material biológico

Plantas sanas de violeta africana o gloxínea

Material de laboratorio

Vaso de precipitados de 250 mL, probeta, papel aluminio, cajas Petri o placas de vidrio estériles y equipo de disección.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, campana de flujo laminar.

Reactivos

Blanqueador comercial (Cloralex), etanol al 70%, jabón antiséptico líquido (Dermocleen), tween 20, agua destilada, agua destilada estéril.

Medio de cultivo

Medio de cultivo MS con 3% de sacarosa, 2.5 g L⁻¹ de Phytigel o gelrite como gelificante y los siguientes reguladores del crecimiento: 2 mg L⁻¹ de AIA + 1 mg L⁻¹ de BA

Procedimiento

1. Seleccionar 5-7 hojas sanas (sin heridas ni decoloraciones) de violeta africana o 3-5 de gloxínea (con pecíolo). Lavar las hojas varias veces con agua corriente y jabón líquido antiséptico. El lavado se hace bajo la llave de agua, a mano y muy suavemente, sin ejercer presión sobre la hoja.
2. Colocar las hojas lavadas por 30 seg en etanol al 70 %. Verificar que queden cubiertas por completo y agitar manualmente de forma suave. Es muy importante no sobrepasar el tiempo recomendado.
3. Eliminar el etanol y enjuagar rápidamente con agua destilada estéril.
4. Colocar las hojas en una solución de blanqueador comercial a base de hipoclorito (Cloralex) al 10 % con 4-5 gotas de tween 20 por 20 min. Esto en un vaso de precipitados⁶ bien tapado con papel aluminio y bajo agitación suave con agitador magnético (cuidando que el magneto no dañe las hojas). Llevar a la campana de flujo laminar.
5. En la campana de flujo laminar, eliminar la solución desinfectante y enjuagar tres veces con agua destilada estéril. De aquí en adelante sólo se pueden tocar las hojas con equipo de disección estéril.

6 El vaso de precipitados debe ser de un tamaño suficiente para que las hojas se muevan libremente dentro del mismo sin ser golpeadas por el magneto.

6. Colocar la hoja desinfectada sobre una caja Petri o placa de vidrio estéril, con el envés hacia arriba. Con ayuda de pinzas y bistrurí estériles, cortar en el siguiente orden:
 - a. Apoyando la pinza en el peciolo, no en la lámina de la hoja, hacer una serie de cortes rectos para eliminar todo el borde de la hoja.
 - b. Hacer uno o más cortes rectos y perpendicular a la nervadura central en cada mitad de la hoja, dividiendo la lámina en dos o más partes (cada segmento de unos 20 mm de ancho, el número de segmentos dependerá del tamaño de la hoja).
 - c. Finalmente, cortar a lo largo de la vena central para liberar los segmentos de lámina foliar.
7. Los polígonos de hoja obtenidos son los explantes a inocular en el medio de cultivo. El número final de explantes a obtener por cada hoja dependerá de su tamaño. Si alguno de los explantes presenta zonas dañadas descartarlo.
8. Inocular los frascos de medio de cultivo con dos polígonos de hoja cada uno, colocarlos con el envés hacia arriba. Procurar no presionar demasiado con la pinza al tomarlos.
9. Marcar cada uno de los recipientes de cultivo y llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.
10. Revisar a los cuatro días y eliminar los frascos contaminados.

El resultado esperado de este proceso es que ocurra la organogénesis en los segmentos de hoja, formándose un gran número de brotes adventicios. Normalmente la mayoría aparecen en los bordes cortados de las hojas (Figura 3b) y comienzan a ser visibles a las 2-3 semanas de incubación.

D. Etapa 3. Crecimiento y enraizamiento.

Para llevar a cabo esta etapa, los cultivos deben presentar brotes adventicios de al menos 15 mm de altura.

Material biológico

Explantes con brotes adventicios producto de la etapa anterior del protocolo.

Material de laboratorio

Cajas Petri o placas de vidrio estériles y equipo de disección.

Equipo de laboratorio

Campana de flujo laminar.

Medio de cultivo

Medio de cultivo MS con 3% de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de Phytigel o gelrite como gelificante.

Procedimiento

Todo el procedimiento se realiza en campana de flujo laminar con equipo de disección estéril.

1. Sacar los explantes con brotes y colocarlos sobre una caja de Petri o lámina de vidrio estéril.
2. Ubicar los brotes y separarlos del explante original cortándolos desde su base con el bisturí.
3. Inocular los brotes en posición vertical en el medio de cultivo. Introducir la base del brote al medio para que quede fijo en dicha posición. Colocar 4-6 brotes por recipiente de cultivo.
4. Marcar cada uno de los recipientes de cultivo y llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.

El resultado esperado es la formación de raíces en la base de cada brote, mismas que penetrarán y crecerán hacia el medio de cultivo. Al mismo tiempo, la parte aérea de los brotes debe crecer. La aparición de raíces debe ser visible a partir de la segunda semana de incubación.

E. Etapa 4. Adaptación y transferencia al medio externo.

Material biológico

Cultivos con plántulas enraizadas generados en la etapa anterior.

Materiales

Charolas de plástico, cajas Petri, macetas, sustrato para siembra (mezcla preparada para macetas comercial), enraizador comercial (por ejemplo, Rai-zone®), bolsas de plástico.

Procedimiento

1. Llenar las macetas con el sustrato y humedecerlo.
2. Quitar el sello de los recipientes de cultivo. Quitar la tapa, pero inmediatamente volverla a colocar pero ya sólo superpuesta (sin apretar o enroscar). Dejar los frascos en estas condiciones por una o dos semanas semana. Esto con el fin de que el recipiente de cultivo pierda humedad paulatinamente y las plantas puedan adaptarse al ambiente externo. Es normal que después de varios días de haber destapado el recipiente aparezcan contaminantes como hongos. En caso de detectarse esto, proceder de inmediato con el paso 2.
3. Con ayuda de pinzas, sacar las plantas del recipiente de cultivo tomándolas desde su base y colocarlas en una charola de plástico. Hacer esto con cuidado de no dañar las raíces en el proceso. A partir de este momento las plantas deben manipularse directamente con las manos ya que las pinzas las dañan en los puntos en que se ejerce presión.
4. Lavar cuidadosamente la parte basal de las plantas bajo el chorro de agua corriente para eliminar todos los restos de medio de cultivo de las raíces⁷.
5. Pasar la parte basal/raíces de las plantas por una caja Petri con polvo enraizador de forma tal que se impregnen con el mismo y luego sacudir el exceso. Evitar que éste entre en contacto con la parte apical de la planta.

7 El medio de cultivo contiene sacarosa y otros nutrientes. Si las plantas se siembran con restos de medio esto ocasionará la proliferación de hongos en el sustrato, mismos que puede dañar y matar a la planta.

Este tratamiento acelera el establecimiento de la planta al promover el crecimiento de las raíces. Además, este producto contiene fungicidas que evitan que la planta sea infectada por hongos durante su establecimiento. Este producto es ligeramente tóxico, ver las instrucciones de manejo en el recipiente.

6. Introducir las raíces y la parte basal de las plantas en un orificio previamente hecho en el sustrato. Compactar el sustrato una vez colocada la planta.
7. Colocar las macetas dentro de bolsas de plástico y sellarlas para mantener la humedad. Llevar al invernadero o a un lugar bien iluminado pero sin sol directo.
8. Cada 3-4 días hacer algunos orificios en las bolsas plásticas para que se vaya equilibrando la humedad dentro y fuera de las mismas. Retirar por completo las bolsas a los 15 días.
9. A partir de este momento darles un manejo normal a las plantas, con riegos cada 72 h.

Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: 2-isopentiladenina

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido indolbutírico

ANA: Ácido naftalenacético

B5: Medio de cultivo de Gamborg

BA: Benciladenina

DKW: Medio de cultivo de Driver y Kuniyuki

GA3: Ácido giberélico

LS: Medio de cultivo de Linsmaier y Skoog

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog

NN: Medio de cultivo de Nitsch y Nitsch

Picloram: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico

Tidiazurón: N-fenil-N`-1,2,3-tidiazolil-5-urea

WPM: Medio de cultivo de Lloyd y McCown

Glosario

Axénico: Libre de cualquier microorganismo contaminante.

Explante: Segmento de tejido vegetal que se utiliza para iniciar un nuevo cultivo

Macronutrientes minerales: Son los iones que la planta toma del suelo y son requeridos en concentraciones de medias a altas.

Micronutrientes minerales: Son los iones que la planta toma del suelo y son requeridos en muy bajas concentraciones.

Bibliografía

- Ashrafzadeh, S., Leung, D.M.W. (2015). In vitro breeding of heavy metal-resistant plants: A review. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56, 131-136.
- Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, New Delhi, 309 pp.
- Cardoso, J.C., Sheng-Gerald, L.T., Teixeira da Silva, J.A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1815*, Springer Science+Business Media, pp 17-46.
- Cheng, Z.M., Korban, S.S. (2011). In vitro ploidy manipulation in the genomics era. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104:281-282.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y. (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659-668.
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortSci* 19:507-509.
- Elmaghrabi, A.M., Ochat, S., Rogers, H.J., Francis, D. (2013) Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 114:61-70.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 47:5-16.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.

- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32:272-28.
- Grosser, J.W., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O. (2000). Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36:434-449.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 18: 100-127.
- Lloyd, G., McCown, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Int Plant Propagator Soc* 30:421-427.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- Nuñez-Palenius, H.G., Cantliffe, D.J., Klee, H.H., Ochoa-Alejo, N., Ramírez-Malagón, R., Perez-Molphe-Balch, E. (2006) Methods in Plant Tissue Culture. In: N.S. Pandian (Ed). *Food Biotechnology, 2nd Edition*. CRC Taylor & Francis, New York. pp. 553-601.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 968-6259-62-7.
- Perez-Molphe-Balch, E., Esparza-Araiza, M.J., Pérez-Reyes, M.E. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:279-287.
- Quambusch, M., Winkelmann, T. (2018). Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1815, Springer Science+Business Media, pp 69-88.
- Rocha, D.I., Melo-Vieira, L., Koehler, A.D., Campos-Otoni, W. (2018). Cellular and Morpho-histological Foundations of *In Vitro* Plant Regeneration. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1815, Springer Science+Business Media, pp 47-68.
- Widholm, J.M. (2017). The selection and uses of plant tissue cultures resistant to toxic compounds. In *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 53:515-519.



Capítulo 2

Propagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal

Lucia Isabel Chávez Ortiz
Mitzy Estefanía Rodríguez Ortega
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

El uso de medios de cultivo líquidos y biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales tiene varias ventajas sobre el uso de medios semisólidos, y se puede obtener una mayor cantidad de biomasa o de brotes reduciendo los costos de producción, ya que los agentes gelificantes son el componente más costoso del medio de cultivo. Sin embargo, también conlleva algunas dificultades, como el aumento en la frecuencia de hiperhidratación de los tejidos y el efecto cizalla. Estos inconvenientes se reducen significativamente con el uso de biorreactores de inmersión temporal (BIT), cuyo uso disminuye el estrés mecánico y permite la completa renovación de la atmósfera al interior del recipiente de cultivo. Previo a la micropropagación de una especie vegetal en biorreactores, se debe contar con un eficiente

protocolo de propagación *in vitro* en medio semisólido que permita conocer el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) óptimos para la especie estudiada, y después se implementan las mismas condiciones en los biorreactores, omitiendo el uso de agentes gelificantes. Se efectuó la micropropagación de *Hetheroteca inuloides* y *Ruta chalepensis* en biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos; en ambas especies se logró un incremento en la generación de brotes.

Cultivo de tejidos vegetales en medios líquidos

En general, para el cultivo de tejidos vegetales se emplean medios de cultivo semisólidos; sin embargo, desde hace varias décadas se comenzó a explorar el uso de medios de cultivo líquidos, debido a las ventajas que suponen respecto al uso de medios semisólidos, entre ellas:

1. Permiten que el explante tenga una mayor superficie de contacto con el medio de cultivo, con lo que se logra un incremento en la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal.
2. Las sustancias exudadas por el propio explante, que en ocasiones tienen efectos inhibitorios e incluso deletéreos en los tejidos vegetales, se diluyen en el medio líquido, reduciendo su efecto negativo.
3. Hay una reducción importante en los costos de producción, puesto que se prescinde del uso de gelificantes, los cuales son el componente más costoso de los medios de cultivo semisólidos.
4. Permiten una regulación más precisa de factores físicos y químicos, son susceptibles de ser automatizados y pueden escalarse con relativa facilidad.

Aunque se han empleado medios líquidos en recipientes de cultivo estándar sin agitación, en la mayoría de los casos se requiere el uso de biorreactores, que según Mamun *et al.* (2015) se pueden describir simplemente como “sistemas cerrados, estériles para la propagación clonal de propágulos organogénicos o embriones somáticos”. Así pues, un biorreactor puede ser desde un simple recipiente de vidrio o plástico en agitación, hasta diseños muy complejos, con componentes más sofisticados.

Biorreactores de inmersión permanente

Se han diseñado distintos tipos de biorreactores de inmersión permanente, en los que los explantes se encuentran inmersos en el medio líquido todo el tiempo. Los biorreactores deben contar con mecanismos de agitación y aireación para el adecuado desarrollo de los tejidos vegetales, ya que una tasa adecuada de oxigenación generalmente promueve un aumento en la tasa de acumulación de biomasa; también se ha observado que una agitación adecuada brinda uniformidad en las condiciones de cultivo, con lo que se reduce el fenómeno de dominancia apical, aumentando la tasa de brotación de yemas. Algunos biorreactores de inmersión permanente tienen dispositivos de agitación mecánica (tanques de aireación y tanques de tambor rotatorio, por ejemplo) y otros, agitación neumática (como los de columna de burbujas y *airlift*). Estos sistemas han sido empleados principalmente para el cultivo de células vegetales desdiferenciadas, pero también se han utilizado para micropropagar algunas especies. Los principales inconvenientes de estos biorreactores son:

- a) el efecto cizalla, que puede causar daños considerables a los tejidos vegetales, especialmente a las estructuras más delicadas, como los meristemos, lo que los hace poco recomendables para el cultivo de tejidos organizados y plantas completas,
- b) que la mayoría de las especies vegetales de interés para el cultivo de tejidos vegetales son terrestres, y permanecer en condiciones de inmersión les resulta dañino.

En los sistemas de inmersión permanente es frecuente que se presenten desordenes morfológicos y fisiológicos serios; el más común es la hiperhidratación de los explantes y brotes. Las plantas hiperhidratadas tienen una apariencia vítrea, ya que sus tejidos están hinchados, translúcidos y deformes como resultado de una reducción en el contenido de clorofila y a la desorganización, incluso desaparición, de los cloroplastos. También se presenta hipolignificación, reducción de la capa cérica de la cutícula y hay cambios significativos en la actividad enzimática. Este fenómeno se puede atribuir al estrés oxidativo que sufren los tejidos debido a la inmersión permanente en el medio líquido; como resultado, se presenta un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno y radicales

superóxido e hidroxilo, a los que se atribuyen daños a las membranas celulares, degradación de proteínas, inactivación de enzimas y daños al ADN.

Biorreactores de inmersión temporal

Como alternativa ante la alta incidencia de la hiperhidratación debido a la inmersión permanente, se planteó la inmersión de los explantes en el medio líquido de manera intermitente. Además de ello, el uso de sistemas de inmersión temporal permite la completa renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo y disminuye el estrés mecánico en comparación a otros tipos de biorreactores.

En muchos sistemas de inmersión temporal el medio líquido se encuentra en un recipiente distinto al que contiene a los explantes, o bien, en un compartimiento distinto dentro del mismo recipiente de cultivo; el medio es bombeado de un recipiente o compartimiento a otro por medios neumáticos. Considerando que la disponibilidad de oxígeno en medios líquidos depende tanto de la concentración de oxígeno en la atmósfera interna del recipiente, como del oxígeno disuelto en el propio medio, los sistemas de bombeo del medio líquido de los biorreactores de inmersión temporal provocan una renovación total de la atmósfera del recipiente de cultivo, lo que impide que se presente una depleción de oxígeno y favorecen su disolución en el medio de cultivo.

Sistema de tanques gemelos

El biorreactor idóneo debería tener un diseño muy simple, con pocas aperturas para reducir el problema de la contaminación, y tener un bajo costo. Se han diseñado varios sistemas de inmersión temporal; particularmente, el sistema de tanques gemelos reportado por Escalona *et al.* (1999) tiene un diseño simple que resuelve de manera eficiente todos los aspectos cruciales en el diseño de un sistema de inmersión temporal; además puede ser construido a un costo muy bajo y permite un control total sobre las frecuencias y tiempos de inmersión.

Este sistema consta de dos recipientes de cultivo conectados entre sí mediante una manguera; el primer recipiente es el reservorio que contiene al medio de cultivo líquido, y el segundo recipiente contiene a los explantes.

El líquido se mueve del primer al segundo recipiente al bombear aire a través de un filtro hidrofóbico; el retorno del medio líquido del recipiente con los explantes al reservorio se realiza del mismo modo.

El sistema de tanques gemelos puede adecuarse a las necesidades y a los recursos disponibles, ya que puede construirse con materiales sencillos, de bajo costo y fáciles de conseguir; o si se cuenta con más recursos, se pueden emplear dispositivos más sofisticados para automatizar el sistema y controlar parámetros físicos:

- Se pueden emplear frascos de vidrio o recipientes de plástico de diferentes capacidades para contener al medio y a los explantes, dependiendo de los requerimientos de experimentación o producción.
- Para inyectar aire y transferir el medio líquido de un recipiente a otro se pueden utilizar pequeñas bombas de pecera para proveer la aireación de uno a tres biorreactores; o bien, compresores de aire para alimentar un gran número de sistemas, empleando electroválvulas para controlar el flujo de aire y las frecuencias de inmersión en distintos biorreactores.
- Para el control de los tiempos y frecuencias de inmersión se pueden emplear temporizadores digitales sencillos; o microcontroladores programados y controlados desde una computadora personal o desde una tableta digital.

Estableciendo un protocolo de micropropagación en sistemas de inmersión temporal

Antes de implementar un protocolo de micropropagación de una especie vegetal en biorreactores, se debe desarrollar un protocolo de micropropagación en medio semisólido para determinar las mejores condiciones de cultivo para lograr la propagación masiva *in vitro*; una vez que se conozcan el medio de cultivo apropiado, así como el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal adecuados, estas condiciones se replican en los biorreactores de inmersión temporal; en otras palabras, se emplea una composición idéntica del medio de cultivo, excepto que no se le agrega gelificante. De este modo la única variable que se introduce de manera inicial es el uso de los biorreactores y del medio líquido, y se podrá observar en un primer momento si con el siste-

ma de inmersión temporal se consiguen resultados similares en comparación al medio semisólido.

Como ya se ha señalado, el tiempo y frecuencia de inmersión son parámetros fundamentales que varían entre especies (Tabla 2.1), y pudieran estar relacionados con los requerimientos hídricos de las plantas en su ambiente natural. Estos parámetros se deben determinar para cada especie; como punto de partida es aconsejable referirse a los datos de especies lo más cercanamente emparentadas que estén disponibles, o bien, con requerimientos hídricos similares.

Tabla 2.1. Ejemplos de los tiempos y frecuencias de inmersión empleados en algunas especies vegetales para su propagación *in vitro* en sistemas de inmersión temporal.

Especie	Referencia	Tipo de biorreactor	Inmersión	
			Tiempo	Frecuencia
Especies herbáceas				
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Thi <i>et al.</i> , 2019	TIS Plantima *	30 s	8 h
<i>Guarianthe skinneri</i> (Bateman) Dressler et W. E. Higging	Leyva-Ovalle <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	2 min	4 h
<i>Jeffersonia dubia</i> (Maxim.) Benth et Hook	Jeong y Sivanesan, 2016	TIS Plantima *	30 s	30 min
Híbridos de <i>Saccharum</i> spp.	Martínez-Rivero <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	4 min	3 h
<i>Musa</i> AAA x Grand Naine	Bello-Bello <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	4 min	4 h
Especies leñosas				
<i>Citrus x latifolia</i> (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka	Bulbarela-Marini <i>et al.</i> , 2019	RITA *	5 min	4 h
<i>Prunus avium</i> L.	Godoy <i>et al.</i> , 2017	Tanques gemelos	3 min	8 h
<i>Pistacia vera</i> 'Siirt', <i>P. atlántica</i> Desf. y <i>P. khinjuk</i>	Akdemir <i>et al.</i> , 2014	RITA *	24 min	16 h
<i>Salix viminalis</i>	Regueira <i>et al.</i> , 2019	RITA *	1 min	4 h
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Arencibia <i>et al.</i> , 2018	Tanques gemelos	3 min	8 h

Al registrar y analizar las respuestas de los explantes cultivados en sistemas de inmersión temporal, se debe poner especial atención a la proporción de brotes hiperhidratados; para disminuir este problema una de las primeras

alternativas a las que se puede recurrir es reducir el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión o ambos. Al bombear el medio del recipiente que contiene los explantes al recipiente que funciona como reservorio, siempre quedará una película de líquido sobre las plantas, lo que no siempre resulta positivo para los cultivos vegetales; así que otra estrategia que ha funcionado en algunas especies como *Olea europaea* y *Rhodiola crenulata*, por mencionar un par de ejemplos, es administrar lo que se conoce como ventilación adicional o ciclos secos, que consiste en bombear solo aire al recipiente que contiene a los explantes, en periodos intercalados con las inmersiones en medio líquido. Esto permite reducir la película de medio líquido que queda sobre los explantes, así como renovar con más frecuencia la atmósfera interna del biorreactor.

Una vez que se conocen los tiempos y frecuencias de inmersión apropiados para la especie estudiada, se pueden evaluar distintas concentraciones de RCVs, pues como se ha mencionado, la disponibilidad y por lo tanto eficacia de los mismos es mayor en medios líquidos que en medios semisólidos, y en principio cabe la posibilidad de obtener resultados equiparables o mejores con menores concentraciones de RCV, aunque esto se debe verificar experimentalmente para cada especie.

Protocolos

Protocolo 2.1

Protocolo para la propagación en biorreactores tipo tanque gemelo de *Heterotecha inuloides* y *Ruta chalepensis*; plantas herbáceas muy empleadas en la medicina tradicional. Para poder recuperar y validar estos conocimientos ancestrales, es necesario revisarlos con un riguroso enfoque científico. Para realizar estudios posteriores, es muy útil contar con sistemas de propagación *in vitro* que permitan obtener una gran cantidad de material vegetal en poco tiempo, además de que, en caso de encontrar compuestos de interés, posteriormente estos mismos sistemas de cultivo *in vitro* podrán facilitar la búsqueda de estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, la adición de elicitores al medio de cultivo.

Material

1. Cultivos *in vitro* de *H. inuloides* y *R. chalepensis*.
2. El medio de cultivo basal empleado fue MS, según la fórmula original de Murashige & Skoog (1962). Los medios empleados fueron:
 - Control: Medio basal adicionado con 8 g L⁻¹ de agar.
 - Para *H. inuloides*: tratamiento 1 (medio basal) y tratamiento 2 (Medio adicionado con 1 mg/L de ácido indolacético).
 - Para *R. chalepensis*: tratamiento 1 (medio basal) y tratamiento 2 (Medio adicionado con 0.1 mg/L de benciladenina).
3. Biorreactores tipo tanques gemelos, con recipientes de vidrio de 1 L de capacidad (Fig 1).

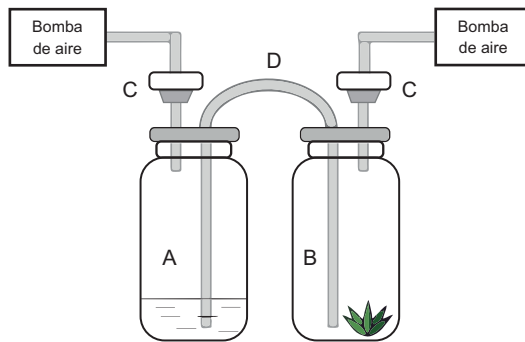


Figura 2.1. Esquema de biorreactor de inmersión temporal de tipo tanques gemelos.

El recipiente A es el reservorio del medio de cultivo; el recipiente B contiene a los explantes.

El aire bombeado al recipiente A pasa a través de un filtro hidrofóbico (C), presuriza el interior de A y empuja el medio líquido al recipiente B, a través de una manguera que conecta ambos recipientes (D). Al finalizar el tiempo de inmersión, se bombea aire al recipiente B para forzar al medio a regresar al recipiente A.

Todos los medios y los biorreactores fueron esterilizados en autoclave a 1.2 kg/cm² y 121 °C por 20 min.

Procedimiento

1. Todas las manipulaciones de BITs y explantes se llevaron a cabo en campana de flujo laminar, para garantizar condiciones axénicas.
2. A partir de los cultivos previamente establecidos *in vitro* de ambas especies, se obtuvieron segmentos nodales con al menos una yema.
3. En cada biorreactor se colocaron 100 ml de medio, según el tratamiento correspondiente, y cinco explantes.
4. Las condiciones de cultivo consistieron en una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, bajo lámparas fluorescentes de luz blanca. En el caso de los experimentos en biorreactores, se utilizó una inmersión de 5 min cada 3 h.
5. Después de 60 d de incubación se registró el número de brotes por explante.
6. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPrism®; se efectuó el test de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) y para comparar las medias se utilizó el test de Dunn.

Resultados

El empleo de biorreactores de inmersión temporal tuvo un efecto positivo en la propagación masiva de ambas especies (Fig. 2.2). En *H. inuloides* hay una diferencia estadísticamente significativa entre el uso de biorreactores y el uso de medios semisólidos; en este caso, no hubo diferencia significativa entre añadir o no AIA al medio de cultivo (Fig. 2.2). En el caso de *R. chalapensis* el uso de medio sin reguladores en biorreactores, o en sistemas tradicionales, no supone una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, adicionar BA al medio de cultivo, y al emplear biorreactores, hay un incremento en el promedio de brotes generados.

En ninguna de las dos especies se presentó hiperhidratación de los brotes ni de los explantes, por lo cual consideramos que el tiempo y frecuencia de inmersión que se utilizaron son los adecuados.

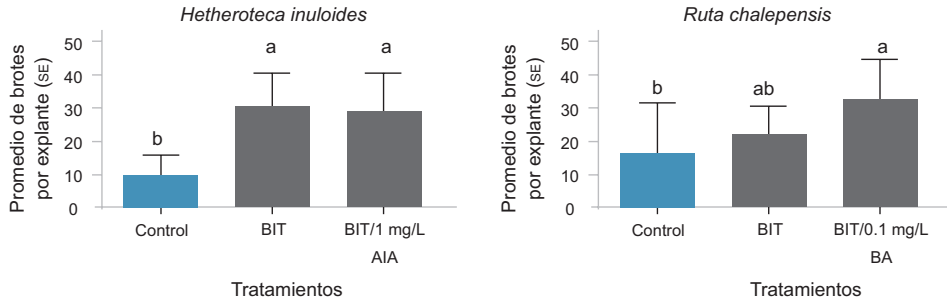


Figura 2.2. Promedio de brotes por explante en *H. inuloides* y *R. chalepensis*. Letras iguales indican que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos según el test de Dunn con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
 BA: benciladenina
 BIT: biorreactor de inmersión temporal
 RCV: reguladores de crecimiento vegetal

Bibliografía

- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y. & Çiftçi, Y.O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117: 65-76
- Afreen, F. (2008). Temporary immersion bioreactor. En *Plan Tissue Culture Engeneering*. (187-201). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Bello-Bello, J.J., Cruz-Cruz, C.A. & Pérez-Guerra, J.C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55,313-320
- Benelli, C. & De Carlo, A. (2018). *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv canino with temporary immersion system (Plantform™). *Biotech*, 8, 317.

- Berthouly, M. & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (165-195). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F.C., Galindo-Tovar, M.E., Solano-Rodríguez, L.A., Murguía-González, J., Pastelín-Solano, M.C., Nuñez-Pastrana, R. & Castañeda-Castro, O. (2019). The *in vitro* propagation system of *Citrus x latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (Rutaceae) affects the growth and depletion of nutrients. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 290-295
- Dewir, Y.H., Indoliya, Y., Chakrabarty, D. & Paek, K.Y. (2014). Biochemical and Physiological Aspects of Hyperhydricity in Liquid Culture System. En *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. (693-709). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Eibl, R. & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7, 593-598
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins, Y. & Borroto, C.G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748
- Georgiev, M.I. (2014). Design of Bioreactors for Plant Cell and Organ Cultures. En: *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. (3-15). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Godoy, S., Tapia, E., Seit, P., Andrade, D., Sánchez, E., Andrade, P., Almeida, A.M. & Prieto, H. (2017). Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 53, 494-504
- Jeong, B.R. & Sivanesan, I. (2016). Micropropagation, berberine content and antitumor activity of *Jeffersonia dubia* (Maxim.) Benth et Hook. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124, 453-458
- Leyva-Ovalle, O.R., Bello-Bello, J.J., Murguía-González, J. Núñez-Pastrana & R., Ramírez-Mosqueda, M.A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. *Biotech*, 10, 26.

- Li, F., Weng, J. (2017). Desmystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nature Plants*, 3, 17109.
- Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U. & Aidun, C.K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, 10:177
- Martínez-Rivero, A., Ramírez-Mosqueda, M.A., Mosqueda-Frómeta, O., Escalona-Morgado, M.M., Rivas-Paneca, M., Rodríguez-Escriba, R.C., Daquinta-Gradaille & Bello-Bello, J.J. (2020). Influence of Vitrofurul[®] on sugarcane micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141, 447-453
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E.J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (95-116). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B. Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C. & Nieves, V. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32, 61-71
- Takayama, S. & Akita, M. (2005). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (6-78). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Thi, L.T., Park, Y.G. & Jeong, B.R. (2019). Growth and development of carnation 'Dreambyul' plantlets in a temporary immersion system and comparisons with conventional solid culture methods. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 539-548
- Zhao, Y., Sun, W., Wang, Y., Saxena, P.K. & Liu, C. (2012). Improved Mass Multiplication of *Rhodiola crenulata* Shoots Using Temporary Immersion Bioreactor with Forced Ventilation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1480-1490
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. En *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (79-93). Dordrecht, Holanda: Springer.

Capítulo 3

Análisis de compuestos fitoquímicos

María de Lourdes de la Rosa Carrillo
Gerardo Castillo Vargas

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Desde que el hombre existe, ha dependido de las plantas para satisfacer la mayoría de sus necesidades y el estudio de éstas se ha incrementado de manera considerable al captar el interés de los investigadores con diversos fines como pueden ser el aumentar la producción de alimentos de origen vegetal, reforestación o descubrimiento de sustancias innovadoras para diferentes aplicaciones, siendo el área de la salud una de las más exploradas con ayuda de la fitoquímica, ciencia que permite conocer de manera integral, algunos de los muchos productos químicos naturales en las plantas. El análisis puede ser cualitativo, partiendo de una muestra de planta de interés, a la que, por medio de diferentes solventes, se le extraen diversos compuestos y en los extractos se realizan pruebas químicas que permiten identificar la presencia

de ciertos grupos de compuestos, esto se conoce como escrutinio fitoquímico y con el apoyo de métodos instrumentales se complementa el estudio al separar, identificar y cuantificarlos. Muchos de los compuestos de interés, son los metabolitos secundarios, compuestos producidos por las plantas que no tienen una función reconocida o concreta, pero sí una gran diversidad de aplicaciones. En este capítulo se presenta un protocolo para realizar el escrutinio fitoquímico preliminar de *Eryngium heterophyllum*, planta de uso medicinal, en la que se encontraron pequeñas diferencias en el contenido de algunos metabolitos secundarios al comparar muestras de planta propagada *in vitro* y *ex vitro*, demostrando que la biotecnología vegetal es una herramienta excelente para realizar investigación de manera sustentable.

Fitoquímica

Las plantas participan en ciclos biológicos, siendo indispensables para la supervivencia del hombre y estudiar sus compuestos da información que ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen lo que permite darles un mejor uso. Por otro lado, con el interés que ha despertado la medicina “naturista”, continuamente crece el número de publicaciones que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Desafortunadamente, la mayoría no están suficientemente documentadas ni alertan contra los posibles efectos colaterales por el uso indiscriminado de materiales vegetales. Paralelamente el interés ha evolucionado hacia el estudio científico de los componentes y efectos de las plantas que tradicionalmente muestran actividades biológicas interesantes. Con ayuda de la fitoquímica, se puede tener, de manera integral, el conocimiento de algunos de los muchos productos químicos naturales que pueden ser extraídos, separados, purificados y determinados fisicoquímicamente en las plantas. Estos se encuentran en la complejidad de las células vegetales no sólo como entidades químicas, sino también como productos de una serie de mecanismos que intervienen en su biogénesis, como sustancias activas que desempeñan una función en los procesos bioquímicos de las células o bien como elementos que pueden provocar alteraciones fisiológicas en humanos y animales. La aplicación terapéutica que los productos químicos naturales puede tener en el hombre y también su uso como materias primas de la industria alimentaria y químico farmacéutica son

de gran importancia social y económica. Es deseable tener claro el objetivo a lograr al momento de realizar un análisis fitoquímico. En ocasiones el interés es por estudiar una planta en particular para explorar sus componentes y en otros casos se busca un principio activo en particular, por ejemplo: alcaloides, saponinas, colorantes, aceites esenciales, etc. La búsqueda y colecta de plantas para su análisis requiere de experiencia y tiempo, implica viajar e incluso desplazarse por terrenos de difícil acceso, así como también se debe tener idea de la cantidad de material vegetal que se va a recolectar y que parte o partes de la planta son las más adecuadas. En un laboratorio para la investigación química, en el que se puede recibir gran cantidad de material vegetal para su análisis, el tiempo y costo requerido en cada estudio, puede llegar a tener una marcada diferencia si se realizan de manera conveniente pruebas preliminares, que permitan dar preferencia a las plantas de mayor provecho. En estos estudios preliminares se pueden usar muestras desde 1 a 1000 gramos y el análisis se puede orientar a localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. A finales del siglo XX, muchos de estos procesos requerían que se partiera de grandes cantidades de muestras biológicas (del orden de varios kilogramos), con procesos largos de fraccionamiento, purificación y caracterización. Estos procesos duraban inclusive años y se requería de varias personas trabajando de manera colaborativa en diferentes universidades o institutos de investigación.

Métodos de identificación

Los métodos más comunes para pruebas preliminares pueden ser:

- a) Histológicos: Observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados, etc.
- b) Químicos: Tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etc.
- c) Fisicoquímicos: Uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo, etc.
- d) Biológico: Efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etc.

En todos los casos es recomendable verificar el comportamiento de los reactivos y la reproductividad y limitaciones de las técnicas, empleando sustancias y extractos testigos. Para esto, es importante cuidar la calidad de los extractos, pues por lo general, son mezclas complejas de muchos metabolitos y los principales parámetros que se deben considerar y estos son:

- a) La planta: cualquier parte de la planta puede contener principios activos de interés y se puede usar planta fresca o seca.
- b) El solvente: el éxito en la determinación de compuestos biológicamente activos depende en gran medida del tipo de solvente que se usa, siendo los más comunes, para grupos de compuestos con propiedades similares de solubilidad de acuerdo a su estructura química: agua, acetona, alcohol (etanol, metanol), cloroformo y éter, un ejemplo de solvente específico para terpenoides es el diclorometanol.
- c) El procedimiento de extracción: el principio básico para una buena extracción es triturar finamente el material vegetal, húmedo o seco, para incrementar la superficie del área de extracción. Estudios anteriores muestran que la proporción de solvente a muestra de 10:1 (v/p) es adecuada. Los métodos más usados son: homogenización, extracción exhaustiva en serie, extracción Soxhlet, maceración, decocción, infusión, digestión, percolación, sonicación.

Actualmente las técnicas instrumentales han mostrado un gran avance en sus aplicaciones y permiten de una manera rápida y confiable el trabajo de caracterización de muchas sustancias naturales, inclusive las que están en muy baja concentración en las fuentes naturales, además de que presentan muchas ventajas como el uso de muestras más pequeñas, materiales y reactivos menos tóxicos y menor contaminación del ambiente al no hacer tanto uso de solventes orgánico como cloroformo, diclorometano, benceno, etc. Las técnicas más usadas son: espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopia infrarroja (IR), espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y sus diferentes variantes. Los métodos espectrofotométricos consisten básicamente en hacer reaccionar los metabolitos secundarios con reactantes que generen productos coloreados que puedan ser medidos por espectrofotometría en la región visible del espectro electromagnético. También se ha tenido éxito al ha-

cer la combinación de las técnicas de RMN y espectrometría de masas, junto con el uso de las bases de datos, facilitando así el análisis de los metabolitos ya conocidos o ayudando en el hallazgo de otros nuevos. Aunque estas técnicas han desplazado casi definitivamente el uso de los métodos clásicos, para muchos propósitos se utiliza todavía el análisis fitoquímico preliminar.

Metabolitos secundarios

Los compuestos orgánicos que se hallan presentes en el vegetal pueden proceder del metabolismo primario o del metabolismo secundario (tabla 3.1). El primario se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos del mundo, mientras que el secundario no se considera esencial para la vida y únicamente se produce en ciertos grupos vegetales.

Tabla 3.1. Ejemplos de productos derivados del metabolismo primario y secundario

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Glúcidos: oligosacáridos y polisacáridos	Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos
Lípidos y ceras vegetales	Derivados fenólicos
Aminoácidos y proteínas	Shikimatos: fenoles y ácidos fenólicos,
Ácidos nucleicos	cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas
Compuestos nitrogenados, como enzimas	Acetatos: quinonas, antracénosidos.
	Alcaloides

En el caso de metabolismo secundario, las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que se conocen como metabolitos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no tienen una función reconocida o concreta en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los metabolitos secundarios también difieren de los metabolitos primarios, en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas. El estudio de estos compuestos fue iniciado por los químicos

orgánicos del siglo XIX y principios del siglo XX, quienes se interesaron en estas sustancias debido a su importancia como drogas, venenos, sabores y materias industriales. Además de que estos compuestos tienen una implicación ecológica pues actúan como respuesta a un estrés biótico como ataque de herbívoros, virus, hongos, bacterias, produciendo fitoalexinas. Otros tienen una función fisiológica muchas veces asociada como respuesta a algún tipo de estrés abiótico por ejemplo los alcaloides y las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento respectivamente, mientras que los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Se tienen diversos criterios para clasificar estos compuestos, entre los principales metabolitos secundarios se encuentran: alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, saponinas y glucósidos cianogénicos, y si se agrupan por su estructura química pueden ser isoprenoides, derivados fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno.

Isoprenoides

El elemento estructural básico de estos compuestos se conoce como unidad de isopreno (Fig. 3.1), son generalmente insolubles en agua e incluyen a los esteroides, pigmentos de caroteno (Fig. 3.2), la vitamina A, el hule, los terpenos, aceites esenciales, la cadena de fitol de la clorofila y algunas hormonas vegetales importantes. Los terpenos o terpenoides, constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios y al igual que muchos tipos de metabolitos secundarios, están involucrados en tareas de defensa. Se pueden encontrar en la fuente vegetal solos o formando glicósidos y son más frecuentes como triterpenos, también llamados, saponinas. El isopreno ha sido detectado libre en *Hamamelis jelena*; sin embargo, esta molécula como tal no es frecuente en las plantas, sino que está asociada a otras unidades iguales o a otras moléculas. Se le puede obtener por pirólisis del limoneno (Fig. 3.3) o de la goma con lo cual se deduce el origen común de estos compuestos.

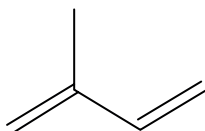


Figura 3.1. El isopreno es el hemiterpeno de mayor abundancia en las plantas

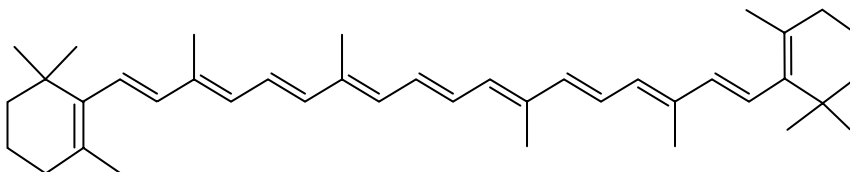


Figura 3.2. Molécula de β -caroteno, precursor de la vitamina A

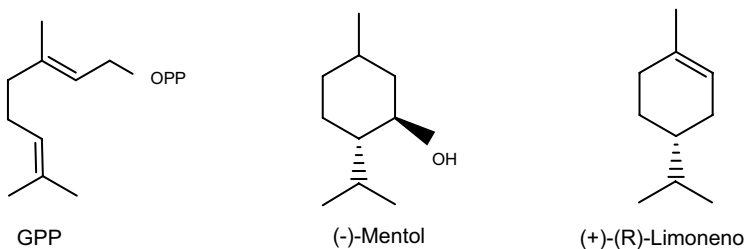


Figura 3.3. Monoterpenos. El mentol y el limoneno son derivados del geranildifosfato (GPP)

Derivados fenólicos

Los fenoles vegetales son los metabolitos secundarios que contienen en su estructura el grupo fenol, que es un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Fig. 3.4). Estos compuestos son sintetizados y acumulados en las plantas en gran número y variedad, hasta la fecha se han identificado aproximadamente 8000 compuestos y también son llamados polifenoles o fenilpropanoides, participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Están relacionados con el color, el sabor, el olor y propiedades nutritivas y antioxidantes de las plantas. Los fenoles vegetales se clasifican de

acuerdo al número de anillos fenólicos que poseen y de los grupos funcionales que contienen. Los principales grupos son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. Los compuestos flavonoides (Fig. 3.5) constituyen uno de los grupos más ubicuos producidos por las plantas, se concentran en los órganos de éstas especialmente en las flores, hojas y semillas. Son compuestos de bajo peso molecular y tienen un amplio rango de funciones importantes en la bioquímica, fisiología y ecología de las plantas, incluyendo la coloración de semillas y pétalos de las flores, la germinación del polen y su fertilidad, protección contra radiación UV y organismos patógenos, así como también influyen en el crecimiento de la planta, inhibidores de enzimas, antioxidantes y compuestos anticancerígenos, por lo que tiene un alto potencial benefactor para los humanos, haciéndolos atractivos para su estudio, extracción o producción, algunos ejemplos se muestran en la figura 3.6.

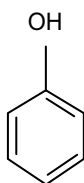


Figura 3.4. Estructura química del fenol

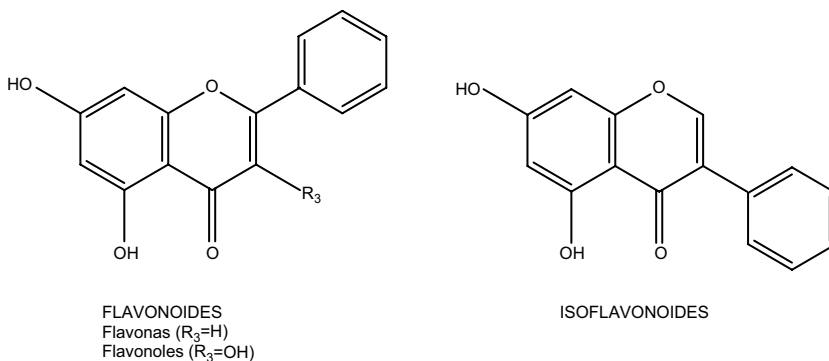


Figura 3.5. Estructura básica de los flavonoides y de los isoflavonoides que consiste en dos anillos fenólicos

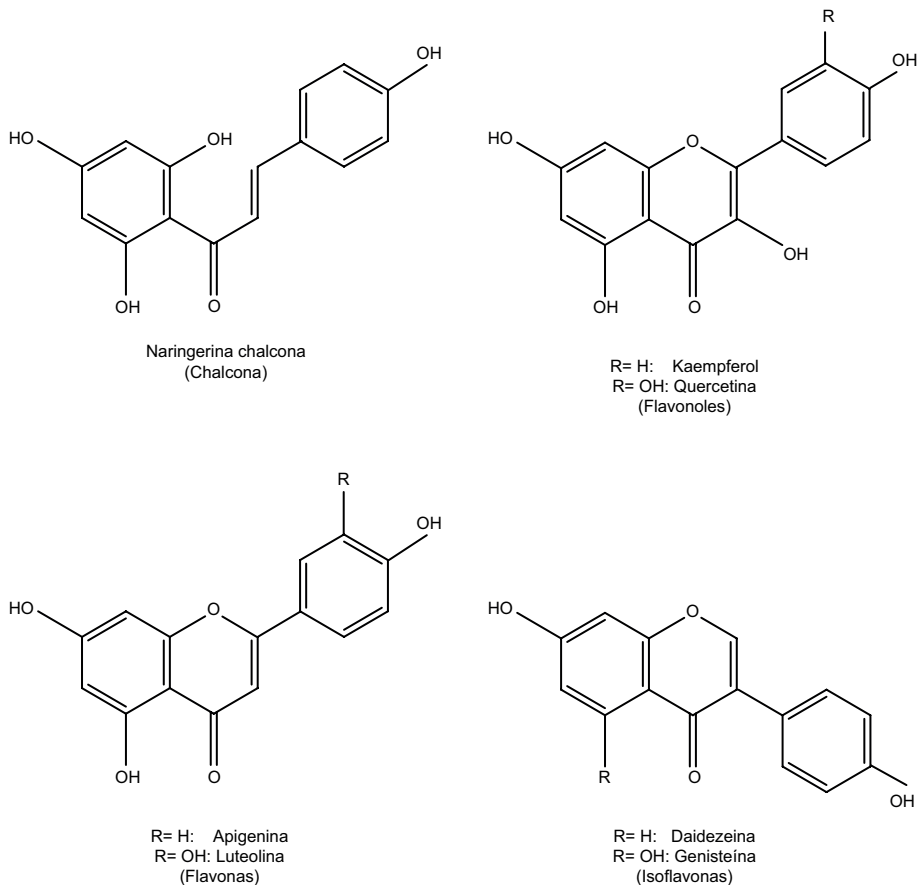


Figura 3.6. Ejemplos de flavonoides. El compuesto denominado chalcona es precursor de las demás clases de flavonoides

Compuestos que contienen nitrógeno: Alcaloides y glucósidos cianogénicos

Los alcaloides son compuestos nitrogenados cuya función en la planta no está bien determinada y ha sido objeto de especulación durante los últimos años, pero se cree que actúan como defensa frente a predadores, especialmente mamíferos, debido a su toxicidad y capacidad de disuasión. Su química es compleja

y se les clasifica según la composición de su núcleo, en una quincena de grupos diferentes. Aparecen en diversos órganos, según la especie vegetal, la nicotina, por ejemplo, se sintetiza en las raíces, pero se acumula únicamente en sus hojas. Estas sustancias son conocidas por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre los animales vertebrados. Como su nombre sugiere, muchos alcaloides son alcalinos (Fig. 3.7). Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. Hay alcaloides, como los del tropano, que contienen un anillo de pirrolidina, a esta familia pertenece la cocaína (Fig. 3.8).

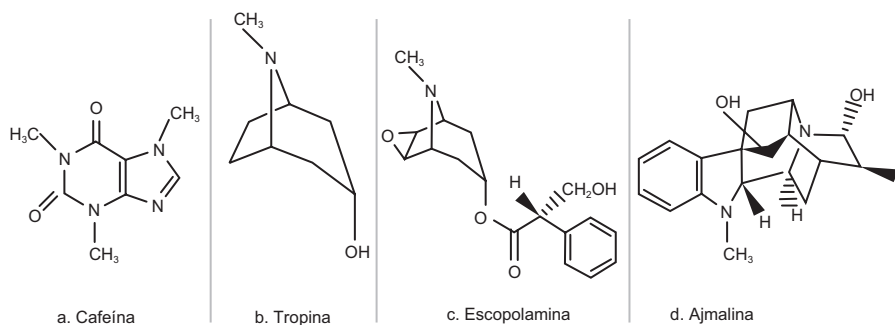


Figura 3.7. Algunos alcaloides de importancia. La cafeína (a) es el alcaloide de mayor abundancia; los tropano alcaloides (b y c) se encuentran solamente en la familia *Solanaceae*; y los monoterpenos indol alcaloides (d) se encuentran en las familias *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Nyssaceae* y *Rubiaceae*

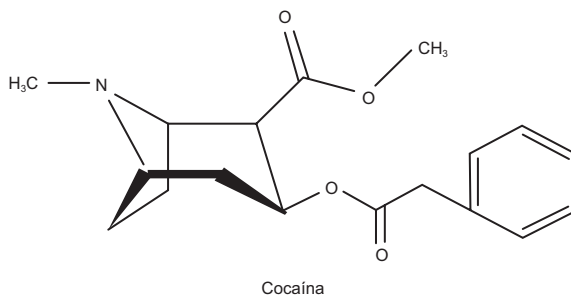


Figura 3.8. Estructura química de la cocaína

Otros metabolitos que tienen nitrógeno en su estructura son los glicósidos cianogénicos, que son sintetizados por algunas plantas y son capaces de

liberar por hidrólisis ácido cianhídrico (HCN), un gas tóxico que participa de las interacciones planta-animal y que produce a menudo envenenamiento de ganado y ocasionalmente de personas. Estructuralmente están formados por un azúcar, un grupo ciano y un derivado carbonílico (aldehído o cetona). Casi todas las sustancias cianógenas son glicósidos de α -hidroxinitrilos (cianhidri-*nas*). Se han encontrado más de 50 tipos de glicósidos cianógenos naturales de los cuales todos tienen una misma estructura general y en la actualidad se conocen más de 2500 especies, distribuidas en unas 110 familias diferentes que presentan estos compuestos. Para el reconocimiento de los metabolitos secundarios, en la actualidad sigue siendo de gran utilidad el realizar pruebas cualitativas preliminares como son las fitoquímicas, que consisten en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de un color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, dando indicios de la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular.

Biotecnología vegetal como una alternativa

La pérdida de especies vegetales debido a la destrucción de su hábitat natural y a la explotación irracional de recursos forestales puede poner en peligro la supervivencia de plantas utilizadas de manera tradicional en cada región y en cada cultura, lo cual representa una pérdida no solo a nivel ecológico, sino también a nivel social y económico. En el caso concreto de las plantas medicinales, la colecta excesiva de material vegetal del medio silvestre se considera como la principal amenaza. De hecho, muchas de las especies de mayor valor medicinal han sido ya erradicadas de sus zonas más importantes de distribución natural. Por lo anterior, es crucial desarrollar estrategias para proteger estos valiosos recursos naturales, pero que también permitan su explotación racional. La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) abre la posibilidad, por un lado, de conservar *in vitro* el germoplasma (Fig. 3.9) de especies vegetales de uso tradicional y por otra parte aprovecharlas, mediante la micropropagación, con diversos fines. En la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), se logró el estableci-

miento del cultivo *in vitro* de varias especies (tabla 3.2), con uso medicinal de la región de Aguascalientes-Zacatecas.

Tabla 3.2. Sistema de propagación *in vitro* y usos de cinco especies de la región Aguascalientes-Zacates con propiedades medicinales

Especie	Nombre común	Propagación <i>In vitro</i>	Usos
<i>Eryngium heterophyllum</i>	Hierba del sapo	0.5 mg/L mT*	Antiinflamatoria, tos, riñón, artritis, diabetes
<i>Heterothecha inuloides</i>	Árnica amarilla	1.0 mg/L AIA**	Para cicatrizar y desinfectar heridas en personas y animales, para desinflamar golpes externos
<i>Ipomoea purpurea</i>	Hiedra de flores chiquitas	0.5 mg/L mT	Purgante; para ayudar al parto
<i>Plumeria rubra</i> L.	Xaca, plumeria	0.1 mg/L mT	Indigestión, lesiones óseas, purgante, postemillas, dolor de muelas.
<i>Ruta chalapensis</i> L.	Ruda	2 g/L Carbón activado	Trastornos gineco-obstétricos; para ayudar al parto, lactógeno; analgésico; trastornos gastrointestinales; enfermedades de la piel

* mT: meta-Topolina

**AIA: Ácido indol- acético

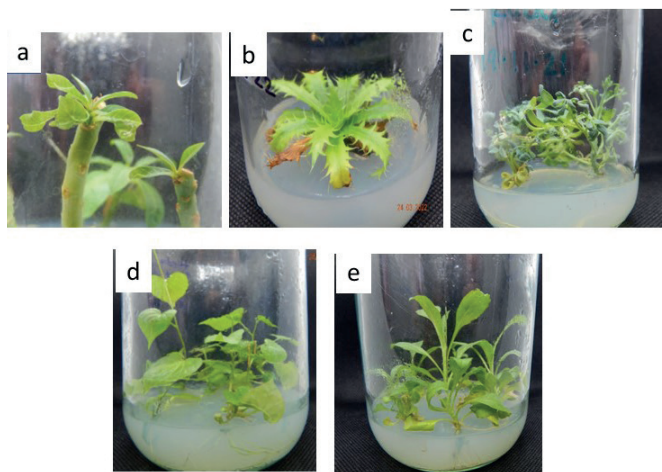


Figura 3.9. Especies propagadas *in vitro* y conservadas en el banco de germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes: a) *Plumeria rubra* L., b) *Eryngium heterophyllum*, c) *Ruta chalapensis* L., d) *Ipomoea purpurea* y e) *Heterothecha inuloides*

Es importante considerar que muchos de los metabolitos secundarios son producidos por las plantas en respuesta a algún tipo de estrés ambiental, o como defensa contra patógenos y predadores; asimismo, la acumulación de metabolitos secundarios suele depender de las condiciones que se presentaron durante el crecimiento y desarrollo del individuo, como presencia o ausencia de algunos nutrientes, exposición a sequía, salinidad, bajas temperaturas, radiación ultravioleta, ataque de patógenos, entre otros. Se pueden emular algunas de estas condiciones en los cultivos vegetales *in vitro* para obtener o potenciar la producción de determinados metabolitos, práctica que se conoce como elicitación. Por ejemplo, para incrementar la producción de compuestos fenólicos, como metabolitos secundarios, hay más de 40 referencias, usando diferentes tipos de elicitores como los biológicos (bacterias y hongos), químicos (aminoácidos, condiciones de cultivo, compuestos orgánicos, precursores metabólicos, RCV), físicos (metales, diferentes tipos de luz) y en ocasiones combinaciones de alguno de estos factores para incrementar la eficiencia. Para que el cultivo *in vitro* de células vegetales tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos secundarios, se requiere que estos se puedan obtener

en grandes cantidades; no ocurre así en la mayoría de los cultivos celulares que producen estos compuestos en niveles inferiores a los obtenidos en las plantas de las cuales se derivan tales cultivos. No obstante, este panorama cambia rápidamente, la producción de algunos metabolitos específicos ha aumentado mediante diferentes métodos (Fig. 3.10).

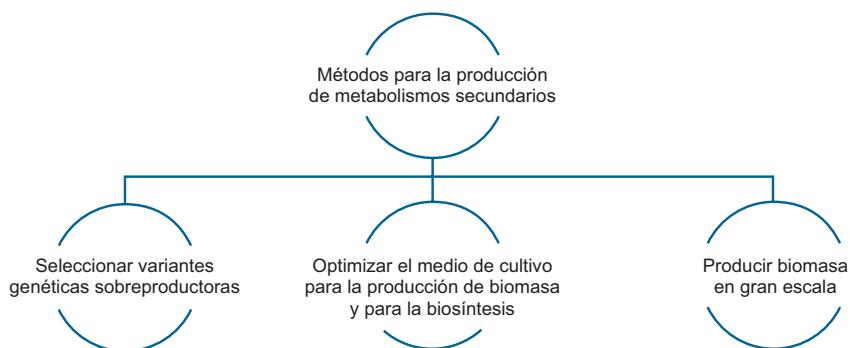


Figura 3.10. Principales métodos para la producción de metabolitos secundarios en grandes cantidades usando técnicas biotecnológicas.

Como ejemplo, la planta Llantén (*Plantago major*) (Fig. 11) es usado en muchas partes del mundo, entre ellos México, para el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades, pues posee propiedades medicinales antiinflamatorias, antidiarreicas y cicatrizantes, entre otras. Los estudios se han realizado desde los años 60's en diversas partes de la planta para identificar sus constituyentes químicos (carbohidratos, lípidos, alcaloides, terpenos, flavonoides, vitaminas, etc.), relacionados con la actividad biológica. Esta planta silvestre crece en todo el mundo y es considerada maleza, y aunque se piense que es una planta abundante, actualmente se ve perjudicada por actividades agronómicas, explotación y otros factores que pueden conducir a su erosión. En otras investigaciones se mencionan parámetros generales para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de esta especie, pero es necesario seguir aplicando esta tecnología a muchas otras plantas de interés por su uso y/o condiciones de conservación. En este sentido, debe evitarse que el consumo de especies vegetales silvestres se intensifique para no ocasionar su extinción, por lo que es inminente desarrollar técnicas sustentables como el CTV, que puede hacer posible la producción planificada, controlada y manipulada de compuestos

bio-activos poseedores de propiedades curativas. Esta técnica también se puede aplicar para especies cuya multiplicación por métodos convencionales, ya sea por semillas o por métodos asexuales, es poco eficiente.



Figura 3.11. *Plantago major* (García, 2015)

En los cultivos *in vitro* es común que se empleen diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como lo son las citocininas, vinculadas al crecimiento y desarrollo de las plantas. Después del establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de semilla de la especie *E. heterophyllum* (Fig. 3.12) en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la UAA, se puede apreciar (Fig. 3.13) como la meta-Topolina, RCV del grupo de las citocininas, usada en diferentes concentraciones, influye en el desarrollo de la planta.



Figura 3.12. *E. heterophyllum* 26 días después de la germinación de la semilla.

También se puede observar la generación de raíces.

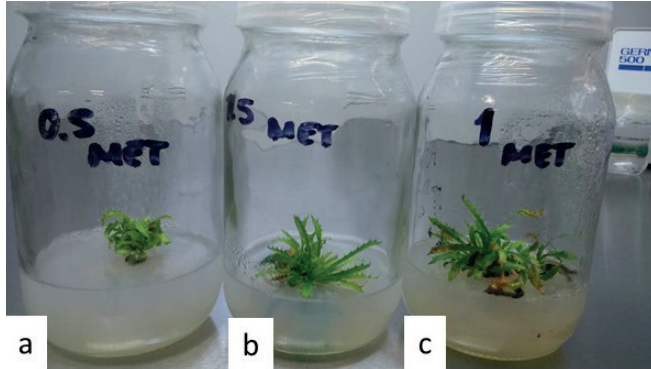


Figura 3.13. *E. heterophyllum* con meta-Topolina en concentraciones de a) 0.5 mg/L b) 1.5mg/L y c) 1mg/L. Obsérvese la respuesta del tejido ante las diferentes concentraciones, hay formación de raíz en (b) y un mayor crecimiento en (c)

Al influir en el desarrollo de la planta, también es importante investigar si los reguladores de crecimiento o si el mismo cultivo *in vitro* provoca variaciones en la producción de metabolitos secundarios. Se realizó una investigación

sobre la producción de metabolitos secundarios mediante la capacidad antioxidante en *Aloe arborescens*, detectando compuestos irinoides, fenólicos, flavonoides y taninos condensados, a partir de plantas regeneradas *in vitro*, llegando a la conclusión que de manera particular la adición de los reguladores de crecimiento vegetal en el *A. arborescens* aumentan considerablemente la producción de estos metabolitos en comparación con los medios a los que no se le añadieron RCV, sin embargo de igual manera se notó que a partir de cierta concentración es donde alcanza su punto máximo. Esto puede servir como base no solo para la proliferación, si no para la producción de metabolitos secundarios a largo plazo. Por otro lado, el análisis fitoquímico se ha intensificado en una gran diversidad de especies. Por ejemplo, se reportó en un estudio preliminar en 78 plantas usadas tradicionalmente en Perú con fines medicinales, usando pruebas químicas cualitativas para identificar la presencia de metabolitos secundarios encontrando alcaloides, flavonoides, cardiotónicos, saponinas, taninos, esteroides y antocianinas en diferentes proporciones. Este tipo de estudios permite dirigir investigaciones más precisas sobre alguna especie o metabolito en particular. De esta manera se han realizado la caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco) por medio de una marcha fitoquímica (Fig. 3.14), metodología que se basa en realizar extracciones con solventes y separarlo en diversas fracciones a las que se les pueden realizar pruebas cualitativas (tabla 3.3) para determinar la presencia de los diferentes metabolitos.

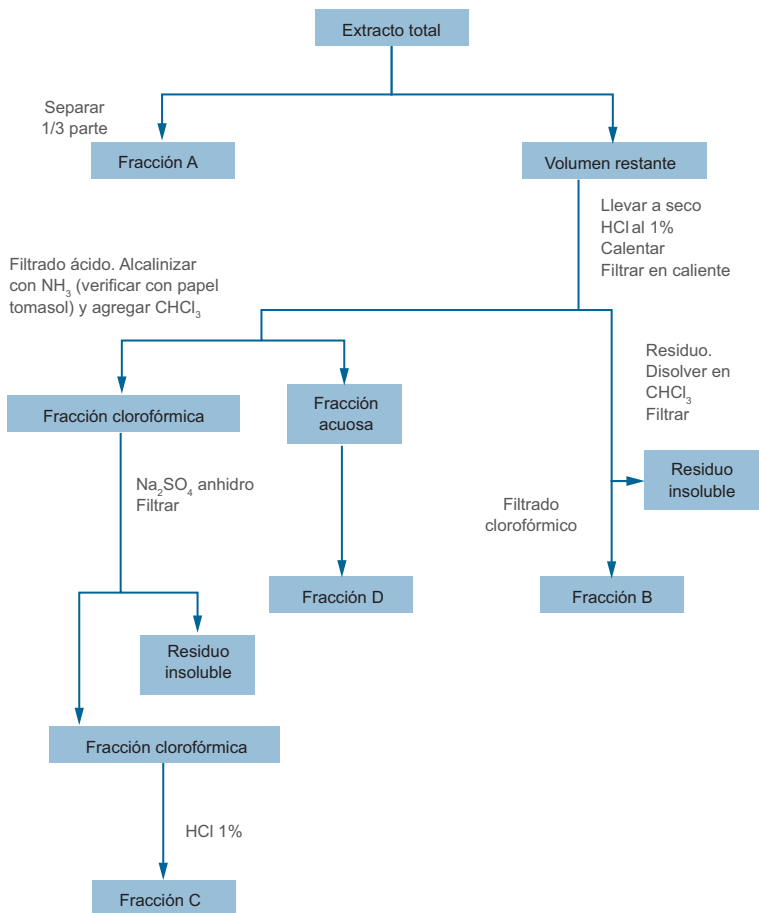


Figura 3.14. Secuencia para separar las fracciones de un extracto de una planta obtenido por el uso de diferentes solventes y poder realizar un escrutinio fitoquímico, modificado de Ardoino (2017).

Tabla 3.3. Pruebas químicas cualitativas para determinar la presencia de metabolitos secundarios, en fracciones obtenidas a partir del extracto de la planta con diferentes solventes

Fracción	Metabolito	Prueba
A	Flavonoides	Reacción de Shinoda
	Taninos y OH fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico
		Reacción con gelatina
	Lípidos	Yodo
	Hidratos de carbono	Reacción con fenol
B	Núcleos esteroidales y triterpenos	Reacción de Liebermann-Burchard
	Antraquinonas	Reacción de Borntrager directa
	Alcaloides	Reacción de Dragendorff
Cardenólidos		Reacción de Kedde
C	Estructuras esteroidales	Reacción de Liebermann-Burchard
	Leucoantocianidinas	Reacción de Rosenheim
D	Compuestos fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico
	Proteínas y péptidos	Reacción de Biuret
REACCIONES DIRECTAS	Saponinas	Poder afrógeno
		Poder emulsificante
	Proteínas-aminogrupos	Reacción de Ninhidrina (sobre papel)

Otro tipo de técnicas como las cromatográficas y/o espectrométricas se usaron para determinar la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos en cactus globulares y columnares, estas plantas producen una amplia gama de metabolitos secundarios implicados en el mecanismo de defensa frente a estrés biótico y abiótico. Los datos revelaron que el nivel de algunos constituyentes químicos podría dar valor agregado a estas especies desde el punto de vista nutricional, farmacológico y biológico.

Acoplando la biotecnología con el análisis fitoquímico comienzan a surgir estudios interesantes. Se tiene el caso donde se realizó un escrutinio fitoquímico mediante cromatografía en capa fina a partir de raíces transformadas de *Bidens odorata*, encontrando que tienen la capacidad de sintetizar compuestos diversos como alcaloides, derivados de antraceno, aceites esenciales, flavonoi-

des, saponinas, esteroides y triterpenos. Estos metabolitos secundarios están presentes tanto en la parte aérea como en raíces de las plantas, por lo que los resultados demuestran que las raíces transformadas pueden ser una opción viable para la obtención de los compuestos de interés farmacológico. En otro ejemplo, haciendo uso de métodos instrumentales de análisis como la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS) se detectaron 44 metabolitos y lograron identificar 43, a partir de cultivos *in vitro* de *Coryphantha macromeris*, siete compuestos son reportados por primera vez para especies de cactáceas. Algunos ácidos orgánicos (ácido cítrico, glucónico y tianshico) y ácidos fenólicos (ácido piscídico, ferúlico y siringico y/o sus derivados) se encontraron como los metabolitos de mayor abundancia relativa, resaltando así el potencial del CTV como una alternativa para la obtención y estudio de metabolitos de interés. Cabe destacar el uso de técnicas combinadas para separar e identificar los componentes de una mezcla. En este caso la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (sigla inglesa HPLC) es una técnica de separación muy utilizada, en la que el tamaño de partícula de la fase estacionaria generalmente es de 2 a 5 μm , pero recientemente se han incorporado tamaños de partícula menores a 2 μm , lo que se traduce en una separación más eficiente, aunque se requiere de bombas de presión de mayor capacidad (más de 6.000 psi), por lo que a ésta se la denomina UPLC, o UHPLC, hablándose de ultra-HPLC. En cuanto a los analizadores de masas, se cuenta con analizadores de cuadrupolo, de trampa de iones, y de tiempo de vuelo. Los desarrollados últimamente son los analizadores de trampa de iones que permiten atrapar ciertos iones y someterlos a una fragmentación posterior, logrando obtener un nuevo espectro de masas, lo que lleva a la técnica denominada espectrometría de masas tándem, conocida por la sigla inglesa MS/MS. Los espectros así obtenidos proporcionan mayor información de los procesos de fragmentación, lo que es muy útil para la dilucidación estructural de los metabolitos secundarios. También es importante mencionar el uso cada vez más extendido de las redes de datos moleculares como por ejemplo la red social global de productos Naturales (Global Natural Products Social Molecular Network, GNPS), que combinada con otras herramientas disponibles en línea como LipidsXplorer, permite la desrepleción, identificación y caracterización estructural de diferentes productos naturales como lípidos y alcaloides esteroidales. De esta manera, la combinación de técnicas junto con el uso de las bases de datos, facilita mucho el análisis de los

metabolitos ya conocidos y ayuda en el hallazgo de otros nuevos. En estudio reciente lograron determinar y aislar por medio de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas un derivado del ácido ferúlico (feruloil-glucósido) a partir de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides*, compuesto que se reporta por primera vez y que no se detectó en las raíces sin transformar (control), siendo nuevamente la biotecnología vegetal una opción si se desea producir este compuesto en grandes cantidades.

El registro de este tipo de investigaciones aumenta de manera importante, resaltando que el escrutinio fitoquímico preliminar sigue siendo una estrategia valiosa para tener un panorama general de los metabolitos presentes en alguna especie de interés; con el apoyo de los métodos instrumentales se puede separar, identificar y cuantificar compuestos y la biotecnología vegetal es una herramienta excelente para el estudio y producción de estos metabolitos.

Protocolo

Protocolo 3.1 Análisis fitoquímico preliminar en plantas propagadas *in vitro*

Para determinar el efecto de la propagación *in vitro* en una especie vegetal con relación a la producción de metabolitos secundarios, es deseable hacer una primera aproximación comparando de manera cualitativa la presencia de grupos de compuestos entre el cultivo *in vitro* y *ex vitro*. Se inicia con seleccionar la especie de interés y establecer su cultivo *in vitro*, para encontrar las condiciones más favorables para su micropropagación. Cuando se tiene material vegetal suficiente en ambos tipos de cultivo se puede realizar el escrutinio fitoquímico.

En el caso de *Eryngium* los estudios sobre esta familia son muy extensos, sin embargo, no hay estudios referentes a la micropropagación de *Eryngium heterophyllum*, por otra parte, existen estudios de especies pertenecientes a la misma familia, tal es el caso de *Eryngium foetidum* (cilantro cimarrón) el cual se logró micropropagar mediante el uso de medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1.5mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 0.1mg/L de ácido naftalenacético (ANA). Considerando esta referencia se desarrolla un sistema de cultivo *in vitro* para la especie seleccionada (Revisar capítulo 1).

- Material vegetal: planta *Eryngium heterophyllum* propagada *in vitro* y *ex vitro*
- Procedimiento:
 - a) Preparación de la muestra. Para la obtención del material seco de *E. heterophyllum*, se pesaron aproximadamente 5 g de la parte aérea de la planta *ex vitro* e *in vitro*. Se secaron al sol siendo cubiertas de la radiación directa con papel estraza durante una semana.
 - b) Obtención de extractos. Las muestras secas se trituraron con mortero y se dividieron en tres porciones aproximadamente de 0.20 g cada una. Se añadió el solvente a usar: metanol, cloroformo y agua acidificada con HCl al 5% (v/v) para tener un volumen final de 10 mL. Cada muestra se calentó en baño maría durante 10 minutos a reflujo. Pasado este tiempo, si es necesario se completa el volumen perdido de cada solvente hasta obtener un volumen de 10 mL. Los extractos se dejaron 1 día en oscuridad para una mejor extracción de los compuestos.
 - c) Pruebas cualitativas (a la gota) para principios activos. Se realizaron diversas pruebas para determinar la presencia de diferentes grupos químicos de metabolitos secundarios, adaptación del protocolo propuesto por Bussmann y Barba. Se utilizaron los extractos (metanólico, cloroformo y agua acidulada con HCl al 5% v/v) tanto de las muestras *in vitro* como *ex vitro* y las pruebas se realizaron en una placa de toque de cerámica.

1.- Alcaloides:

- Mayer: Se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo. Este reactivo se prepara al disolver 1.36 g de cloruro mercúrico en 60 mL de agua. Se prepara otra solución con 5 g de yoduro de potasio y 10 mL de agua para disolver la sal. Se mezclan las dos soluciones y se afora a 100 mL. El reactivo sólo se agrega a soluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos y las muestras no deben contener ácido acético o etanol, pues se disuelve el precipitado blanco que se forma. Es importante agregar unas cuantas gotas del reactivo a la muestra, porque algunos alcaloides son solubles en exceso de éste.

- Dragendorff: El reactivo se prepara a partir de dos soluciones. Para la primera se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20 mL de ácido nítrico al 30%. La segunda solución es a partir 27.2 g de yoduro de potasio disueltos con 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan en reposo durante 24 horas. Decantar la solución (para separar residuos de cristales de nitrato de potasio) y aforar con agua a 100 mL. El reactivo preparado se emplea en soluciones aciduladas. Para la prueba se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo. La prueba es positiva al formarse un precipitado color marrón naranja.
 - Wagner: Se agregaron 4 gotas de extracto y 2 gotas de reactivo el cual se prepara a base de yodo. Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua, se afora la solución a 100 mL con agua destilada. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman un precipitado color marrón.
 - Marquis: Se añadieron 4 gotas en placa de toque del extracto y 2 gotas de reactivo. Para el reactivo se agregan 5 gotas de formol al 40% a 3 mL de H_2SO_4 concentrado. La heroína y la morfina dan en forma inmediata una coloración rojo púrpura, luego pasa a coloración violeta y finalmente a coloración azul.
- 2.- Esteroides: Prueba de Liebermann-Burchard, el reactivo que se prepara mezclando 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfría a 0 °C y se añade una gota de ácido sulfúrico. Se colocaron 4 gotas de extracto en placa de toque y se agrega gota a gota el reactivo. La prueba es positiva si el extracto cambia de color a azul, verde, rojo o naranja.
 - 3.- Lignanos: A una alícuota de 5 gotas de extracto se le agregó una gota de formol y una gota de ácido sulfúrico concentrado y se calentó. La prueba es positiva por la formación de un color rojo.
 - 4.- Quinonas: Prueba de Borntrager. Se tomaron 5 gotas de los extractos y se secaron a temperatura ambiente en placa de toque, se resuspendieron en 5 gotas de tolueno y se añadieron 5 gotas de NaOH al 5%. La aparición de una coloración roja en la fase acuosa se tomó como positivo.
 - 5.- Flavonoides: Prueba de Shinoda. Se colocaron 5 gotas del extracto, se les añadió unas piezas de limadura de Magnesio y tres gotas de ácido clor-

hídrico concentrado. La prueba fue tomada positiva con la aparición de una coloración roja.

- 6.- Taninos: Prueba con cloruro férrico. A 5 gotas de extracto se añaden dos gotas de solución de FeCl_3 preparada al disolver 1.25 g de esta sal en 25 mL de agua y después aforar a 50 mL con alcohol metílico. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado como resultado positivo.

Resultados

Se encontraron pequeñas diferencias en el contenido de algunos metabolitos secundarios para la especie *E. heterophyllum* al comparar las muestras *in vitro* y *ex vitro*, como se puede apreciar en la tabla 3.4. La presencia de precipitados o cambio de coloración (Fig. 3.15) fueron tomados como resultado positivo para cada prueba en específico, esto permite tomar decisiones para continuar con la investigación de esta especie.

Tabla 3.4. Comparación del análisis fitoquímico preliminar de *E. heterophyllum*, cultivada *in vitro* y *ex vitro* en extractos con metanol, cloroformo y agua acidulada con HCl al 5%(v/v)

Metabolito	Prueba	<i>In vitro</i>			<i>Ex vitro</i>		
		Metanol	Cloroformo	HCl(5%)	Metanol	Cloroformo	HCl(5%)
Alcaloides	Mayer	+	+	+	+	+	+
	Dragendorff	+	++	++	+	+	+
	Wagner	+	++	++	+	+	+
	Marquis	+	+	+	+	+	+
Esteroides	Liebermann-Burchard	++	+	-	+	+	-
Lignanós	Formol	-	-	+	-	-	-
Quinonas	Borntrager	-	-	-	+	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	-	+	+	-	+
Taninos	FeCl_3	+	-	-	+	-	-

Escala cualitativa: (+) = Presencia; (-) = Ausencia

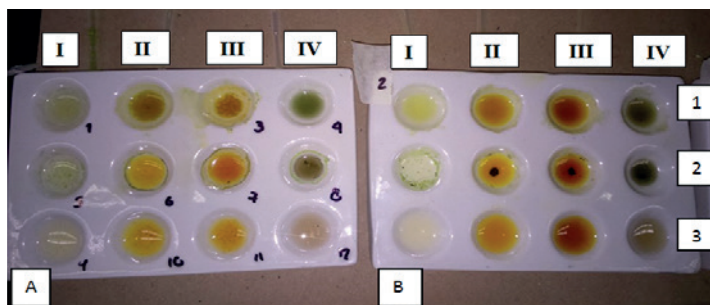


Figura 3.15. Prueba para la determinación de alcaloides. A) Muestra *in vitro*, B) Muestra *ex vitro*. 1) extractos metanólicos, 2) extractos con cloroformo, 3) extractos con agua acidulada (HCl al 5%) por medio de las pruebas de I) Mayer, II) Dragendorff, III) Wagner y IV) Marquis para la especie *E. heterophyllum*.

Abreviaturas

AIA: ácido indolacético

ANA: ácido naftalenacético

BAP: bencilaminopurina

CTV: cultivo de tejidos vegetales

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

IR: infrarrojo

MS: espectrofotometría de masas

mT: metatopolina

RMN: resonancia magnética nuclear

Glosario

Análisis cualitativo: identificar la presencia de ciertos grupos de compuestos en una muestra por medio de pruebas químicas.

Fitoquímica: ciencia que permite conocer de manera integral, algunos de los muchos productos químicos naturales en las plantas.

Metabolito secundario: compuestos producidos por las plantas que no tienen una función reconocida o concreta.

Bibliografía

- Albarracín, C. (2012). Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación de cilantro cimarrón (*Eryngium Foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis para obtener grado de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejercito. Ecuador.
- Almaraz, N., Ávila, J., Delgado, E., Naranjo, N. & Herrera, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vid Supra*, 1, 39-49
- Amoo, S., Aremu, A. & Van Staden, J. (2012). *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micro-propagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 345–358
- Ardoino, S., Boeris, M. & Toso, R. (2017). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Ciencia Veterinaria*, 15(1), 115-125.
- Barba, J. (1997). Introducción al análisis de productos naturales; laboratorio de fitoquímica. Universidad Autónoma Metropolitana. Ed. Casa abierta al tiempo. México.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. (2001). Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839–851.
- Bussmann, R., Glenn, A., Meyer, K., Rothrock, A., Townesmith, A., Sharon, D., Castro, M., Cardenas, R., Regalado, S., Del Toro, R., Chait, G., Malca, G. & Perez, F. (2009). Phyto-Chemical Analysis of Peruvian Medicinal Plants - Análisis fitoquímico de plantas medicinales peruanas. *Arnaldoa*, 16(1), 105 - 110.
- Cabañas, E., Areche, C., Gómez, Y., Jáuregui, J., Cruz, F. & Pérez, E. (2019). Phytochemical profile of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose Cactaceae obtained from *in vitro* culture. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 239-249.
- Dias, M., Sousa, M., Alves, R. & Ferreira, I. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9- 22.

- Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México.
- Ege, S. (1998). Química orgánica: Estructura y reactividad, Volumen 2. Editorial Reverte.
- Estrada, M. (2010). Producción de fenilpropanoides en cultivos celulares y rizogénicos de *Buddleja cordata*, planta empleada en la Medicina Tradicional Mexicana. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- García, G. (2015). Plantas medicinales de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México
- Jordan, M. & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología Vegetal (Squeo F. y Cardemil L. eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 15, 19-22
- Kuklinski, K. (2003). Farmacognosia. (1ª ed.) Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.
- Li, P., Chen, H., Li, YX. (2005). Establishment and optimization of *in vitro* regeneration system for *Plantago major* L. *Chinese Journal of Biotechnology*, 21(6),916-22.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. (2ª ed.) Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela.
- Martínez, A. (2020). Química de productos naturales. (1ª ed.) Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia.
- McKenzie, M., Kirakosyan, A. & Kaufman, P. (2009). Risks Associated with Overcollection of Medicinal Plants in Natural Habitats. En: *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Boston, MA: Springer.
- Mederos, S., Martín, C., Navarro, E. & Ayuso, M. (1997). Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. *Biología plantarum*, 39(3), 465-468.
- Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesamiento. Editorial Mundi-prensa Libros.
- Osbourn, A., Lanzotti, V., Springob, K. & Kutchan, T. (2009). Introduction to the Different Classes of Natural Products. *Plant-derived Natural Products*, 3-50.

- Paladino, S. (2001). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de maestría. Universidades Nacionales del Cuyo La Rioja, San Juan y San Luis.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. & Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-106.
- Pence, V. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant*, 47, 176–187.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27:76-89.
- Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720–1731.
- Ringuelet, J. & Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Argentina: Editorial Universidad de la Plata.
- Robert, M., Reyes, J. & Loyola, V. (1998). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. Centro de Investigación científica de Yucatán, México.
- Rojas, A., Jaramillo, J. & Lemus, B. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. Machala: Ecuador.
- Romeo, J. (2003). Integrative phytochemistry from ethnobotany to molecular Ecology. Volumen 37. Tampa, Florida: Universidad de Florida.
- Samuelsen, A. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 1–21.
- Santos, M. & Camarena, N. (2019). Cacti for production of metabolites: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(21-22), 8657–8667.
- Simmonds, M. (2009). Opportunities and Challenges for Ethnobotany at the Start of the Twenty-First Century. En: *Plant-derived Natural Products*. (Pp 127-140). New York, USA: Springer
- Solis, G., Zamilpa, A., Cabañas, E., Bahena, S., Pérez, E. & Gómez, Y. (2020). Identification and quantitative determination of feruloyl-glucoside from hairy root cultures of *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. &

- Backeb. (Cactaceae). In Vitro *Cellular & Developmental Biology - Plant*. 56, 8–17
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. España.
- Torres, B., Morales, J., Fraire, S. & Pérez, E. (2018). Generación de cultivos de raíces transformadas de la planta medicinal *Bidens odorata* Cav (Compositae) y análisis fitoquímico preliminar. *Polibotánica*, (46), 241-257.
- Wink, M. (2007). Cap. 6 Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application (pp. 97-116). Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



Capítulo 4

Aceites esenciales como potenciales nutraceuticos

Ariadna Thalía Bernal Mercado
Carmen Lizette del Toro Sánchez
*Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Universidad de Sonora*

Resumen

Los aceites esenciales son líquidos concentrados de mezclas complejas de compuestos volátiles y se pueden extraer de varios órganos vegetales por métodos como hidrodestilación y destilación por arrastre con vapor. Los aceites esenciales son una excelente fuente de compuestos bioactivos principalmente terpenos y terpenoides. Poseen numerosas propiedades bioactivas como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras que pueden ser aprovechadas para la formulación de nutraceuticos. Por lo tanto, este capítulo proporciona información sobre algunos aceites esenciales, sus fuentes, su composición, métodos de extracción y bioactividad para ser utilizados como potenciales nutraceuticos.

Introducción

La esperanza de vida a nivel mundial ha ido en aumento; sin embargo, el envejecimiento de la población también ha llevado a una alta prevalencia de enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Se sabe que factores modificables del estilo de vida como poca actividad física, hábitos alimenticios poco saludables, alto peso corporal, tabaquismo y alcoholismo son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades crónicas. Existe una clara relación entre los malos hábitos alimenticios y el desarrollo de enfermedades. En este contexto, la declaración de Hipócrates “que tu alimento sea tu medicina y tu medicina sea tu alimento” establece la relación entre los alimentos y los fármacos para una buena salud.

Un término que une tanto a alimentos como a fármacos es nutraceutico. La definición de nutraceutico se refiere a “un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios a la salud (además de los de nutrir) incluida la prevención o tratamiento de enfermedades”. Los nutraceuticos no son considerados ni como alimentos ni medicinas, más bien son suplementos alimenticios y son promotores de la salud que pueden ser utilizados por gran parte de la población sin receta. Generalmente, los nutraceuticos son presentados como una cápsula, tableta o como un alimento. El término nutraceutico es utilizado ampliamente en el mercado, pero no tiene una definición legal y no están regulados en la mayoría de los países. Algunos países los consideran dentro de la legislación general para productos a base de hierbas con algún término diferente como drogas botánicas o fitomedicina. Numerosos estudios científicos han mostrado resultados prometedores de los nutraceuticos basados en plantas para prevenir el estrés oxidativo y para tratar varias enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, entre otras.

Con el aumento en la población, el avance tecnológico y científico y el gran potencial de los fármacos sintéticos, han tomado mayor predominancia en el tratamiento de enfermedades en las últimas décadas. Sin embargo, en la actualidad los consumidores exigen productos más naturales y más seguros ya que algunos medicamentos tradicionales pueden causar fuertes efectos secundarios y hay resistencia a múltiples fármacos. En este sentido, numerosos estudios han impulsado la búsqueda de compuestos bioactivos presentes en plantas con funciones terapéuticas prometedoras para ser utilizados como nutraceuticos.

Desde la antigüedad, la humanidad ha utilizado lo que le proporciona la naturaleza para alimentarse y tratar diversas enfermedades. Al comienzo de la era de la química médica, muchos de los medicamentos desarrollados eran productos naturales y eran principalmente agentes derivados de plantas. El uso de plantas medicinales se ha transmitido a través de generaciones y ha jugado un papel importante en casi todas las culturas a lo largo del tiempo. Incluso, las moléculas derivadas de plantas medicinales han servido como base para la síntesis de fármacos. Específicamente, los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales son fuente de numerosos compuestos bioactivos de gran interés en el área clínica.

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos volátiles caracterizados por poseer un fuerte aroma responsable de las fragancias de las flores y otras plantas. Están constituidos por una mezcla compleja de compuestos de bajo peso molecular como hidrocarburos, terpenos, terpenoides y sus derivados. Son extraídos de diferentes partes de las plantas, por ejemplo, hojas, cáscaras, cortezas, flores, capullos, semillas, a través de destilación al vapor, hidrodestilación o extracción con disolventes. Son metabolitos secundarios de plantas aromáticas y medicinales, producto del mecanismo de defensa como respuesta a factores ambientales.

Los aceites esenciales han sido ampliamente utilizados como saborizantes y aromatizantes en perfumería, cosmética y en la industria alimentaria debido a que son generalmente reconocidos como seguros. El mercado actual de los aceites esenciales indica que la producción y el consumo de aceites esenciales está aumentando en todo el mundo. Sin embargo, sus aplicaciones en el área clínica todavía son limitadas. Las investigaciones actuales buscan establecer los posibles efectos terapéuticos de los aceites esenciales para prevenir y aliviar enfermedades ya que poseen diversas propiedades biológicas y farmacológicas como antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, entre otras, atribuidas principalmente a la estructura y características de sus compuestos mayoritarios. En este capítulo se describirán los principales componentes de los aceites esenciales, sus métodos de extracción y las propiedades bioactivas que le permiten ser considerados como prometedores nutraceuticos.

Fuentes y Composición de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales pueden ser sintetizados por varios órganos de las plantas, como cáscaras, flores, hojas, tallos, ramitas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza, y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares. En la tabla 4.1 se muestran algunas partes de las plantas y los tipos de aceites esenciales que se obtienen de ellas.

Tabla 4.1 Parte de la planta que contiene aceites esenciales.

Parte de la planta	Aceites esenciales
Hojas	Albahaca, laurel, canela, salvia común, eucalipto, hierba de limón, citronela, menta, orégano, pachulí, hierbabuena, pino, romero, menta verde, árbol de té, tomillo, romero.
Semillas	Almendra, anís, cardamomo, zanahoria, apio, cilantro, comino, nuez moscada, perejil, hinojo.
Corteza	Cassia, canela, sasafrás.
Flores	Manzanilla, salvia, clavo, comino, geranio, jazmín, lavanda, mejorana, naranja, rosa, pachulí, siempreviva, neroli.
Raíces	Jengibre, cúrcuma, valeriana, vetiver, nardo, angélica.
Cáscaras	Bergamota, pomelo, limón, lima, naranja, mandarina.

Algunas familias importantes en la producción de aceites esenciales con valor medicinal e industrial son *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rutaceae*. Las plantas del género *Lamiaceae* como *Mentha piperita* (menta), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Salvia officinalis* (salvia), *Origanum vulgare* (oregano), *Melissa officinalis* (melissa), *Satureja hortensis* (ajedrea de jardín), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Lavandula angustifolia* (lavanda) son conocidas por sus propiedades quimioterapéuticas, anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas. Igualmente, el aceite de canela obtenido de *Cinnamomum verum* de la familia *Lauraceae* muestra potencial antimicrobiano y anticancerígeno. Algunos aceites antimicrobianos, antitumorales y anticancerígenos de la familia *Myrtaceae* son *Melaleuca alternifolia* (árbol de té), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Myrtus communis* (arrayán).

Los aceites esenciales pueden estar constituidos de 20 a 100 compuestos pertenecientes a una gran variedad de clases químicas, aunque en la mayoría de las veces uno o dos compuestos son los que predominan en mayor cantidad y son los responsables de su actividad biológica. De manera general, los componentes principales de los aceites esenciales son terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y sus derivados oxigenados (isoprenoides), aunque también podemos encontrar fenilpropanoides y compuestos aromáticos (aldehídos, alcohol, fenol, etc.) y alifáticos.

Los terpenos son la clase más común de compuestos químicos encontrados en los aceites esenciales (tabla 4.2). Están formados por varias unidades de isopreno (unidad base de 5 carbonos). Los aceites esenciales consisten principalmente en monoterpenos que contienen dos unidades de isopreno (10 carbonos) y de sesquiterpenos que presentan tres unidades de isopreno (15 carbonos). Algunos ejemplos de estos compuestos son pineno, limoneno, mirceno, linalool, terpineno, elemeno, cariofileno, farneseno. Los terpenoides son terpenos que contienen oxígeno en su estructura y son también muy abundantes en los aceites esenciales. Los terpenoides pueden clasificarse de acuerdo con el grupo funcional que contenga el oxígeno de la siguiente manera: 1. Fenol: timol, eugenol, carvacrol. 2. Alcohol: α -terpineol, borneol, lavanduol, nerolidol, 3. Aldehídos: citral, citronelal, cinnamaldehído, 4. Cetonas: carvona, camfor, pulegona, 5. Esteres: acetato de geranil, acetato de linalil, entre otros. En la figura 4.1 se muestran las estructuras de los compuestos mayoritarios en algunos aceites esenciales.

Tabla 4.2. Compuestos mayoritarios encontrados en algunos aceites esenciales.

Aceite esencial	Nombre científico	Compuesto mayoritario	Referencia
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Linalool	(Amor <i>et al.</i> , 2021)
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	(Kačániová <i>et al.</i> , 2021; Kaur, Kauschal, & Rani, 2019)
Hierba de limón	<i>Cymbopogon citratus</i>	Geraniol y citral	(Leimann, Gonçalves, Machado, & Bolzan, 2009; Majewska, Kozłowska, Gruszczynska-Sekowska, Kowalska, & Tarnowska, 2019)

Aceite esencial	Nombre científico	Compuesto mayoritario	Referencia
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol	(Beigi, Torki-Harchegani, & Ghasemi Pirbalouti, 2018; Wu <i>et al.</i> , 2019)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> <i>Lippia graveolens</i>	Carvacrol	(Cui, Zhang, Li, & Lin, 2019)
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>	Cinnamaldehído y eugenol	(Bai <i>et al.</i> , 2021; Jiang, Wang, Li, Li, & Huang, 2020)
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8-cineol y α -pineno	(Jafari-Sales & Pashazadeh, 2020; Sadeh <i>et al.</i> , 2019)
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol y timol	(Alsaraf, Hadi, Al-Lawati, Al Lawati, & Khan, 2020; Tammar <i>et al.</i> , 2019)
Savia	<i>Salvia officinalis</i>	α -pineno, β -pineno, limoneno, y 1,8-cineol	(El Euch, Hassine, Cazaux, Bouzouita, & Bouajila, 2019; Vosoughi, Gomarian, Pirbalouti, Khaghani, & Malekpoor, 2018)

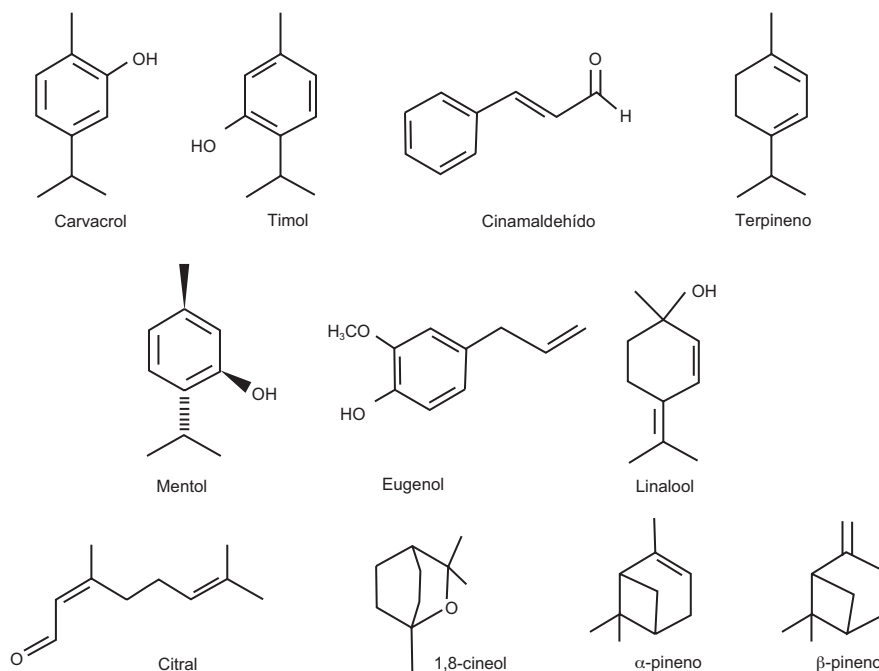


Figura 4.1. Principales compuestos encontrados en aceites esenciales.

Muchos factores como la variación genética de la planta, factores climáticos, ubicación geográfica, variedad de la planta, variaciones estacionales, condiciones como estrés y nutrición de la planta que afecten el crecimiento o madurez, periodo de recolección, almacenamiento posterior a la cosecha e incluso las técnicas de extracción pueden afectar la cantidad y el perfil de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales. Por ejemplo, se observó una amplia variabilidad entre la composición del aceite esencial de siete poblaciones de orégano iraní de diferentes ambientes, zonas geográficas y años de cosecha, pero bajo las mismas condiciones de suelo, temperatura y humedad. Específicamente, la variación del contenido de carvacrol en los aceites osciló entre 0.36% y 46.8%. Las diferencias en los componentes de los aceites esenciales de orégano pueden verse más afectadas por factores genéticos que por orígenes geográficos. Otro estudio informó una variación grande en la composición cualitativa y cuantitativa del aceite de *Origanum vulgare* según el año de cosecha; por ejemplo, el contenido de carvacrol varió de un año a otro de 1.7 a 2.7%. Por lo tanto, resulta crucial realizar una caracterización fitoquímica y biológica de los aceites esenciales antes de sus posibles aplicaciones en la industria, ya que el contenido de los compuestos y la actividad biológica pueden variar naturalmente de diferentes fuentes.

Técnicas de Extracción de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de varias plantas mediante una variedad de métodos de extracción. Numerosos factores pueden influir en la calidad del aceite esencial incluidos la parte de la planta, los solventes, el tiempo, la temperatura y el procedimiento utilizado durante la extracción. Una técnica inadecuada podría alterar la composición química del aceite y en consecuencia sus propiedades bioactivas. Las técnicas de extracción se pueden clasificar en métodos convencionales y alternativos. Dentro de los métodos convencionales se encuentran la destilación al vapor, la hidrodestilación y la extracción por solventes y son las técnicas más comúnmente utilizadas. Algunas desventajas de las extracciones convencionales son la baja eficiencia, el largo tiempo de extracción, las grandes cantidades de solventes y los residuos tóxicos de solventes. Como alternativa, se han desarrollado algunas técnicas para superar estos problemas como nueva tecnología limpia, económica

y altamente eficiente con la obtención de un producto de alta calidad. Entre ellas podemos encontrar la extracción por microondas sin disolventes, la extracción por fluidos supercríticos, la extracción asistida por ultrasonidos y la extracción asistida por electricidad pulsada.

Destilación por arrastre con vapor

El método más común, simple, barato y utilizado para extraer aceites esenciales de plantas a gran escala es la destilación por arrastre con vapor. El proceso consiste en colocar la muestra de planta en un recipiente y calentarla por vapor de agua producido en otro recipiente (figura 4.2). El vapor llevará los compuestos volátiles del material hacia un condensador, donde se enfriarán y volverán a su estado líquido. El calor debe ser suficiente para descomponer y reventar la estructura celular del material vegetal para liberar los compuestos aromáticos o aceites esenciales.

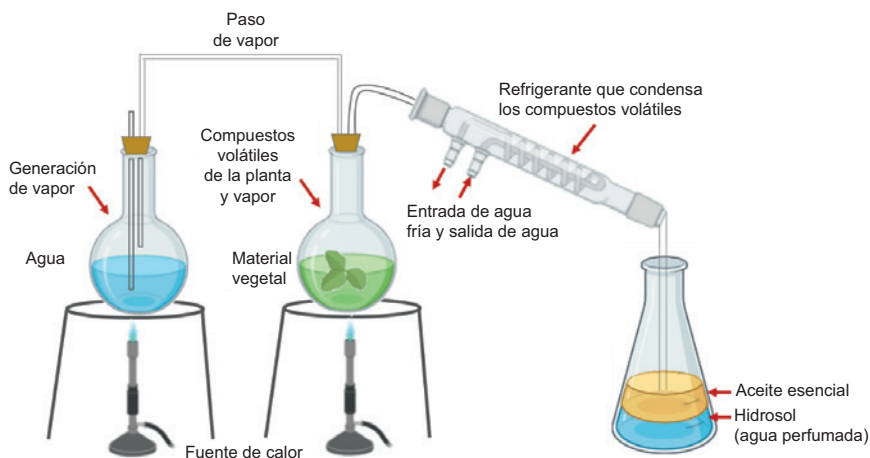


Figura 4.2. Esquema del proceso de destilación por arrastre de vapor para la obtención de aceites esenciales.

Hidrodestilación

La hidrodestilación es un método tradicional para la extracción de compuestos bioactivos principalmente aceites esenciales de las plantas. Este método es una variante del proceso con arrastre por vapor, no se utilizan disolventes orgánicos y se puede realizar sin deshidratar la muestra. Este proceso comprende la inmersión completa del material vegetal directamente en agua, la cual es calentada hasta ebullición (100 °C) a través de fuego directo o por algún método de calefacción. La generación de vapor se produce dentro del propio recipiente de destilación. El agua caliente y el vapor actúan como los principales factores que influyen en la liberación de compuestos bioactivos del tejido vegetal. El enfriamiento indirecto por agua condensa la mezcla de vapor de agua y aceite. La mezcla condensada fluye del condensador a un separador, donde el aceite y los compuestos bioactivos se separan automáticamente del agua. Este proceso puede generar grandes volúmenes de licores madre que representa un valor adicional por sus compuestos fenólicos solubles en agua. Dentro de las desventajas de este método es que a una temperatura de extracción alta (más de 100 °C) se pueden perder algunos compuestos volátiles por lo que limita su uso para la extracción de compuestos termolábiles. Además, se requiere cantidades grandes de energía porque su proceso de extracción es largo (más de dos horas).

Extracción con solventes

La extracción con solventes es un método convencional muy utilizado para materiales frágiles que no son tolerantes al calor de la destilación al vapor. Este método implica mezclar el material vegetal con disolventes típicos como acetona, hexano, etanol, metanol y éter de petróleo con un calentamiento suave. Posteriormente, se filtra el extracto y se evaporan los disolventes. Sin embargo, este método es un proceso relativamente lento, lo que hace que los aceites sean más caros que otros métodos.

Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica ampliamente utilizada para extraer y aislar aceites esenciales de plantas aromáticas. Es una técnica similar a la extracción convencional, pero su diferencia radica en

usar como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido. Un fluido supercrítico puede ser cualquier sustancia a temperatura y presión por arriba de su punto crítico termodinámico. Tiene la capacidad de difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido. El poder solvente de los fluidos supercríticos se encuentra en función de la densidad que puede variar por aumentos graduales ya sea en la presión o en la temperatura. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción. El fluido supercrítico más común utilizado es el dióxido de carbono (CO_2) debido a su temperatura crítica relativamente baja (alrededor de $30\text{ }^\circ\text{C}$), su baja toxicidad, no es costoso, no deja residuos y alta disponibilidad. Este método implica brevemente que el CO_2 se convierte en líquido bajo condiciones de alta presión y calentamiento, luego extrae los compuestos volátiles de los materiales vegetales y, finalmente, regresa a gas y se evapora a presión y temperatura atmosférica normales sin residuos de solventes. Las ventajas de este método son la rapidez, el uso de temperaturas moderadas (menores a $65\text{ }^\circ\text{C}$) que no alteran las propiedades químicas de los compuestos obtenidos, el uso de disolventes orgánicos no nocivos (etanol, metanol, agua), y la obtención de un aceite esencial de alta calidad (buen porcentaje de extracción y gran contenido de compuestos bioactivos).

Extracción por microondas sin disolventes

La extracción asistida por microondas sin solventes es una técnica relativamente nueva que lleva a cabo una extracción más rápida, con menor consumo de energía y solventes y por lo tanto menor costo, es amigable con el medio ambiente y produce aceites esenciales de alto rendimiento y calidad. Este método consiste en calentar el material vegetal utilizando un equipo de microondas y luego una destilación convencional o seca realizada a presión atmosférica sin solventes ni agua. Las microondas operan selectivamente sobre las células de la planta, vaporizando la matriz de agua, causando que los tejidos se hinchen, y se rompan las glándulas y los receptáculos oleíferos. Tras este proceso se libera el aceite esencial, que se evapora por la destilación azeotrópica con el agua presente en el material vegetal y se recupera por condensación. Algunas de las principales condiciones de operación para este método son: tiempos de extracción entre 10 a 60 min, masa de la muestra 260-500 g, potencia de

microondas de 200-800 W. Este proceso se ha aplicado a diversas plantas tanto frescas como secas para la obtención de aceites esenciales de cítricos, laurel, romero, mena, tomillo, albahaca, entre otros.

Otros

Otros métodos alternativos han ganado interés en los últimos años en la obtención de aceites esenciales. Por ejemplo, el campo eléctrico pulsado, que induce la electroporación de las membranas celulares mejorando la difusión de solutos, mejora la tasa de extracción, los rendimientos y reduce el tiempo de extracción. Además, las tecnologías de ultrasonido y óhmicos se utilizan para ayudar a los métodos convencionales a ofrecer varias ventajas, como un mejor control del proceso, un tiempo de extracción más corto, mayores rendimientos y mayor calidad del aceite esencial. La extracción por ultrasonido consiste en la generación de burbujas de cavitación que revientan en la superficie del tejido celular vegetal para destruir las glándulas sebáceas mejorando la transferencia de masa entre la célula y el solvente para liberar el aceite esencial. El principio del calentamiento óhmico es simplemente convertir la energía eléctrica en energía térmica dentro de los materiales alimentarios debido a la resistividad intrínseca de los materiales para producir calor. La tecnología óhmica produce un calentamiento rápido y uniforme, lo que la convierte en una alternativa eficiente para diferentes aplicaciones.

Propiedades Bioactivas de Aceites Esenciales con Potencial Nutraceutico

Numerosas investigaciones demuestran que los aceites esenciales de distintas plantas aromáticas y medicinales presentan propiedades que pueden ser utilizadas para la formulación de nutraceuticos como antimicrobianas, antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas, antiinflamatoria, inmunomoduladores, entre otras.

Antioxidante

Los radicales libres se producen naturalmente como parte de las reacciones biológicas en el organismo. Son moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo lo que las hace sumamente reactivas. Los radicales libres son necesarios para realizar algunas funciones; sin embargo, cuando existe una cantidad excesiva de radicales libres y por largo tiempo pueden causar efectos negativos dañando componentes celulares como proteínas, membranas lipídicas y ácidos nucleicos. Algunas situaciones pueden incrementar la generación de radicales libres como la radiación UV, el tabaquismo, la contaminación, el estrés, una alimentación poco saludable, entre otros. El organismo contiene un completo sistema de protección antioxidante para contrarrestar su acción nociva como enzimas super óxido dismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa. Cuando hay un exceso de radicales ocurre un desequilibrio entre éstos y el sistema antioxidante causando lo que se conoce como estrés oxidativo.

El estrés oxidativo crónico se ha relacionado con muchas enfermedades, como la inflamación crónica, los trastornos cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, el cáncer, la diabetes, las enfermedades pulmonares y el envejecimiento prematuro. Varios estudios han demostrado que el consumo de moléculas antioxidantes en la dieta podría ayudar a reducir el daño oxidativo y prevenir y tratar este tipo de enfermedades. Los antioxidantes son compuestos estables que pueden donar un electrón a los radicales libres y neutralizarlos, limitando o retrasando la capacidad de causar daño.

Los aceites esenciales y sus componentes principales poseen fuertes propiedades antioxidantes similares al ácido ascórbico, la vitamina E y el butilhidroxil-tolueno (BHT), un antioxidante comercial. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales y su potencial para minimizar el daño oxidativo está bien documentada en estudios *in vitro* e *in vivo*. La actividad antioxidante de los aceites esenciales es una propiedad de gran interés porque permite eliminar radicales libres desempeñando un papel importante en la prevención de algunas enfermedades como cáncer, enfermedades cardíacas, deterioro del sistema inmunológico, envejecimiento prematuro, y procesos inflamatorios.

La actividad antioxidante de los aceites esenciales ha sido atribuida a la estructura y variación de los compuestos presentes en ellos. Algunos estudios indican que el componente mayoritario es el que contribuye en mayor proporción con el efecto antioxidante, como en el eugenol en el aceite de clavo, carvacrol en

el de orégano, timol en el de tomillo, entre otros. Mientras que otros estudios reportan que existe un efecto sinérgico entre todos los compuestos presentes en ellos. La estructura de los compuestos en los aceites esenciales juega un papel importante en el mecanismo antioxidante. El mayor potencial antioxidante se correlaciona con la proporción de compuestos que contienen anillo fenólico con un grupo hidroxilo (OH). También algunos autores informan que la presencia de grupos metoxi adicionales aumenta considerable la actividad antioxidante.

Por ejemplo, el modo de acción antioxidante del carvacrol, componente mayoritario del aceite de orégano, está basado en su estructura y está relacionado con la donación de átomos de hidrógeno a electrones desapareados, convirtiéndose en un radical que se estabiliza por su estructura de resonancia (figura 4.3). El anillo de benceno tiene un sustituyente hidroxilo en C5 (posición meta), y dado que el enlace entre el oxígeno y el benceno es muy estable, el grupo hidroxilo se puede desprotonar fácilmente. En los monofenoles, la capacidad de ceder H^+ se asocia con la reducción de radicales libres, la estabilización de oxígeno singlete y la acción quelante de los metales de transición. La actividad antioxidante de los aceites esenciales se ha estudiado a través de diversos métodos como de eliminación de radicales libres, como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y la capacidad de reducir el hierro (FRAP).

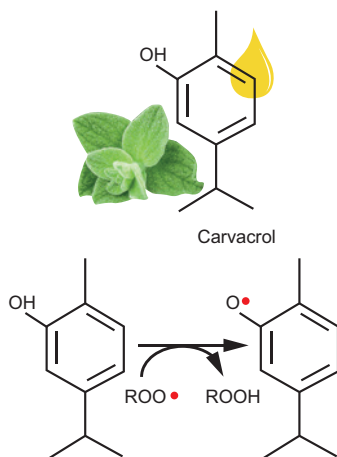


Figura 4.3. Mecanismo antioxidante por transferencia de átomos de hidrógeno del carvacrol, compuesto mayoritario del aceite esencial de orégano y un potente antioxidante.

Numerosos estudios han demostrado la actividad antioxidante de los aceites esenciales de una gran variedad de plantas tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos en modelos murinos. Aquí solo mostraremos algunas investigaciones realizadas en los últimos años. El aceite esencial de *Citrus lumia* Risso, una planta cultivada en Italia, presenta un fuerte potencial antioxidante y de eliminación de radicales libres, particularmente en ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (blanqueo de β -caroteno y ORAC, IC_{50} 22 μ g/mL y 46 μ g/mL, respectivamente), que pueden atribuirse al alto contenido de monoterpenos, especialmente D-limoneno (48.905%), y linalool (18.245%). Debido a estas propiedades, el aceite esencial de *C. lumia* puede tener un papel preventivo en la aparición de patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

Se evaluó la efectividad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a las alteraciones inducidas por el dicromato de potasio en el riñón de ratas macho. La administración oral de este aceite esencial antes o después del tratamiento con dicromato de potasio restauró significativamente la mayoría de los parámetros bioquímicos afectados, además de mejorar la arquitectura del tejido renal y mejorar los marcadores de estrés oxidativo. Por otro lado, los principales compuestos encontrados en los aceites esenciales de clavo, tomillo, orégano y naranja dulce fueron eugenol, timol, 4-terpineol y D-limoneno, respectivamente. El aceite esencial de clavo mostró un mayor porcentaje de inhibición de radicales hidroxilo y óxido nítrico, mientras que el aceite esencial de tomillo mostró una mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH en comparación con los otros aceites evaluados. Estos resultados demuestran el potencial uso de estos aceites esenciales para prevenir y/o tratar enfermedades derivadas del estrés oxidativo.

Dentro de los componentes de los aceites esenciales con mayor potencial antioxidante como ya se ha mencionado es el carvacrol. Se ha informado que el carvacrol tiene mayor capacidad antioxidante que el ácido ascórbico y el antioxidante sintético BHT evaluado a través del método DPPH. Además, el carvacrol ha demostrado un efecto protector sobre el daño por estrés oxidativo inducido por estrés crónico en el cerebro, hígado y riñones de ratas al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) y reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido y los niveles de óxido nítrico.

Por otro lado, tres especies de mentas, *Mentha piperita* (menta), *Mentha spicata* (hierbabuena nativa) y *Mentha gracilis* (menta verde escocesa) demostraron una importante actividad de eliminación de radicales y reducción de Fe^{3+} en ensayos químicos, DPPH y TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y una mayor eficacia en el ensayo de poder reductor. Además, los tres aceites mostraron una actividad equivalente en la mitigación de la peroxidación lipídica inducida por productos químicos en tejidos hepáticos. La adición de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los aceites esenciales de menta verde aumentó las concentraciones de glutatión en las células de epitelio intestinal porcino IPEC-J2 tratadas con H_2O_2 , lo que sugiere una defensa antioxidante endógena mejorada. Así mismo, la suplementación de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aceite esencial de menta o menta verde escocesa aumentó significativamente la tasa de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* en respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . Este efecto fue comparable al de la suplementación de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, otro potente antioxidante.

Debido a que los aceites esenciales son volátiles e hidrofóbicos sus aplicaciones pueden llegar a ser limitadas. En los últimos años se han buscado estrategias como la encapsulación o formación de películas con el aceite esencial para incrementar y proteger la actividad antioxidante. En este sentido, las nanopartículas de quitosano incorporadas con el aceite esencial de clavo mostraron mayor actividad antioxidante que el aceite libre. Por otro lado, la incorporación de aceite de corteza de canela en películas de quitosano incrementó la actividad antioxidante de 6.0 a 14.5 veces y la capacidad protectora frente a la hemólisis eritrocitaria aumentó hasta en un 80% en comparación con las películas de quitosano sin aceite. Por lo que con todos estos estudios se confirma la importancia de los aceites esenciales como antioxidantes, que pudieran ser aplicados como nutraceuticos.

Antimicrobiano

Las infecciones microbianas son cada vez más difíciles de tratar debido al aumento alarmante de la resistencia a múltiples antibióticos, siendo considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo a nivel mundial. La resistencia a antibióticos es un proceso natural; sin embargo, el mal uso de éstos en humanos y animales ha acelerado el proceso. Esto hace que

los antibióticos sean menos efectivos y prolonga las estadías en el hospital, aumenta los costos y las tasas de mortalidad. Por lo tanto, existe una urgencia en la búsqueda de agentes antimicrobianos novedosos y efectivos como alternativa a los antibióticos. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus principales componentes es bien sabida desde la antigüedad ya que han servido con fines farmacéuticos en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas y fúngicas.

Numerosos estudios han demostrado el potencial de los aceites esenciales contra un amplio rango de bacterias Gram negativas y Gram positivas. En la tabla 4.3 se muestran algunos estudios señalando el potencial antibacteriano que presentan algunos aceites esenciales. Los aceites esenciales con mayor actividad antibacteriana son orégano (*Origanum vulgare*), clavo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum cassia*), tomillo (*Thymus vulgaris*), menta (*Mentha*), romero (*Salvia rosmarinus*), y salvia (*Salvia officinalis*) por mencionar algunos. En un estudio se reportó que el aceite esencial de orégano (1.25-5.00 µg/mL) tiene actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *Streptococcus pneumoniae*, una de las bacterias más importantes causantes de infecciones respiratorias, incluyendo sinusitis, otitis media, neumonía e infecciones invasivas como septicemia y meningitis. Carvacrol, el componente mayoritario de aceite esencial de orégano, presenta una actividad antibacteriana fuerte contra un amplio rango de bacterias patógenas causantes de enfermedades gastrointestinales, urinarias y respiratorias como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* uropatógena, y *Clostridium difficile*.

Generalmente, el mecanismo antibacteriano de los aceites esenciales está relacionado con su hidrofobicidad y la estructura de sus componentes. La naturaleza lipófila de los aceites esenciales les permite atravesar la pared celular y dañar la membrana citoplásmica al mismo tiempo que altera varias capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y eventualmente los vuelve permeables. También pueden unirse a las proteínas para evitar que realicen sus funciones normales como transporte de moléculas y iones. Los componentes hidrofóbicos presentes en el aceite esencial podrían cambiar la permeabilidad de la membrana celular microbiana para cationes como H⁺ y K⁺, los cuales modifican el flujo de protones, modificando el pH celular y afectando la composición química de las células y su actividad. La pérdida de permeabilidad diferencial da como resultado un desequilibrio en la presión osmótica intracelular, que posteriormente altera los orgánulos intracelulares, conduce a la liberación del contenido

citoplasmático, afecta la fuerza motriz de los protones y el agotamiento de la reserva de ATP, desnaturaliza varias enzimas y proteínas, causando finalmente la muerte celular. La figura 4.4 muestra una representación del modo de acción antibacteriano de los aceites esenciales y sus componentes.

Además, se ha propuesto que los aceites esenciales y sus componentes son efectivos para interferir con algunos factores de virulencia como motilidad, formación de biopelículas y el sistema de comunicación intercelular conocido en inglés como *Quorum sensing*. Se han descrito las propiedades antibacterianas del aceite esencial de canela y sus componentes mayoritarios, resaltando la inhibición del crecimiento celular al dañar la membrana celular; alteración del perfil lipídico, inhibición de ATPasas, afectación de la división celular, porinas de membrana, motilidad, formación de biopelículas y el *Quorum sensing*.

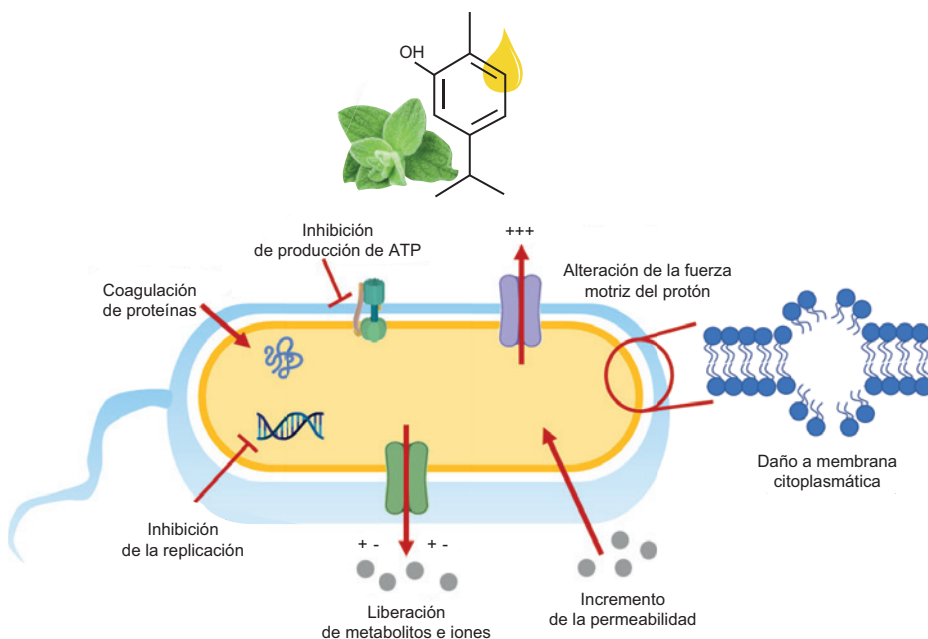


Figura 4.4. Mecanismos antibacterianos propuestos para los aceites esenciales.

Tabla 4.3. Efecto de la aplicación de aceites esenciales contra diversas bacterias

Aceite esencial	Microorganismos	Referencia
Orégano	<i>Staphylococcus aureus</i> metil resistente	(Cui <i>et al.</i> , 2019; Luo <i>et al.</i> , 2022; Mith <i>et al.</i> , 2014; Wijesundara & Rupasinghe, 2018)
	<i>Vibrio vulnificus</i>	
	<i>Salmonella</i> entérica	
	<i>Erwinia rhapontici</i>	
	<i>Xanthomonas campestris</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Hierba de limón	<i>Bacillus thermosphacta</i>	(Adukwu, Allen, & Phillips, 2012; Bassolé <i>et al.</i> , 2011; Moore-Neibel, Gerber, Patel, Friedman, & Ravishankar, 2012; Naik, Fomda, Jaykumar, & Bhat, 2010)
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Acitenobacter baumannii</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Clavo	<i>Salmonella</i> Typhimurium	(Nirmala, Durai, Gopakumar, & Nagarajan, 2019; Silva-Espinoza <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Albahaca	<i>Bacillus cereus</i>	(Baldim <i>et al.</i> , 2018; Stanojevic <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Canela	<i>Escherichia coli</i>	(El Atki <i>et al.</i> , 2019; Firmino <i>et al.</i> , 2018; Kaskatepe <i>et al.</i> , 2016; Mith <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Acitenobacter baumannii</i>	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Bacillus thermosphacta</i> <i>Escherichia coli</i>		
Tomillo	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Abdollahzadeh, Rezaei, & Hosseini, 2014; Alsaraf <i>et al.</i> , 2020; Mith <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Romero	<i>Bacillus thermosphacta</i> <i>Escherichia coli</i>	(Bajalan, Rouzbahani, Pirbalouti, & Maggi, 2017)
	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

También se ha reportado el efecto antifúngico de varios aceites esenciales contra diversos hongos (tabla 4.4). En la actualidad, las investigaciones relacionadas con el modo de acción de los aceites esenciales sobre las esporas de hongos y las células de micelio son más escasas en comparación con los estudios basados en bacterias, sin embargo, el mecanismo propuesto es similar. Dentro de los mecanismos antifúngicos se describen disrupción de la membrana y pared celular a través de la inhibición de la síntesis de ergosterol y β -glucanos. Otros mecanismos son inhibición de bombas de eflujo, alteración de la morfología celular, alteración de la mitocondria a través de la inhibición de las bombas de protones, causando una reducción en la producción de ATP y consiguiente muerte celular, y reducción en la formación de biopelículas y factores de virulencia de algunos hongos.

Tabla 4.4. Efecto de la aplicación de los aceites esenciales contra hongos

Aceite esencial	Microorganismo	Referencia
Hierba de limón	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus flavus</i>	(Alharaty & Ramaswamy, 2020; Helal, Sarhan, Abu Shahla, & Abou El-Khair, 2007)
Oregano	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium verticillioides</i>	(Aguilar-Pérez, Medina, Narayanan, Parra-Saldívar, & Iqbal, 2021; Roselló, Sempere, Sanz-Berzosa, Chiralt, & Santamarina, 2015)
Tomillo	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	(Moazeni <i>et al.</i> , 2021; Oliveira, Carvajal-Moreno, Correa, & Rojo-Callejas, 2020)
Albahaca	<i>Aspergillus flavus</i>	(Abou El-Soud, Deabes, Abou El-Kassem, & Khalil, 2015)
Clavo	<i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Helminthosporium oryzae</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	(Hasheminejad, Khodaiyan, & Safari, 2019; Kaur <i>et al.</i> , 2019)

Aunque son pocas las investigaciones realizadas, algunos aceites esenciales han demostrado actividad frente a virus y en la tabla 4.5 se resumen algunos de estos estudios. Es importante resaltar que algunos compuestos presentes en los aceites esenciales están siendo tomados en cuenta para el tra-

tamiento y prevención de la enfermedad coronavirus 19 (COVID-19) causada por el virus SARS-CoV2 que tiene actualmente al mundo en una pandemia. Se sabe que el proceso infeccioso del SARS-CoV2 comienza por la interacción entre la proteína espiga en la superficie del virus y los receptores ACE2 de las células huésped humanas, lo que permite que el virus ingrese a la célula y se inicie la infección. En este sentido, el carvacrol se estudió mediante modelado molecular su potencial para interactuar con moléculas críticas del proceso infeccioso. Primero, este compuesto mostró el potencial de inhibir la actividad de ACE2, y los autores sugirieron que puede bloquear la entrada de SARS-CoV2 en la célula huésped. Por otro lado, se demostró mediante el acoplamiento molecular el potencial del carvacrol para inhibir la unión de la glicoproteína del pico viral (S) a la célula huésped. Además, se ha demostrado mediante modelado molecular que el carvacrol interactúa con Mpro, una enzima proteasa del genoma viral, lo que podría tener un efecto significativo en la replicación y maduración del SARS-CoV2.

La acción de los aceites esenciales puede interferir a nivel extracelular, es decir, en la penetración del virus a la célula huésped, interfiriendo con la estructura de la envoltura viral, o bloqueando proteínas virales que son necesarias para que el virus ingrese a las células huésped. Los aceites esenciales también pueden tener efectos antivirales contra los virus intracelulares. Además, un posible mecanismo es la inhibición de la replicación viral al afectar a enzimas responsables de este suceso. En general, los mecanismos aún no se comprenden completamente. No hay datos precisos sobre el mecanismo de acción molecular, incluidos los sitios específicos de acción y los tipos de interacciones. Es importante conocer estos mecanismos para poder utilizar el potencial de los aceites esenciales.

Tabla 4.5. Efecto de los aceites esenciales aplicados contra virus

Aceite esencial	Microorganismo	Referencia
Hierba de limón	Herpes simple 1 Norovirus murino	(Kim <i>et al.</i> , 2017; Minami <i>et al.</i> , 2003; Mukarram <i>et al.</i> , 2022)
Orégano	Herpes simple tipo 1	(Mediouni <i>et al.</i> , 2020; Reichling, Schnitzler, Suschke, & Saller, 2009)
Sabia	Herpes simple tipo 1	(Reichling <i>et al.</i> , 2009)
Tomillo	Influenza	(Vimalanathan & Hudson, 2014)

Aceite esencial	Microorganismo	Referencia
Canela	Influenza	(Vimalanathan & Hudson, 2014)
Eucalipto	Influenza	(Pyankov, Usachev, Pyankova, & Agranovski, 2012)
Árbol de té	Influenza	(Pyankov <i>et al.</i> , 2012)

Anticancerígeno

El cáncer es un problema de salud pública mundial, que implica el crecimiento descontrolado de células. Las células pierden su interacción entre sí, invaden los tejidos vecinos y finalmente se propagan a tejidos distantes del cuerpo. Es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (GLOBOCAN) estima que hubo 19.3 millones de nuevos cáncer y 10 millones de muertes por cáncer en todo el mundo en 2020. Los cánceres más comúnmente diagnosticados fueron el cáncer de mama en mujeres, pulmón y próstata, mientras que las causas de muerte fueron por cáncer en pulmón, hígado y estómago. La terapia tradicional para tratar el cáncer no es del todo efectiva, ejerce fuertes efectos secundarios atribuidos a la acción no selectiva sobre las células (cancerosas y no cancerosas), muestra una mayor tasa de resistencia a múltiples fármacos y es muy costosa. Por lo tanto, actualmente se realizan muchas investigaciones para buscar nuevos compuestos anticancerígenos que puedan prevenir la mutación en las células, inhibir la proliferación de células cancerosas e inducir la apoptosis. En particular los aceites esenciales y sus componentes han mostrado ser potentes anticancerígenos en ensayos *in vitro*.

El citral, uno de los compuestos mayoritarios de aceite de la hierba de limón, tiene un potencial antiproliferativo contra varios tipos de líneas celulares como cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cervix, y cáncer de mama pero sorprendentemente no es citotóxico para células epiteliales normales. Aunque diversos estudios han reportado la efectividad del aceite de hierba de limón como anticancerígeno, no se conoce exactamente su modo de acción. Los estudios indican que el citral tiene acción a través de la procaspasa 3 activada, la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular en la fase G2/M, con esto causando la muerte de las células cancerígenas.

El aceite esencial de orégano ha ejercido actividad anticancerígena por mecanismos como actividades antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas atribuidas principalmente al carvacrol, su componente principal. Se ha

informado que el carvacrol (0.5 y 1 $\mu\text{mol/placa}$) ejerce una fuerte antimutagenicidad mostrando una inhibición del mutágeno metanosulfonato de metilo en cepas de *S. Typhimurium* TA98 y TA1538. Los efectos observados estaban relacionados con una posible interacción con el mutágeno, impidiendo su entrada en la célula o induciendo enzimas desintoxicantes. Del mismo modo, se ha demostrado que el carvacrol podría actuar como un fuerte antimutágeno directo contra la nitro-O-fenilendiamina y el 2-aminofluoreno, lo que sugiere la importancia del carvacrol para la prevención del cáncer. Los mecanismos involucrados para proteger contra la mutación celular son la interacción con el mutágeno (mutágeno directo o indirecto), la inhibición de la actividad catalítica de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos, la eliminación de metabolitos formados después de la bioactivación y la inducción de mecanismos de reparación del ADN. Sin embargo, los mecanismos exactos de los compuestos naturales no se conocen por completo.

Además del efecto antimutagénico, algunos estudios demuestran el efecto prometedor de carvacrol en la segunda etapa de la carcinogénesis, induciendo actividades antiproliferativas y apoptóticas contra células cancerígenas. El carvacrol ha presentado efecto contra líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y LoVo, cáncer de cérvix, cáncer de pulmón A549 y H460, células de adenocarcinoma gástrico entre otras. Los mecanismos moleculares exactos implicados en la actividad anticancerígena del carvacrol no están completamente definidos. Los mecanismos anticancerígenos informados actualmente involucran interrupciones del potencial de la membrana mitocondrial, formación de especies reactivas de oxígeno, expresión y represión de proteínas específicas de la cascada apoptótica observada en diferentes líneas celulares de cáncer de diferentes órganos.

En la literatura hay pocos estudios que indican el efecto antiproliferativo *in vivo* de aceites esenciales. Por ejemplo, se ha investigado el efecto del carvacrol sobre el cáncer de hígado inducido por dietilnitrosamina en ratas albinas Wistar macho. Este estudio confirma el uso potencial del carvacrol como quimiopreventivo durante la progresión del cáncer de hígado. Además, los resultados revelaron que la suplementación con carvacrol (15 mg/kg de peso corporal) atenuó la aparición de focos y nódulos hepáticos y mostró actividades antioxidantes y de captación de radicales libres para modular los niveles de peroxidación lipídica y aumentar los mecanismos antioxidantes endógenos en la carcinogénesis hepatocelular inducida. De manera similar, el

aceite esencial de orégano mostró efecto antiproliferativo contra la línea celular de cáncer colorectal y su administración oral profiláctica en un modelo de ratón experimental BALB/c inhibiendo el crecimiento de tumores de colon. La administración de carvacrol a 100 mg/kg/día por peso corporal disminuyó el volumen de tumores de cáncer de mama en ratas.

Otros aceites esenciales también han demostrado actividad anticancerígena. Por ejemplo, las emulsiones basadas en nanoescala con aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) tuvieron un efecto apoptótico y de reducción en la proliferación de líneas celulares de cáncer de tiroides lo que lo hacen un candidato prometedor como medicamento alternativo contra el cáncer. Otro estudio reportó la actividad citotóxica de los aceites esenciales de clavo, citronela (*Cymbopogon nardus*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y neem (*Azadirachta indica*) contra líneas celulares humanas MCF-7 (Carcinoma ductal de mama invasivo), K-562 (explosión de linfa), HeLa (cáncer de cuello uterino). De manera similar, el aceite esencial de romero produce citotoxicidad dependiente de la dosis contra células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 con valor IC_{50} de 59.35 $\mu\text{g/mL}$. Se ha demostrado que el romero produce su acción anticancerígena al detener la activación de carcinógenos, aumentar las actividades de las enzimas antioxidantes, reducir la inflamación que estimula los tumores, disminuir el crecimiento celular, estimular la muerte celular programada y suprimir la angiogénesis e invasión tumoral. Sin embargo, todavía son necesarios numerosos estudios previos para poder utilizar el romero y sus derivados en la práctica clínica, ya que todavía falta estandarizar el proceso de extracción y las concentraciones, ya que son muy variadas entre los estudios reportados. En la tabla 4.6, se muestran más estudios que sustentan la efectividad anticancerígena de los aceites esenciales.

Tabla 4.6. Potencial anticancerígeno de aceites esenciales

Aceite esencial	Nombre científico	Línea celular cancerígena	Referencia
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>	Próstata (PC-3 and DU145)	(Zhao <i>et al.</i> , 2017)
Melissa	<i>Melissa officinalis</i>	Pulmón (A549) Mama (MCF-7) Colon (Caco-2), Leucemia (HL-60 and K562) Melanoma de ratón (B16F10)	(De Sousa <i>et al.</i> , 2004)
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Cervix (HeLa) Laringe (Hep2) Pulmón (A549) Mama (MCF-7) Prostata (LNCaP)	(Hussain, Anwar, Nigam, Ashraf, & Gilani, 2010; Nikolić, Jovanović, <i>et al.</i> , 2014; Rahimifard <i>et al.</i> , 2010)
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Carcinoma de ascitis (Ehrlich) Cervix (HeLa) Epitelio de laringe (Hep-2)	(Kathirvel & Ravi, 2012; Taie & RADWAN, 2010)
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	Cervix (HeLa) Pulmón (A549) Leucemia (HL-60 and K562) Mama (MCF-7) Ovario (A2780) Melanoma (A375, M14 and A2058)	(Foray <i>et al.</i> , 1999; Russo <i>et al.</i> , 2013)
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Célula escamosa de la cavidad oral (UM-SCC1) Mama (MCF-7) Pulmón (NCI-H460, A549) Colon (HCT-15) Cervix (HeLa) Hepatocelular (HepG2) Próstata (PC-3)	(Nikolić, Glamočlija, <i>et al.</i> , 2014; Sertel, Eichhorn, Plinkert, & Efferth, 2011; Zu <i>et al.</i> , 2010)

Antiinflamatorio

El proceso inflamatorio forma parte esencial de la respuesta inmune como mecanismo de defensa ante la infección por microorganismos patógenos o exposición a agentes químicos nocivos para el organismo. En respuesta, el cuerpo

altera las funciones vasculares y celulares, enviando químicos de defensa a la inflamación. Cuando el proceso inflamatorio persiste, puede causar daño tisular causado por células tisulares ofensivas (como macrófagos y linfocitos) y presentar síntomas potencialmente dañinos para el organismo, como el desarrollo de químicos letales, tanto para el agresor inflamatorio como para el propio cuerpo humano. La inflamación aguda se caracteriza por una duración relativamente corta (horas a días) e involucra el mecanismo descrito anteriormente. La inflamación crónica se refiere a una respuesta más prolongada (meses a años) e incluye algunas enfermedades humanas como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la tuberculosis y la enfermedad pulmonar crónica. Las enfermedades neurodegenerativas graves como el Alzheimer o el Parkinson pueden empeorar por la secreción desregulada de mediadores inflamatorios.

El uso de terapias alternativas basadas en compuestos naturales es un tratamiento prometedor para aliviar las complicaciones provocadas por el proceso inflamatorio de muchas enfermedades. Compuestos de origen natural como los aceites esenciales han demostrado una actividad antiinflamatoria debido a su capacidad para suprimir la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2, inhibir la producción y acciones del óxido nítrico (NO) e inhibir la cascada de señalización que provoca la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias en los tejidos afectados.

Como se ha mencionado anteriormente, el carvacrol presente en aceites esenciales de orégano y satureja es un compuesto altamente bioactivo. Diversos estudios han demostrado su efectividad como antiinflamatorio. Se ha informado el efecto antiinflamatorio del carvacrol al inhibir la COX-2, enzima esencial responsable de transformar el ácido araquidónico en prostaglandinas y leucotrienos involucrados en el proceso inflamatorio. Además, este terpenoide disminuyó la concentración de prostaglandina E2 (PGE2) y los niveles de interleucina IL-8 proinflamatoria, que participan en el sistema inmunológico mediante la activación de neutrófilos, incremento de proteínas de adhesión en las células endoteliales y metabolismo oxidativo por polimorfonucleares neutrófilos.

La suplementación con carvacrol (0.2 mg/kg/día durante dos meses) en pacientes con lesiones pulmonares provocó una disminución de las citocinas proinflamatorias IL-2, IL-4, IL-10, IL-8, IL-6 y TNF- α y un aumento de los niveles de citocinas antiinflamatorias IL-10 e interferón-gamma (IFN γ). Estos resultados sugirieron el uso potencial de carvacrol para reducir los casos

graves de síndrome de dificultad respiratoria aguda y el desarrollo de lesiones pulmonares agudas. Otro estudio ha reportado que la administración de carvacrol en ratas inducidas por asma bronquial redujo los niveles de interleucinas como IL-13, IL-5, IL-4, IgE, TNF- α , entre otros mediadores proinflamatorios. El mecanismo de acción sugerido muestra que el carvacrol es un potente supresor de eosinófilos, que son la principal fuente de IL-5. Esto, junto con una regulación en el equilibrio de las citocinas Th1 y Th2, demuestra el potencial del carvacrol como tratamiento antiasmático al limitar la cascada de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión celular.

Varios estudios *in vitro* informaron que el aceite esencial de romero presenta propiedades antiinflamatorias, mediante la inhibición significativa de la enzima ciclooxigenasa COX-2 y la inhibición de la producción de NO. Otro estudio demostró la inhibición significativa de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α). No existe mucha evidencia disponible acerca del efecto de aceites esenciales antiinflamatorios en estudios *in vivo*. Se ha mostrado que la aplicación tópica de extractos de romero provocó una reducción del edema, sin embargo, este efecto no puede ser extrapolado al consumo humano. La actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de romero administrados por vía oral (100, 200 o 400 mg/kg) se estudió en ratas Wistar machos a las cuales se les causó inflamación inducida por carragenina en el tejido subcutáneo. Los resultados mostraron que el extracto de romero causó una reducción dependiente de la dosis en la migración de neutrófilos, así como una disminución de los niveles de superóxido dismutasa, sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico, leucotrieno B₄, prostaglandina E₂, IL-6 y TNF- α en el exudado inflamado al bloquear las vías de los neutrófilos, migración y secreción.

Por otro lado, el aceite de clavo también presenta actividad antiinflamatoria. Este aceite inhibe la producción de varios biomarcadores proinflamatorios como la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), la proteína 10 inducida por interferón c (IP-10), quimioatrayente de células T inducible por interferón c (I-TAC), y monocina inducida por interferón c (MIG). Además, el aceite de clavo modula significativamente la expresión génica global y altera las vías de señalización críticas para la inflamación, remodelación de tejidos y procesos de señalización del cáncer. En el mismo acercamiento, se reportó el efecto antiinflamatorio del eugenol, compuesto mayoritario del aceite de clavo, con propósitos para ser utilizado por dentistas. En este estudio se observó que el eugenol a una dosis de 200 mg/kg inhibió significativamente

el edema inducido por carragenina y en dosis de 50, 75 y 100 mg/kg tuvo un efecto antinociceptivo, que es la reversión o alteración de los aspectos sensoriales de la intensidad del dolor.

Otros aceites esenciales han demostrado actividades antiinflamatorias similares como el aceite esencial de hierbabuena, mejorana y hierba de limón.

Otras actividades

Los aceites esenciales tienen numerosas propiedades bioactivas además de las descritas anteriormente como propiedad antidiabética y antihiperlipidemia; aunque su estudio todavía es limitado. Hoy en día, la diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes y graves que afectan la salud humana. La diabetes ocurre cuando las células y los tejidos no pueden usar la glucosa en sangre debido al metabolismo anormal de la insulina, lo que resulta en hiperglucemia y diversas consecuencias metabólicas y funcionales. La prevalencia de la diabetes ha aumentado significativamente en las últimas décadas, lo que la convierte en un importante desafío para la salud pública.

Los compuestos bioactivos de los aceites esenciales han demostrado una actividad antidiabética crucial. En este sentido, los aceites esenciales de clavo, tomillo, orégano y naranja dulce fueron evaluados por su actividad antihiper-glucémica, además de su potencial antioxidante. En ensayos de inhibición de enzimas digestivas relacionadas con el desarrollo de hiperglucemia, el aceite esencial de tomillo mostró la mayor capacidad para inhibir la α -amilasa, mientras que el aceite esencial de naranja dulce mostró la inhibición más potente de la α -glucosidasa. Estos resultados demuestran el potencial del uso de estos aceites esenciales para prevenir y/o tratar enfermedades derivadas del estrés oxidativo, como la diabetes mellitus. Del mismo modo, el estudio *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* reveló que produce una inhibición dependiente de la dosis de las enzimas α -glucosidasa que es comparable al fármaco estándar acarbosa.

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo y han sido reconocidas como un contribuyente esencial al costo de la atención médica. Estas enfermedades están relacionadas con insuficiencia cardíaca, hipertensión, agregación plaquetaria, problemas cardíacos y colesterol de baja densidad y triglicéridos elevados. De ahí que diversas investigaciones científicas hayan buscado nuevos agentes terapéuti-

cos para prevenir y tratar las enfermedades cardiovasculares. Existen pocos estudios en la literatura que demuestren el potencial de aceites esenciales en la protección contra enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, el aceite esencial de *Thymus daenensis* redujo el nivel de colesterol y triglicéridos en ratas machos Wistar con hipercolesterolemia. El tratamiento con hierba de limón (100 y 200 mg/kg por peso corporal) mostró una inhibición significativa contra la hiperlipidemia causada por dexametasona en ratas macho al mantener los niveles séricos de colesterol, triglicéridos e índice aterogénico cerca de los niveles normales y el efecto antihiperlipidémico del aceite de limoncillo fue comparable con la atorvastatina 10 mg/kg por peso corporal. El posible mecanismo puede estar asociado con la disminución de la actividad de la lecitina colesterol acetil transferasa, una enzima relacionada al metabolismo de lípidos. Por otro lado, se estudió el efecto del extracto y aceite esencial de albahaca en el perfil de lípidos séricos en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol. Tanto el extracto como el aceite redujeron los triglicéridos séricos y hepáticos y el colesterol total y hepático.

Protocolos

Protocolo para la extracción de aceite esencial de orégano y la evaluación de su actividad antimicrobiana contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*

Este protocolo indica los materiales, reactivos y el procedimiento que se desarrollará para la obtención de aceites esenciales y para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del aceite esencial contra bacterias patógenas. Como ejemplo, se describe el proceso para la obtención de aceite esencial de orégano contra *Staphylococcus aureus*.

Material biológico

- 50 g de hojas secas de orégano
- *Staphylococcus aureus*

Material de laboratorio:

- Matraz matraz bola de 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL (con tapón monohoradado)
- Matraz de recolección de 100 mL
- Fuente de calor (mechero o parrilla de calentamiento)
- Refrigerante
- Mangueras
- Termómetro
- Embudo de separación
- Microplacas de 96 pocillos (estériles)
- Cajas Petri (estériles)
- Micropipetas 200 μ L y 1000 μ L (estériles)

Reactivos:

- Caldo Mueller Hinton
- Agar Mueller Hinton
- Agua destilada

Equipos:

- Lector de microplacas
- Autoclave

Procedimiento:

Extracción del aceite esencial mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor

1. Se prepara y se monta todo el equipo de destilación como lo muestra la figura 4.2.
2. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregan 400 mL de agua destilada. Se tapa el matraz con un tapón de un orificio donde se coloca un tubo de vidrio que desemboca debajo o lo más cerca de la muestra de orégano. Este tubo llevará el vapor generado en el matraz.

3. Se colocan 50 g de hojas secas de orégano cortadas en trozos pequeños (2 cm) en el matraz bola con 10 mL de agua destilada.
4. Se prende la fuente de calor para permitir que el agua en el primer matraz llegué a ebullición y que el vapor generado arrastre los compuestos volátiles del orégano y se condensen por el refrigerante.
5. Transcurrido un determinado tiempo, se recolecta la muestra que cae por el refrigerante en un matraz.
6. Se separa la parte acuosa del aceite obtenido con un embudo de separación por diferencia de densidades. Se pesa el aceite obtenido para determinar el rendimiento de aceite en relación a la muestra inicial utilizada de acuerdo a la siguiente ecuación:
7. Se almacena el aceite en un frasco ámbar a 4 °C hasta su uso.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial frente *S. aureus*

1. Para la preparación del inóculo, se toma una asada de un stock de *S. aureus*, se inocula en caldo Mueller Hinton (20 µL) y se incuba por 19 h a 37 °C.
2. Se ajusta el inóculo bacteriano a una absorbancia de 0.1 a 600 nm o a una turbidez equivalente a 0.5 estándar McFarland (1×10^8 UFC/mL).
3. Se preparan diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano disuelto en caldo Mueller Hinton (rango: 10 – 1000 mg/mL).
4. Se emplea la técnica de microdilución en caldo para la determinación de la CMI, para esto se transfieren 5 µL del inóculo ajustado a un pocillo de una microplaca.
5. Se agregan 295 µL de las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano.
6. Como control negativo se colocan 5 µL del inóculo más 295 µL de caldo Mueller Hinton (sin aceite esencial) en un pocillo.
7. Como control positivo se agrega 5 µL del inóculo más 295 µL de antibiótico diluido en caldo Mueller Hinton.
8. Cada determinación se realiza por triplicado.
9. Se incuba la microplaca por 24 h a 37 °C.
La concentración más baja del aceite esencial que evita visualmente el crecimiento de inóculo se toma como la CMI.

Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial frente *S. aureus*

1. De la microplaca preparada en la determinación de la CMI, se toman 20 μ L del pozo con la CMI y tres concentraciones superiores y se siembran en agar Mueller Hinton.
2. Las placas inoculadas se incuban por 24 h a 37 °C.
La concentración más baja que evita completamente el crecimiento en el agar se toma como la CMB.

Resultados obtenidos

De este protocolo se pueden obtener los resultados mostrados en la siguiente tabla.

	Resultado
Porcentaje de rendimiento del aceite esencial	1.5%
CMI	200 mg//mL
CMB	400 mg//mL

Abreviaturas

ATP: adenosin trifosfato

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

BHT: butil-hidroxil-tolueno

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMB: concentración mínima bactericida

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

FRAP: capacidad reductora de hierro

TEAC: capacidad antioxidante equivalente a Trolox

UFC: unidades formadoras de colonias

Bibliografía

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food control*, 35(1), 177-183.
- Abou El-Soud, N. H., Deabes, M., Abou El-Kassem, L., & Khalil, M. (2015). Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(3), 374.
- Adukwu, E., Allen, S. C., & Phillips, C. A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1217-1227.
- Aguilar-Pérez, K. M., Medina, D. I., Narayanan, J., Parra-Saldívar, R., & Iqbal, H. (2021). Synthesis and nano-sized characterization of bioactive oregano essential oil molecule-loaded small unilamellar nanoliposomes with antifungal potentialities. *Molecules*, 26(10), 2880.
- Alharaty, G., & Ramaswamy, H. S. (2020). The effect of sodium alginate-calcium chloride coating on the quality parameters and shelf life of strawberry cut fruits. *Journal of Composites Science*, 4(3), 123.
- Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Al Lawati, A. A., & Khan, S. A. (2020). Chemical composition, *in vitro* antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with *in silico* studies of its major constituent. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1021-1028.
- Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., De Feo, V., Porta, R., . . . Mauriello, G. (2021). Basil essential oil: Composition, antimicrobial properties, and microencapsulation to produce active chitosan films for food packaging. *Foods*, 10(1), 121.
- Bai, M., Jin, X., Cen, Z., Yu, K., Yu, H., Xiao, R., . . . Li, Y. (2021). GC-MS and FTIR spectroscopy for the identification and assessment of essential oil components of five cinnamon leaves. *Brazilian Journal of Botany*, 44(3), 525-535.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., & Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 107, 305-311.

- Baldim, J. L., Silveira, J. G. F., Almeida, A. P., Carvalho, P. L. N., Rosa, W., Schripsema, J., . . . Luiz, J. H. H. (2018). The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products*, 112, 821-829.
- Bassolé, I., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L., Ilboudo, A., Franz, C., . . . Dicko, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12), 1070-1074.
- Beigi, M., Torki-Harchegani, M., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 267-276.
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, 139, 111498.
- De Sousa, A. C., Gattass, C. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Blank, A. F., & Alves, P. B. (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(5), 677-681.
- El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., . . . Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 10(2), 63.
- El Euch, S. K., Hassine, D., Cazaux, S., Bouzouita, N., & Bouajila, J. (2019). *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *South African Journal of Botany*, 120, 253-260.
- Firmino, D. F., Cavalcante, T. T., Gomes, G. A., Firmino, N., Rosa, L. D., de Carvalho, M. G., & Catunda Jr, F. E. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of *Cinnamomum* sp. essential oil and cinnamaldehyde: antimicrobial activities. *The Scientific World Journal*, 2018.
- Foray, L., Bertrand, C., Pinguet, F., Soulier, M., Astre, C., Marion, C., . . . Besière, J.-M. (1999). *In vitro* cytotoxic activity of three essential oils from *Salvia* species. *Journal of Essential Oil Research*, 11(4), 522-526.
- Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., & Safari, M. (2019). Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 275, 113-122.

- Helal, G., Sarhan, M., Abu Shahla, A., & Abou El-Khair, E. (2007). Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 47(1), 5-15.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
- Jafari-Sales, A., & Pashazadeh, M. (2020). Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(1), 62-69.
- Jiang, Y., Wang, D., Li, F., Li, D., & Huang, Q. (2020). Cinnamon essential oil Pickering emulsion stabilized by zein-pectin composite nanoparticles: Characterization, antimicrobial effect and advantages in storage application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1280-1289.
- Kačániová, M., Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Ďúranová, H., Kowalczewski, P. Ł., . . . Vukic, M. (2021). Chemical composition, *in vitro* and in situ antimicrobial and antibiofilm activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) essential oil. *Plants*, 10(10), 2185.
- Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Suzuk, S., Erdem, S. A., Cesur, S., & Yildiz, S. (2016). Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Industrial Crops and Products*, 81, 191-194.
- Kathirvel, P., & Ravi, S. (2012). Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research*, 26(12), 1112-1118.
- Kaur, K., Kaushal, S., & Rani, R. (2019). Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil, its major compound and its derivatives. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(5), 1195-1217.
- Kim, Y. W., You, H. J., Lee, S., Kim, B., Kim, D. K., Choi, J.-B., Lee, J. S. (2017). Inactivation of norovirus by lemongrass essential oil using a norovirus surrogate system. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1293-1302.

- Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Machado, R. A., & Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 430-436.
- Luo, K., Zhao, P., He, Y., Kang, S., Shen, C., Wang, S., Shi, C. (2022). Antibacterial effect of oregano essential oil against *Vibrio vulnificus* and its mechanism. *Foods*, 11(3), 403.
- Majewska, E., Kozłowska, M., Gruszczynska-Sekowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4).
- Mediouni, S., Jablonski, J., Tsuda, S., Barsamian, A., Kessing, C., Richard, A., Even, Y. (2020). Oregano oil and its principal component, carvacrol, inhibit HIV-1 fusion into target cells. *Journal of Virology*, 94(15), e00147-00120.
- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., & Imanishi, J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. *Microbiology and Immunology*, 47(9), 681-684.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science and Nutrition*, 2(4), 403-416.
- Moazeni, M., Davari, A., Shabanzadeh, S., Akhtari, J., Saeedi, M., Mortyeza-Semnani, K., . . . Roohi, B. (2021). *In vitro* antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100452.
- Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., & Ravishankar, S. (2012). Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 485-492.
- Mukarram, M., Choudhary, S., Khan, M. A., Poltronieri, P., Khan, M., Ali, J., Shahid, M. (2022). Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. *Antioxidants*, 11(1), 1-20.
- Naik, M. I., Fomda, B. A., Jaykumar, E., & Bhat, J. A. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(7), 535-538.

- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225-232.
- Nirmala, M. J., Durai, L., Gopakumar, V., & Nagarajan, R. (2019). Anticancer and antibacterial effects of a clove bud essential oil-based nanoscale emulsion system. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6439.
- Oliveira, R. C., Carvajal-Moreno, M., Correa, B., & Rojo-Callejas, F. (2020). Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, 315, 126096.
- Pyankov, O. V., Usachev, E. V., Pyankova, O., & Agranovski, I. E. (2012). Inactivation of airborne influenza virus by tea tree and eucalyptus oils. *Aerosol Science and Technology*, 46(12), 1295-1302.
- Rahimifard, N., Haji, M. H., Hedayati, M., Bagheri, O., Pishehvar, H., & Ajani, Y. (2010). Cytotoxic effects of essential oils and extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep2 cell lines. *Journal of Medicinal Plants*, 9(35), 88-92.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Complementary Medicine Research*, 16(2), 79-90.
- Roselló, J., Sempere, F., Sanz-Berzosa, I., Chiralt, A., & Santamarina, M. P. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), 359-367.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfino, S., Cardile, V., Bruno, M. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42-47.
- Sadeh, D., Nitzan, N., Chaimovitch, D., Shachter, A., Ghanim, M., & Dudai, N. (2019). Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method

- on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, 138, 111419.
- Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., & Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31(1), 81-87.
- Silva-Espinoza, B. A., Palomares-Navarro, J. J., Tapia-Rodriguez, M. R., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Silva-Campa, E., Ayala-Zavala, J. F. (2020). Combination of ultraviolet light-C and clove essential oil to inactivate *Salmonella* Typhimurium biofilms on stainless steel. *Journal of Food Safety*, 40(3), e12788.
- Stanojevic, L. P., Marjanovic-Balaban, Z. R., Kalaba, V. D., Stanojevic, J. S., Cvetkovic, D. J., & Cakic, M. D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(6), 1557-1569.
- Taie, H. A. A., & Radwan, S. (2010). Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 119-127.
- Tammar, S., Salem, N., Bettaieb Rebey, I., Sriti, J., Hammami, M., Khammassi, S., Msaada, K. (2019). Regional effect on essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 31(2), 129-137.
- Vimalanathan, S., & Hudson, J. (2014). Anti-influenza virus activity of essential oils and vapors. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(1), 47-53.
- Vosoughi, N., Gomarian, M., Pirbalouti, A. G., Khaghani, S., & Malekpoor, F. (2018). Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Industrial Crops and Products*, 117, 366-374.
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. V. (2018). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 118-127.
- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., Ji, P. (2019). Chemical composition and antioxidant properties of essential

oils from peppermint, native spearmint and scotch spearmint. *Molecules*, 24(15), 2825.

Zhao, Y., Chen, R., Wang, Y., Qing, C., Wang, W., & Yang, Y. (2017). *In vitro* and *in vivo* efficacy studies of *Lavender angustifolia* essential oil and its active constituents on the proliferation of human prostate cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 16(2), 215-226.

Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., & Wu, N. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15(5), 3200-3210.

Capítulo 5

Síntesis Verde de Nanopartículas

Cristina Garcidueñas Piña

*Departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Roberto Carlos Valerio García

Mariana Georgina Muñoz Carrillo

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Los nanomateriales (NMs) son estructuras que miden entre 1 y 100 nm en una, dos o sus tres dimensiones, conocidos estos últimos como nanopartículas (NPs). Las NPs metálicas en especial las de oro (Au), hierro (Fe), platino (Pt), cobre (Cu) y plata (Ag) tienen aplicaciones en diferentes campos como en medicina, electrónica y agricultura. Las NPs de plata (AgNPs) se utilizan ampliamente como catalizadores y antimicrobianos. Estas pueden ser sintetizadas por métodos físicos, químicos y mediante síntesis verde. Con la síntesis verde se disminuye el uso de sustancias tóxicas, ya que se realiza con ayuda de un agente biológico. Pueden obtenerse AgNPs a partir de una sal u óxido metálico mediante la reducción con extractos de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Con este proceso se obtienen

AgNPs recubiertas de compuestos provenientes del extracto biológico que les da estabilidad, sin que se generen demasiados compuestos tóxicos. Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs determinan su capacidad de reacción y su actividad biológica, por lo que es necesario caracterizarlas. Las técnicas que comúnmente se emplean en su caracterización son microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X, espectroscopía UV-visible, dispersión de luz dinámica y electroforesis láser Doppler, que aportan información acerca del tamaño, forma, composición y carga eléctrica. Las AgNPs presentan actividad antimicrobiana debido a la acción de las propias NPs, por los iones Ag^+ liberados y por las especies reactivas de oxígeno generadas. En el laboratorio de Biología molecular de plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se sintetizaron AgNPs utilizando extracto acuoso de hojas de *Raphanus sativus* (rábano), capaces de eliminar un 99.99 % de la bacteria *E. coli* en 15 min.

Introducción

Los nanomateriales (NMs) son estructuras que miden entre 1 y 100 nm en una, dos o sus tres dimensiones, conocidas como nanohojas, nanofibras, y nanopartículas (NPs), respectivamente. Existen NMs compuestos de: metales cero-valentes, óxidos metálicos, carbono, lípidos, o combinaciones de estos componentes (nanocompuestos). Las propiedades fisicoquímicas de los NMs, como temperatura de fusión, absorción óptica y reactividad química son muy diferentes a las de los materiales de mayor tamaño con la misma composición. Los NMs son generados de forma natural en diversos procesos como en erupciones volcánicas, incendios forestales, explosiones estelares y en el metabolismo bacteriano. Sin embargo, también pueden ser producidos de manera artificial, y se ha desarrollado una ciencia que permite diseñar y producir estas estructuras, la nanotecnología. Esto ha permitido manipular su síntesis para obtener NMs con características específicas, que en la actualidad cuentan con una gran cantidad de aplicaciones.

Las NPs metálicas, en especial las de oro, hierro, platino, cobre, plata se han destacado por tener aplicaciones en diferentes áreas como la medicina, óptica, electrónica y agricultura. Las NPs de plata (AgNPs), por su estabilidad química, sus propiedades físicas, su conductividad y sus propiedades biológi-

cas, se están utilizando ampliamente como catalizadores y antimicrobianos. Actualmente se comercializan alrededor de 300 productos basados en AgNPs aprobados por la FDA de Estados Unidos, entre los que está ropa, dispositivos anticonceptivos, tubos endotraqueales y prótesis óseas. Las AgNPs tienen características ideales para que las prótesis ortopédicas y cardiovasculares estén libres de microorganismos que pudieran infectar al paciente, para los apósitos para proteger y cubrir heridas, para el recubrimiento de instrumental quirúrgico y de prótesis de tipo óseo, y para facilitar la dosificación farmacológica. También, están siendo evaluadas para inhibir la proliferación de células cancerosas, como las células MCF7 de cáncer de mama. Las AgNPs también se están utilizando en la industria textil por su acción antibacteriana, para evitar malos olores, en la fabricación de prendas deportivas y calcetines. Además, las AgNPs tienen aplicaciones en la industria alimentaria como conservadores, intensificadores de sabor o para mejorar la apariencia de los alimentos.

Síntesis de nanopartículas

Se han desarrollado diversos métodos físicos, químicos y de síntesis verde de NPs metálicas, que han permitido controlar su morfología, dimensiones, composición, estabilidad en suspensión coloidal, recubrimiento, además de su comportamiento y de sus aplicaciones.

Los métodos físicos se basan en la subdivisión mecánica del metal. A partir del material macroscópico, mediante procesos físicos como la molienda o volatilización, se reduce la agregación hasta llegar a conseguir un material nanométrico (Fig. 5.1).

Con los métodos químicos se parte de moléculas de diferentes compuestos químicos que van a generar estructuras en una escala nanométrica (Fig. 5.1). La síntesis de las NPs puede llevarse a cabo por la reducción química de una sal u óxidos metálicos, lo que genera la liberación de iones de plata que sufren un proceso de nucleación para formar las NPs. La síntesis por métodos químicos ha sido ampliamente desarrollada, sin embargo, tienen el inconveniente de que utiliza agentes químicos, como solventes y surfactantes, que afectan al medio ambiente y que pueden contribuir a la toxicidad de las NPs.

La síntesis verde es un proceso que se caracteriza principalmente en que utiliza agentes biológicos, sustituyendo compuestos usados en la síntesis química.

mica, que resultan dañinos al medio ambiente. La síntesis verde puede llevarse a cabo aprovechando el metabolismo de la planta; al desarrollarse en medio con metales, mediante un proceso de biosíntesis, genera las nanopartículas metálicas. Otro sistema de síntesis verde es a partir de una sal u óxido metálico y de un agente reductor proveniente de extractos de cáscara, tallo y hojas de plantas, bacterias, algas, hongos, levaduras y virus (Fig. 5.1). En este acaso, al igual que con los métodos químicos, se parte de átomos o moléculas para obtener estructuras nanométricas, la diferencia es que se sustituyen algunos agentes químicos por biológicos, que en general son menos tóxicos. Las NPs obtenidas mediante síntesis verde son estables, ya que se forman recubiertas de compuestos provenientes del agente biológico que evitan aglomeraciones.

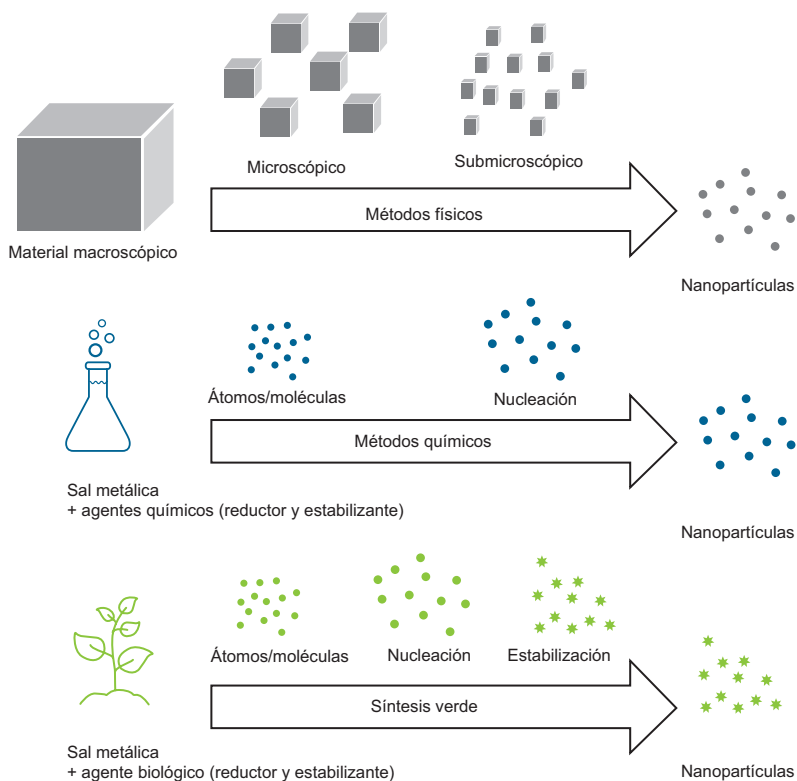


Figura 5.1. Métodos físicos, químicos y de síntesis verde para la obtención de nanopartículas.

Existen una gran cantidad de trabajos que reportan la síntesis verde de AgNPs utilizando nitrato de plata (AgNO_3) y extractos de plantas (Tabla 5.1). Tanto la concentración del AgNO_3 como la especie de planta influyen en el tamaño, solubilidad, carga superficial, forma y aglomeración de las AgNPs sintetizadas. Estas características, están relacionadas con sus propiedades biológicas, por ejemplo, entre menor sea tamaño de las NPs, es mayor la superficie de contacto con el entorno, lo que facilita su actividad biológica.

Tabla 5.1. Síntesis verde de AgNPs a partir de diferentes plantas

Material vegetal	<i>Ficus benghalensis</i>	Algarroba	Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	Ajo (<i>Allium sativa</i>)
Tipo de extracto	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso	Extracto acuoso de las hojas	Extracto acuoso de cladidos	Extracto acuoso
Características de la síntesis	5 ml de extracto, 45 ml 10^{-3} M de AgNO_3 a 60 °C	5 ml extracto, 100 ml 1-4 mM AgNO_3 TA ³	Relación 9 :1 (4mM de AgNO_3 y extracto) a TA ³	10 ml del extracto, 90 ml de AgNO_3 1 mM a TA ³ , 40, 60, 80 °C	60 ml de H ₂ O, 4 ml de hidróxido de amonio 4 %, 8 ml de AgNO_3 10 mM, 8 ml de suspensión de extracto de nopal (0.2 g/ 8 ml)	50 ml de AgNO_3 (8.5, 10,12,17,20,24 y 85 mg), 5 ml de EAH ¹ o EAC ² , NaCl
Características de las AgNPs	Esféricas con un diámetro aproximado de 16 nm	Esféricas con un diámetro de 5-40 nm	No se reporta	Esféricas con un diámetro de 5-50 nm	Esféricas con un diámetro de 10 nm	Esféricas de aprox. 20 nm
Actividad	Actividad contra <i>E. coli</i>	Alta actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i>	Actividad antimicrobiana contra la bacteria fitopatogena <i>Phaseoli</i> pv phaseoli	Generan apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7)	No se reporta	No se reporta
Referencias	Saxena <i>et al.</i> , 2012	Awwad <i>et al.</i> , 2013	Travieso <i>et al.</i> , 2018	Venugopal <i>et al.</i> , 2017	Ledezma <i>et al.</i> , 2014	Calle y Londoño, 2014

¹EAH: extracto de ajo hervido, ²EAC: extracto de ajo cocido, ³TA: temperatura ambiente

Caracterización de las nanopartículas

Las propiedades fisicoquímicas de las NPs tales como forma, tamaño, composición química, carga superficial y estado de agregación, están directamente relacionadas con su capacidad de reacción. Para conocer estas propiedades, es necesario que las NPs sintetizadas sean caracterizadas mediante técnicas microscópicas y espectroscópicas. A continuación, se da una breve descripción de las técnicas más empleadas.

Microscopía electrónica de barrido. La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una de las técnicas que permite obtener información del tamaño y forma de las NPs. Su funcionamiento se basa en realizar un barrido con un haz de electrones sobre la muestra, posteriormente las señales generadas por la interacción del haz con la superficie de la muestra son recogidas con diferentes detectores. De tal forma que a medida que el haz de electrones realiza el barrido, se va presentando la imagen de la muestra en un monitor. Esta técnica posee una gran profundidad de campo y produce imágenes de alta resolución.

Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X. La técnica de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDRX) utiliza la radiación electromagnética característica que proviene de una muestra para identificar y cuantificar los porcentajes atómicos de los elementos presentes en ella. Consiste en bombardear el objeto con electrones primarios, que por sí mismos tienen la energía apropiada para la emisión de rayos X de la muestra bajo análisis. La espectroscopía se realiza habitualmente acoplada a un microscopio electrónico.

Espectroscopía ultravioleta visible. La espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) es una técnica muy útil y confiable para la caracterización primaria de las NPs. Las propiedades ópticas únicas de las NPs las hacen interactuar fuertemente con longitudes de ondas específicas de luz, por lo que la técnica de espectroscopía de luz UV-vis es muy sensible y selectiva para diferentes tipos de NPs. En las AgNPs, la banda de conducción y la banda de valencia se encuentran muy cercanas, por lo que los electrones se mueven libremente de una a otra. Estos electrones libres dan lugar a una banda de absorción de resonancia de plasmón superficial, que se produce debido a la oscilación colectiva de electrones de AgNPs en resonancia con la onda de luz. La absorción de las AgNPs depende de su tamaño, del medio dieléctrico y del entorno químico. La

observación de este pico, designado plasmón de superficie está bien documentada para varias NPs metálicas con tamaños que varían de 2 a 100 nm.

Dispersión de luz dinámica. Otra forma de conocer el tamaño de las partículas en suspensión es a través del diámetro hidrodinámico, el cual se mide con un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés). Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que esta capa influye en el movimiento de la partícula durante DLS, el diámetro medido de la partícula, que se conoce también como hidrodinámico, la mayoría de las veces es superior al diámetro que se mide con MEB.

Electroforesis láser Doppler. El potencial zeta es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión. Existe un potencial entre la superficie de la partícula y el líquido dispersante, que varía de acuerdo con la distancia desde la superficie de la partícula. En el plano de deslizamiento, este potencial se conoce como potencial zeta. El potencial zeta se mide utilizando una combinación de dos técnicas: electroforesis y velocimetría láser Doppler, denominada en algunos casos electroforesis láser Doppler. Este método mide la velocidad del movimiento de una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico sobre éste. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado se puede calcular el potencial zeta mediante la viscosidad y constante dieléctrica de la muestra.

Las nanopartículas como antimicrobianos

La plata ha sido utilizada por su actividad antimicrobiana desde hace mucho tiempo, aunque las AgNPs presentan una mayor actividad que la plata de mayores dimensiones debido a la relación área-volumen. Es bien conocida la actividad de estas NPs contra bacterias, hongos e incluso virus, aunque sigue en debate si la acción es producida por la AgNPs o por los iones liberados, las evidencias sugieren que el efecto es resultado de ambas acciones (Fig. 5.2).

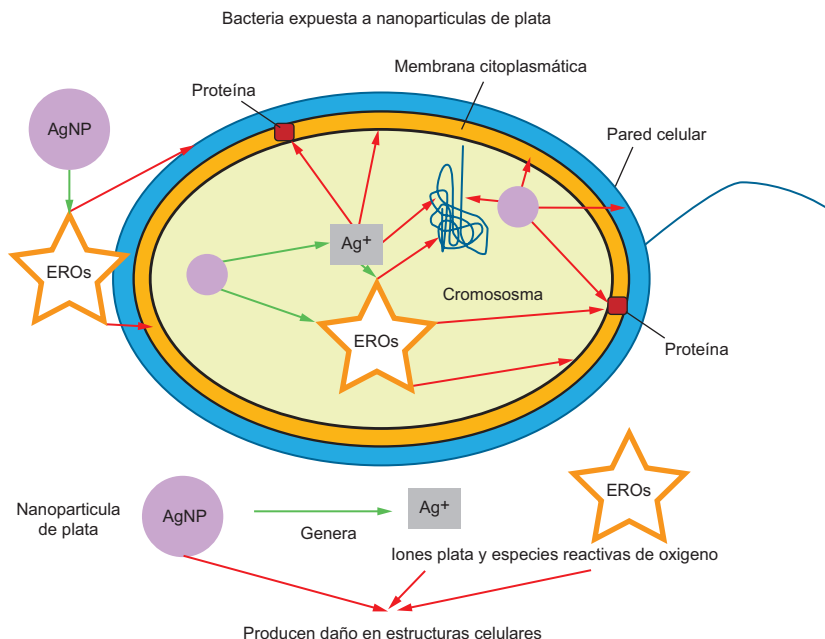


Figura 5.2. Mecanismos de acción de las AgNPs contra bacterias. Acción de las AgNPs, de los iones Ag⁺ y de las especies reactivas de oxígeno en la pared celular, la membrana citoplasmática, proteínas y cromosoma (Adaptado de Eckhardt *et al.*, 2013).

En *Escherichia coli* expuesta a AgNPs se ha logrado observar la formación de poros en la pared celular y su acumulación en la membrana celular, lo que modificaría la permeabilidad, permitiendo el movimiento de moléculas al interior de la célula y la pérdida de nutrientes, provocándole la muerte. Mediante microscopía electrónica ha sido posible observar la interacción de la plata con las células bacterianas, el cambio morfológico en la pared celular y el daño en la membrana citoplasmática, siendo más evidente en bacterias Gram negativas como *E. coli*, que en Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, posiblemente por las diferencias estructurales entre ambas. El ingreso de las AgNPs a la célula puede producir daño a nivel celular, subcelular y de biomoléculas. La actividad antimicrobiana de las AgNPs es proporcional a sus dimensiones, son más activas las más pequeñas porque tienen mejor capacidad de ingreso a la célula para interactuar con diversas biomoléculas.

Como es conocido, los metales al ser oxidados químicamente en solución acuosa liberan iones metálicos, y de igual manera las AgNPs también son el origen de iones Ag^+ . Las AgNPs de menores dimensiones liberan una mayor cantidad de iones en condiciones aeróbicas. Los iones Ag^+ pueden interactuar con los iones negativos de azufre, fósforo o nitrógeno, constituyentes de componentes celulares, afectando la funcionalidad de la pared celular bacteriana, interfiriendo con la cadena respiratoria bacteriana o afectando la capacidad de replicación del ADN. Mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión se ha detectado la interacción de iones Ag^+ con el ADN de bacterias, también se ha identificado que estos iones tienen preferencia por las bases guanina y adenina, y mediante resonancia magnética nuclear se ha apreciado la distorsión de la doble hélice, lo que puede ocasionar una pérdida en la capacidad de replicación. Los iones Ag^+ tienen afinidad por la cisteína de las proteínas, y son capaces de desplazar iones esenciales en el funcionamiento de las enzimas, como al ion de cobre (Cu^+), inactivándolas. Esto fue observado con la enzima nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa de *E. coli*, que participa en la cadena respiratoria bacteriana, y cuya interacción con Ag^+ provocó la muerte celular.

Además, las AgNPs pueden interactuar con las enzimas que participan en la cadena respiratoria generando especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo o superóxido que producen estrés oxidativo, oxidación de lípidos, daño a proteínas, inhibición de la producción de ATP y de la replicación del ADN. Por su parte, los iones Ag^+ también participan en la generación de EROs. El estrés oxidativo en las células es mayor en condiciones aeróbicas que en anaeróbicas debido a la cantidad de radical superóxido que se genera, que es el que presenta una mayor actividad antimicrobiana.

Lo que es un hecho, es que a diferencia de los antibióticos que actúan de manera específica en algún receptor, los iones Ag^+ y las AgNPs afectan a la bacteria en diversos aspectos de su metabolismo y de su estructura al mismo tiempo y de manera inespecífica. El uso de plata como antimicrobiano fue abandonado con el descubrimiento de los antibióticos, pero con la aparición de bacterias resistentes, las AgNPs son una alternativa real en el tratamiento de infecciones, porque es más difícil que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia contra éstas. Sin embargo, se han encontrado bacterias capaces

de sobrevivir a concentraciones elevadas de plata, por adquisición de plásmidos de resistencia, aunque no se ha esclarecido los mecanismos.

Muchas de las AgNPs sintetizadas por estos procedimientos han sido evaluadas por su capacidad antimicrobiana. La mayoría de los reportes involucran bacterias patógenas de interés clínico como *E. coli*, que puede provocar trastornos gastrointestinales; *S. aureus*, que puede ocasionar infecciones en la piel, huesos, neumonía y endocarditis; *Streptococcus pneumoniae*, relacionada con neumonía, sinusitis y peritonitis; *Salmonella typhi*, asociada a la fiebre tifoidea; *Vibrio cholerae*, que provoca cólera. Además de otras como *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno oportunista en humanos, y *Bacillus subtilis* utilizado como organismo modelo en diversos estudios.

Los protocolos empleados en este análisis son mediante difusión o dilución. El técnica de difusión a partir de discos es muy recurrente en el análisis antimicrobiano. En este procedimiento se colocan discos de papel filtro impregnado de las AgNPs en la superficie de medio sólido en caja Petri previamente inoculado con la bacteria. Se espera que las AgNPs difundan radialmente a partir del disco, y que el crecimiento de la bacteria se vea inhibido alrededor del disco. Dependiendo del diámetro de los halos de inhibición, se puede conocer la actividad de las AgNPs contra esa bacteria y la resistencia o sensibilidad de las bacterias. Esta técnica permite la evaluación de diferentes concentraciones de AgNPs de una manera fácil, económica y rápida. Por ejemplo, las AgNPs sintetizadas a partir de extractos de semillas de fenogreco, una leguminosa de la India, utilizando dos variantes del proceso, agitación o sonicación fueron analizadas mediante el protocolo de difusión en agar. En ese experimento se demostró una mayor actividad de AgNPs sintetizadas por sonicación contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus* que las sintetizadas por agitación.

En otro tipo de análisis antimicrobiano, se calcula la inactivación de los microorganismos producida por las NPs. El procedimiento consiste en adicionar las AgNPs a una suspensión microbiana de concentración conocida, generalmente entre 10^4 y 10^7 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Después de un tiempo de exposición las bacterias se inoculan en medio sólido, y mediante conteo de colonias, se calculan las UFC/ml sobrevivientes al tratamiento. La inactivación se expresa como $\log(N_0/N)$, o unidades logarítmicas, donde N y N_0 son las UFC/ml de la bacteria sobrevivientes e iniciales, respectivamente. Esta técnica permite la obtención de resultados muy

precisos que suelen ser más aceptables, y ha sido utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de diversas NPs.

Protocolos

Síntesis verde de AgNPs utilizando extracto acuoso de hojas de plantas

1. Licuar 50 g de hojas limpias con 250 ml de agua destilada estéril. Por ejemplo, pueden usarse hojas de rábano que, tomando las iniciales de su nombre científico, *Raphanus sativus*, las NPs sintetizadas se han denominado *RsAgNPs*.
2. Calentar en baño María durante 1 h, dejar enfriar a TA de 2 a 12 h.
3. Eliminar los residuos sólidos por sedimentación, centrifugación y filtración con papel cualitativo Whatman # 1.
4. Mezclar 10 ml del extracto filtrado con 90 ml de una solución de 2 mM AgNO_3 .
5. Incubar a TA protegido de la luz con agitación constante hasta observar cambio de coloración indicativo de la síntesis de AgNPs. En el caso de las *RsAgNPs* torna de amarillo a rojizo marrón (Fig. 5.3).

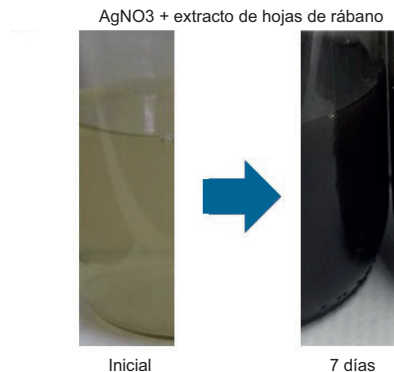


Figura 5.3. Reacción de síntesis de AgNPs a partir de AgNO_3 y extracto acuoso de hojas de rábano. Cambio de coloración característico de la formación de AgNPs.

- Tomar una alícuota de la mezcla de reacción y leer en el espectrofotómetro UV-vis haciendo un barrido de absorbancias de 300 a 800 nm. Comprobar la formación de AgNPs con el plasmón característico y el pico máximo de absorción en el rango entre 400 y 450 nm. En el caso de las RsAgNPs la máxima absorbancia resulta a los 425 nm (Fig. 5.4).

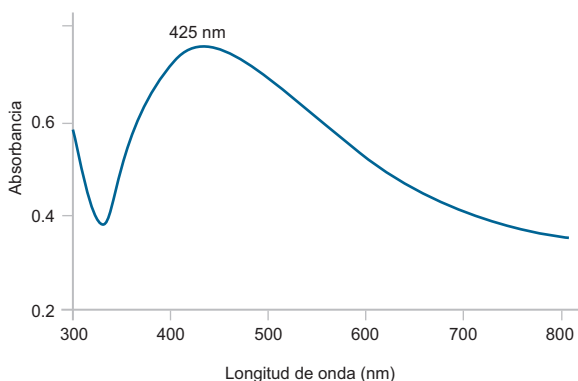


Figura 5.4. Plasmón característico de la formación de AgNPs. Espectro de absorbancia UV-vis de las AgNPs sintetizadas con extracto de hojas de rábano, con un pico de máxima absorbancia a 425 nm.

- Centrifugar la suspensión, eliminar el sobrenadante por decantación.
- Lavar el precipitado tres veces con agua destilada estéril y una vez con etanol al 96 % para eliminar cualquier residuo de la reacción.
- Secar las RsAgNPs a 37 °C por 24 h, dispersar por sonicación.

Caracterización de las AgNPs producidas:

- Análisis por MEB para observar la forma. Las fotografías de MEB pueden ser empleadas en la determinación del tamaño con ayuda del programa Image J2. El análisis por MEB de las RsAgNPs mostró que son esféricas y tienen un tamaño promedio de 82 nm (Fig. 5.5).
Estudio de EDRX para determinar la composición de elementos. Las AgNPs sintetizadas con extractos vegetales no sólo están constituidas por plata, sino que además están conformadas por componentes provenientes del extracto vegetal. El análisis de EDRX de las RsAgNPs mostró que

están conformadas principalmente por Ag (54.1 %), además de otros elementos que provienen del extracto vegetal, entre los que destacan carbono (16.35 %), cloro (14.13 %) y oxígeno (5.97 %) (Fig. 5.6).

2. Análisis mediante DLS para determinar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas. El valor del diámetro calculado mediante esta técnica generalmente es mayor que el determinado por microscopía electrónica, ya que se realiza en un medio líquido donde se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Por ejemplo, en las *RsAgNPs* se calculó un diámetro hidrodinámico de 118.8 nm en agua destilada, valor mayor que el calculado por MEB, de 80.32 nm (Fig. 5.5).
3. Estudio de electroforesis láser Doppler para determinar el potencial zeta, que indica la carga eléctrica de las *AgNPs*, la magnitud de la repulsión o atracción electrostática que existe entre estas, y su estabilidad. Por ejemplo, en las *RsAgNPs* se encontró un potencial zeta de -32.3 mV, donde el valor negativo indica una carga eléctrica superficial estable. Esta estabilidad es proporcionada por la materia orgánica proveniente del extracto vegetal y que recubre a las *AgNPs*.

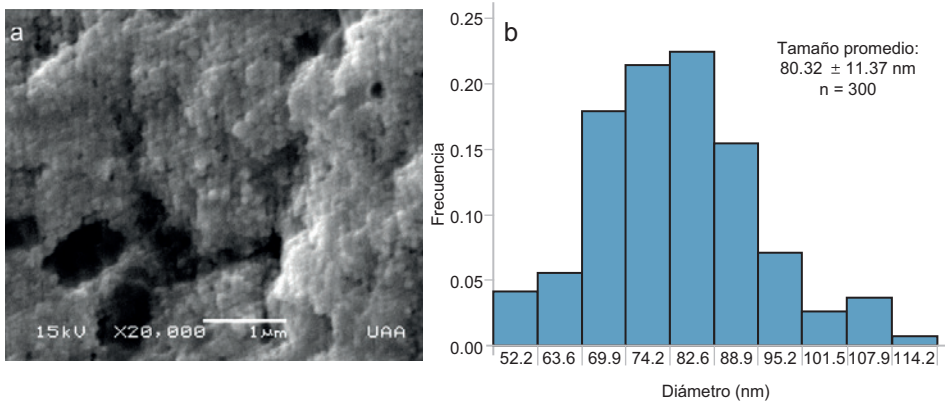


Figura 5.5. Nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de hojas de rábano. (a) Mediante microscopía electrónica de barrido se observan las *AgNPs* de forma esférica. (b) El histograma muestra la distribución de tamaño de la *AgNPs* medidas con ayuda del programa Image J2, con el que se calculó un diámetro promedio de 80.32 ± 11.37 nm.

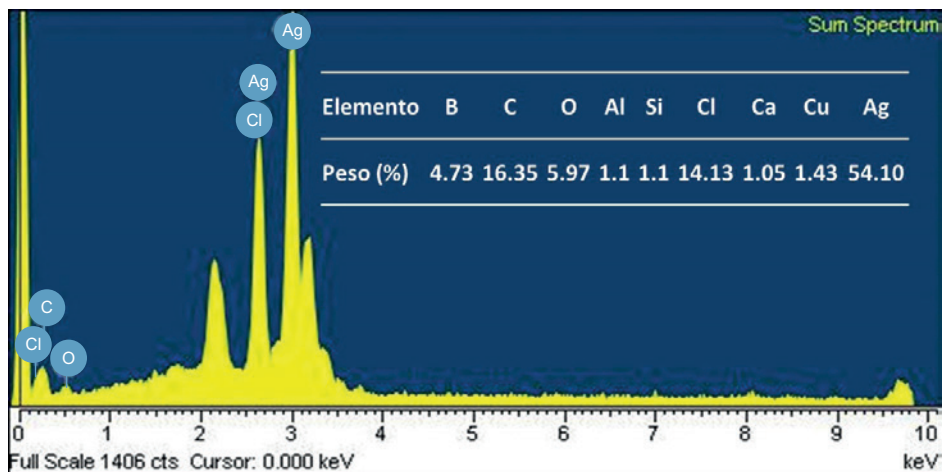


Figura 5.6. Análisis EDRX de AgNPs sintetizadas con extracto de hojas de rábano. Las RsAg-NPs están conformadas principalmente por plata, además de otros elementos que provienen del extracto vegetal, entre los que destacan carbono (C), cloro (Cl) y oxígeno (O).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de AgNPs

1. Cultivar en medio de cultivo líquido una colonia aislada de *E. coli* a 37 °C durante toda la noche.
2. Hacer diluciones seriadas del cultivo en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7 estéril.
3. Sembrar cada una de las diluciones en medio sólido. Incubar durante toda la noche.
4. Contabilizar las colonias desarrolladas para calcular las UFC/ml.
5. Preparar una suspensión bacteriana con 1×10^6 UFC/ml en buffer de fosfatos en dos tubos con 1 ml cada uno.
6. Adicionar a un tubo, la suspensión AgNPs a una concentración de 0.1 mg/ml. El otro será el control negativo por lo que no se le adiciona nada.
7. Incubar a TA e inocular una alícuota de cada suspensión en medio sólido después de 15, 30 y 60 min de exposición.
8. Incubar a 37 °C por toda la noche.
9. Contar colonias y calcular las UFC/ml después de la exposición.

10. Calcular la inactivación logarítmica expresada en unidades logarítmica (U log) con la fórmula:

$$U \log = \log (N_0/N)$$

Donde N_0 y N son las UFC/ml de la bacteria iniciales y sobrevivientes, respectivamente.

En la valoración de la actividad antimicrobiana de *RsAgNPs* se observó una inactivación logarítmica de 4.3, 4.8 y 5.9 U log a los tiempos de 15, 30 y 60 min, respectivamente (Fig. 5.7). Estos datos demuestran que las *RsAgNPs*, pueden eliminar las bacterias de *E. coli* en un 99.99 % en 15 min, en un 99.999 % en 30 min y en un 99.9999% en 60 min.

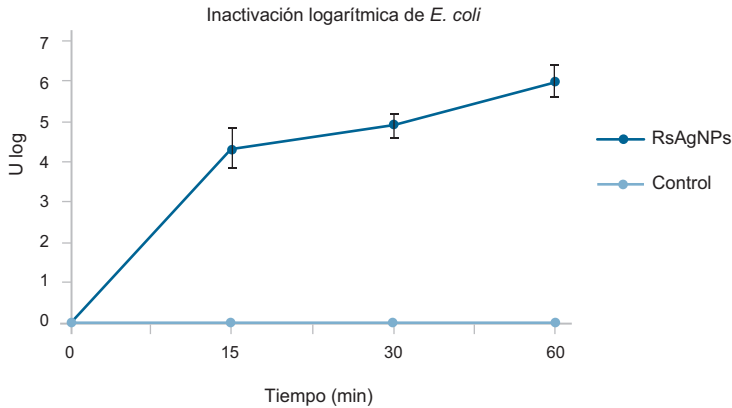


Figura 5.7. Actividad antibacteriana de las *RsAgNPs*. Cultivos bacterianos de *E. coli* fueron expuestos a 0.1 mg/ml de *AgNPs* sintetizadas con extracto de hojas de rábano durante 15, 30 y 60 min. Para determinar la inactivación logarítmica se contabilizó el número de unidades formadoras al inicio y después del tratamiento.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico, material genético y hereditario.

Ag^+ : iones de plata

$AgNO_3$: nitrato de plata

AgNPs: nanopartículas de plata

ATP: adenosín trifosfato o trifosfato de adenosina, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.

Cu⁺: iones de cobre

DLS: dispersión de luz dinámica

EDRX: espectroscopía de dispersión de energía de rayos X

EROs: especies reactivas de oxígeno

FDA: Siglas en inglés de *Food and Drug Administration*, que significa Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

g: gramos

h: hora

Log: logaritmo base 10

M: molar

MEB: microscopía electrónica de barrido

mg/l: miligramos por litro

ml: mililitros

mM: milimolar

nm: nanómetros

NMs: nanomateriales

NPs: nanopartículas

RsAgNPs: nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de hojas de rábano (*Raphanus sativus*).

TA: temperatura ambiente

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro

U log: unidades logarítmicas

UV-vis: ultravioleta-visible

Glosario

Antimicrobiano. Sustancia química que tiene actividad contra microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su proliferación.

Antibacteriano. Sustancia que tiene actividad contra bacterias, matando o inhibiendo su proliferación.

Catalizador. Sustancia que aumentar la velocidad de una reacción sin ser consumida en el proceso.

Células MCF7. Línea celular aislada de un paciente con cáncer de mama, que es utilizada en investigación científica de esta enfermedad.

Escherichia coli (*E. coli*). Bacteria gramnegativa que coloniza el tracto gastrointestinal haciendo simbiosis con el organismo. Existen algunas cepas de esta bacteria que son patógenas y otras que son utilizadas en protocolos de investigación.

Fúngico. Relacionado con hongos.

Nucleación. Formación de cuerpos sólidos muy pequeños dentro de una fase líquida.

Inactivación logarítmica. Representación matemática de la capacidad de acción de una sustancia contra un microorganismo.

Bibliografía

- Abiola Grace Femi-Adepoju, Adewumi Oluwasogo Dadab, Kabir Opeyemi Otunc, Adeyinka Olufemi Adepojud & Ojo Paul Fatobae. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia Pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies. *Heliyon* 5 (2019) e01543. <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019. e01543>
- Awwad, A. M., Salem, N. M. & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1186/2228-5547-4-29>.
- Chellaram, C., Murugaboopathi, G., John, A. A., Sivakumar, R., Ganesan, S., Krithika, S. & Priya, G. (2014). Significance of nanotechnology in food industry. *APCBEE procedia*, 8, 109-113. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.010>.
- Deshmukh, A. R., Gupta, A. & Kim, B. S. (2019). Ultrasound Assisted Green Synthesis of Silver and Iron Oxide Nanoparticles Using Fenugreek Seed Extract and Their Enhanced Antibacterial and Antioxidant Activities. *Hindawi BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2019/1714358>.
- Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B. & Fromm, K.M. (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and

- its uses in medicine. *Chem Rev*, 113(7), 4708-54. <http://doi.org/10.1021/cr300288v>.
- El Badawy, A., Silva, R., Morris, B., Scheckel, K., Suidan, M. & Tolaymat, T. (2011). Surfacecharge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol*, 4, 283-287. <http://doi.org/10.1021/es1034188>.
- Erdogan, O., Abbak, M., Demirbolat, G.M., BirtekocakI, F., Aksell, M., Passal, S. & CevikI, O. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: The characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells. *PLoS ONE*, 14(6), e0216496. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0216496>.
- Garcidueñas-Piña, C., Medina-Ramírez, I.E., Guzmán, P., Rico-Martínez, R., Morales-Domínguez, J.F. & Rubio-Franchini, I. (2016). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Nanostructured Materials of Titanium Dioxide Doped with Silver and/or Copper and Their Effects on *Arabidopsis thaliana*. *Hindawi Publishing CorporationInternational Journal of Photoenergy*, 2016, 8060847. <http://doi.org/10.1155/2016/8060847>
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L. & Michael, J.R. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Springer Third edition XIX, 689.
- Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W., & Kim, J. H. (2015). Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 10, 4203. <http://doi.org/10.2147/IJN.S83953>. PMID: 26170659; PMCID: PMC4494182.
- Iravani, S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 10, 2638. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.
- Lee, K.X., Shameli, K., Mohamad, S.E., Yew, Y.P., Mohamed Isa, E.D., Yap, H.Y., Lim, W.L. & Teow, S.Y. (2019). Bio-Mediated Synthesis and Characterisation of Silver Nanocarrier, and Its Potent Anticancer Action. *Nanomaterials* (Basel), 9(10). <http://doi.org/10.3390/nano9101423>
- Liao, C., Li, Y. & Tjong, S.C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 449. <http://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
- Mariadoss, A.V.A., Ramachandran, V., Shalini, V., Agilan, B., Franklin, J.H., Sanjay, K., Alaa, Y.G., Tawfiq, M.A. & Ernest, D. (2019). Green synthesis,

- characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by *Malus domestica* and its cytotoxic effect on (MCF-7) cell line. *Microb Pathog*, 135,103609. <http://doi.org/10.1016/j.micpath>.
- Maurer-Jones, M.A., Lin, Y.S. & Haynes, C.L. (2010). Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano*, 4, 3363-3373. <http://doi.org/10.1021/nn9018834>.
- Mohanta, Y.K., Panda, S.K., Biswas, K., Tamang, A., Bandyopadhyay, J., De, D., *et al.* (2016). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from *Cassia fistul* (Linn.): *in vitro* assessment of their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. *IET Nanobiotechnol*, 10, 438-444. <http://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0104>.
- Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P.R., Kumari, M. & Nayak, B. (2016). Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Mater. Sci. Eng. C*, 58, 44-52. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.022>.
- Paladini, F., Pollini, M. (2019). Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends. *Materials* (Basel), 9, 12(16). <http://doi.org/10.3390/ma12162540>.
- Salari, S., Esmailzadeh Bahabadi, S., Samzadeh-Kermani, A. & Yosefzaei, F. (2019). *In vitro* Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Prosopis farcta* Fruit Extract. *Iran J Pharm Res*, 18(1), 430-455. PMID: 31089378; PMCID: PMC6487442.
- Saxena, A., Tripathi, R. M., Zafar, F. & Singh, P. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. *Materials letters*, 67(1), 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.09.038>.
- Siddiqi, K.S., Rashid, M., Rahman, A., Tajuddin, Husen, A. & Rehman, S. (2018). Biogenic fabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous-ethanolic extract of lichen (*Usnea longissima*) and their antimicrobial activity. *Biomater Res*, 21, 22:23. <http://doi.org/10.1186/s40824-018-0135-9>.
- Syafiuddin, A., Salmiati, Hidibarata, T., Hong Kueh, A. B. & Salim, M. R. (2018). Novel weed-extracted silver nanoparticles and their antibacterial appraisal against a rare bacterium from river sewage treatment plan. *Nanomaterials*, 8(9), 1-17. <http://doi.org/10.3390/nano8010009>.

- Taleb, A.; Petit, C. & Pileni, M.P. (1998). Optical properties of self-assembled 2D and 3D superlattices of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem*, 102, 2214–2220. <https://doi.org/10.1021/jp972807s>.
- Ullah Khan, S., Saleh, T.A., Wahab, A., Khan, M.H.U., Khan, D., Ullah Khan, W., Rahim, A., Kamal, S., Ullah Khan, F. & Fahad, S. (2018). Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine*, 13, 733-762. <http://doi.org/10.2147/IJN.S153167>.
- Venugopal, K., Rather, H.A., Rajagopal, K., Shanthi, M.P., Sheriff, K., Illiyas, M. & Maaza, M. (2017). Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, 282-289. <http://doi.org/10.1016/j.jphoto-biol.2016.12.013>.
- Zetasizer Manual. (2004). Nano Series User MAN0317 Issue 1.1
- Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W. & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 17, 1534. <http://doi.org/10.3390/ijms17091534>.

Capítulo 6

Filogenética de Plantas Basada en Secuenciación de Nueva Generación

Marcela Avendaño González
*Departamento de Biología del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La filogenética permite establecer las relaciones ancestro – descendiente que unen a los organismos. En las plantas, como en todos los organismos, este campo de la sistemática ha representado y sigue representando un trabajo continuo que resulta en hipótesis filogenéticas cambiantes y propositivas. En la actual era de la sistemática molecular, la comparación de secuencias de ADN o proteínas, se emplean para generar filogenias donde las diferencias entre las secuencias indican divergencia genética como resultado de una evolución molecular a través del tiempo. Más recientemente, la identificación de miles de genes nucleares en bajo número de copias ha comenzado a transformar las investigaciones de biología evolutiva y sistemática. En este capítulo se ejemplifica un estudio de genética de poblaciones

empleando secuenciación de nueva generación. La suficiente variación genética obtenida a partir de la secuenciación de los múltiples loci empleados permitió conocer un poco más sobre la historia evolutiva de la especie *Bouteloua gracilis*, mientras que los resultados obtenidos, demuestran el potencial y versatilidad que tiene este método de secuenciación en estudios de genética ecológica y evolutiva.

Antecedentes

El estudio de las plantas, así como de cualquier organismo vivo, implica siempre comenzar situándolo en un contexto filogenético. La filogenética permite establecer las relaciones ancestro – descendiente que unen a los organismos vivos o extintos, dichas relaciones existen entre poblaciones y especies. A partir de los estudios filogenéticos es que otras relaciones, como las ecológicas, toman mayor relevancia pues se logra un mayor y mejor entendimiento de los procesos evolutivos que las han moldeado.

La determinación de las relaciones filogenéticas de las plantas ha representado y sigue representando un trabajo continuo pues se han empleado diversos enfoques que resultan en hipótesis filogenéticas cambiantes y propositivas. Es así como, a pesar de la variedad de sistemas de clasificación, el mejor será aquel que refleje de manera exacta las relaciones ancestro - descendiente entre los organismos clasificados. Como resultado de lo anterior tenemos que ahora esté bien establecido, por ejemplo, que evolutivamente ocurrió una única transición de las plantas al ambiente terrestre (Embriofitas) desde un ancestro acuático (Charophytas). Entre especies, las relaciones filogenéticas se infieren a partir de caracteres particulares, preferentemente aquellos originados a partir de cambios evolutivos que son heredados (sinapomorfias) o novedades evolutivas (autapomorfias) que permiten evidenciar estas relaciones.

En la actual era de la sistemática molecular, las filogenias moleculares se generan al comparar secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) o proteínas, donde las diferencias entre las secuencias indican divergencia genética como resultado de una evolución molecular a través del tiempo. Los diferentes genes acumulan mutaciones a tasas de cambio diferentes por lo que no todos los genes o macromoléculas resultan ser marcadores moleculares aptos para brindar información filogenética. Tradicionalmente en la sistemática

molecular se han empleado, por su utilidad, marcadores de ADN ribosomal (rDNA) y de plástidos (cpDNA) para la reconstrucción de filogenias de plantas a nivel de género, pues en estos existen en un gran número de copias en el genoma de estos organismos. Los marcadores más frecuentemente empleados del rDNA han sido los espaciadores transcritos (ITS y ETS *siglas en inglés*) y la región codificante de la subunidad 26S del ARN. Entre los marcadores más empleados del cpDNA tenemos a los genes codificantes para las proteínas *rbcL* y *matk* y sus espaciadores no codificantes.

En las décadas pasadas, las miradas hacia la sistemática molecular destacaron la importancia de esta rama biológica, el desarrollo de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos ultrarrápida y la generación de grandes cantidades de datos en muy poco tiempo, sumado al desarrollo de herramientas matemáticas y estadísticas, han permitido explicar los procesos evolutivos más fácilmente. En años más recientes, la identificación de miles de genes nucleares en bajo número de copias ha comenzado a transformar las investigaciones de biología evolutiva y sistemática molecular.

Secuenciación masiva de datos

La Secuenciación de Nueva Generación (SNG o Next Generation Sequencing: NGS) permite la secuenciación paralela masiva de ADN, y es capaz de incrementar el volumen y velocidad de generación de datos, siendo una de sus mayores ventajas que es aplicable a cualquier organismo. La SNG se han aplicado exitosamente en filogenética y filogeografía, además ha permitido abordar preguntas sobre la diversidad del genoma, naturaleza y frecuencia de duplicación del genoma entre linajes de plantas. Las metodologías de SNG desarrolladas hasta ahora incluyen la secuenciación completa del genoma, secuenciación del transcriptoma, enriquecimiento dirigido (targeted enrichment ó *sequence capture*), secuenciación RAD (RAD-Seq), secuenciación por genotipificación (Genotyping-by-Sequencing: GBS), y escaneo del genoma con o sin enriquecimiento dirigido (Hyb-Seq).

En este capítulo nos enfocaremos en el método de *sitios de restricción asociados al ADN* que por sus siglas en inglés es conocido como RAD-seq (restriction site-associated DNA sequencing), usado especialmente para estudios de genómica ecológica, evolutiva y de conservación. La secuenciación RAD se

ha convertido en el método más empleado para descubrir polimorfismos de nucleótido simple (single nucleotide polymorphism: SNP) y para genotipificar cualquier organismo.

Método RAD-seq

Explicado de manera sencilla, en este método, el ADN genómico es digerido por una enzima de restricción, seguido de un corte mecánico para reducir la longitud de los fragmentos para su secuenciación. El resultado es un muestreo de un gran número de datos adyacentes a un gran número de sitios de restricción en todas las áreas del genoma (codificantes y no codificantes) que posteriormente son secuenciados en las plataformas de Illumina. El análisis de las secuencias requiere de *software* especiales que permiten generar los alineamientos empleando una secuencia de referencia o, si esta no está disponible, los fragmentos RAD pueden analizarse de *novo*. Las lecturas idénticas se agrupan como posibles alelos, al agrupar todas las secuencias que tienen pocas diferencias entre ellas, se pueden ubicar los SNP e indeles entre los alelos de un mismo locus y se corrigen los errores al comparar base con base en cada uno de los sitios. Los alelos homocigotos o heterocigotos reales serán aquellos que tengan altos números de lecturas y pocos errores.

El método RAD-seq ha adoptado múltiples metodologías que varían por ejemplo en el número de enzimas empleadas o la selección directa o indirecta del tamaño de los fragmentos, manteniendo aspectos básicos de la metodología original (Fig. 6.1). Hasta la fecha, este método de secuenciación de nueva generación ha sido el que mayor impacto ha tenido en filogenética y filogeografía por el control que tiene sobre los fragmentos resultantes de la digestión, además por la versatilidad que presenta para resolver problemas de investigación al identificar múltiples marcadores para propósitos de genotipificación poblacional a gran escala y a un bajo costo.

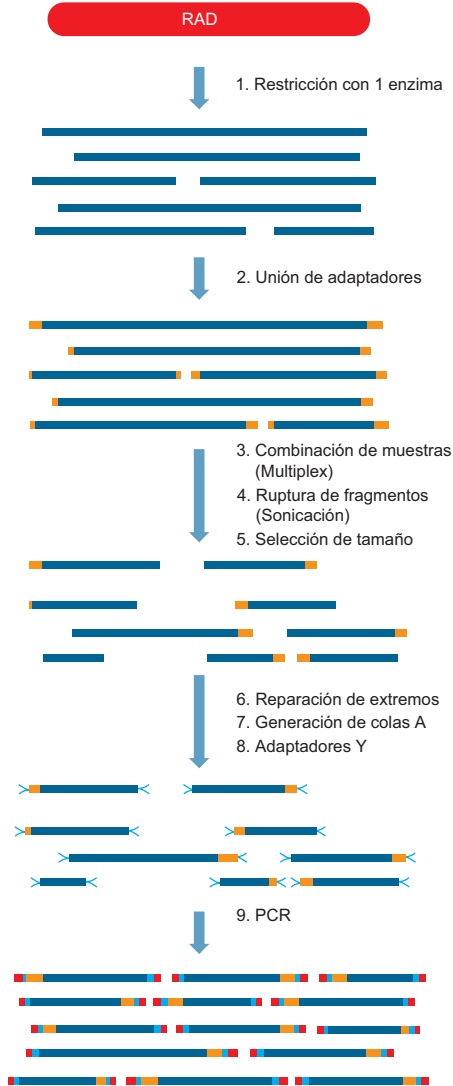


Figura 6.1. Ilustración paso a paso de la elaboración de la biblioteca genómica para secuenciación RAD (Elaborada a partir de Andrews *et al.* 2016).

Filogenética de poblaciones de *Bouteloua gracilis* (Chloridoideae: Poaceae)

En los pastizales de Norteamérica se distribuye el pasto navajita azul (*Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths), un pasto perenne nativo con metabolismo C4. Su distribución va desde el sur de Canadá, centro y oeste de Estados Unidos hasta México. *Bouteloua gracilis* ha sido muy estudiada debido a su amplia distribución, su importancia en el pastoreo histórico y su rol clave en la ecología de las comunidades de pastizales de Norteamérica. A lo largo de su distribución ha sido reportado como ecológica, morfológica y genéticamente variable. Lo anterior se relaciona a que se puede encontrar en climas áridos y semiáridos, es tolerante al frío y a la sequía, así como a los suelos alcalinos. A pesar de la gran variación reportada para la especie, solo un estudio se había enfocado en investigar la variación genética poblacional de la especie *B. gracilis*, reportando que, para cuatro poblaciones del centro de México, zona que representa la distribución sureña de la especie, la variación genética dentro las poblaciones era mayor que la interpoblacional. Sin embargo, a partir de los estudios filogenéticos previos, lo que se podía inferir sobre la variación genética de esta especie era muy poco dado que los estudios realizados emplearon marcadores (ITS, rpl32-trnL and rps16-trnK) que resultaron invariantes a nivel infraespecífico. Ante esta problemática, resultaba necesario abordar el estudio de la filogenética y la genética de poblaciones de *B. gracilis* a partir de datos generados con una metodología más potente de SNG como lo es la secuenciación RAD.

Muestreo y análisis de datos

A partir del muestreo de varios individuos de 42 poblaciones diferentes a lo largo del área de distribución de la especie se pudieron muestrear 33807 loci del genoma nuclear, que contenían 164045 SNP. A partir de estos datos, la inferencia filogenética generada con el método de Máxima Verosimilitud mostró una topología bien resuelta, en la que se observa que las muestras de México y EUA comparten ancestría (Fig. 6.2). El clado que incluye a todas las muestras de México (A, 99% BS) se divide en dos clados altamente soportados (A1& A2, 93% cada uno); el clado A2 contiene muestras del centro y norte de

México incluyendo a la población de Sonora como la población más tempranamente divergente. El clado hermano A1 incluye muestras de Chihuahua y Texas. En la otra rama, el clado de EUA (B, 100% BS) se separa en dos grupos que coinciden con su origen geográfico: la gran planicie (B1) y la región montañosa del oeste (B2, 100% BS).

La suficiente variación genética obtenida de los múltiples loci empleados permitió conocer un poco más sobre la historia evolutiva de la especie pues al observar dentro del clado de México (A) las relaciones revelan que las muestras del centro de México son las últimas en divergir (Actipan de Morelos, Puebla in A5) y se originan de ancestros que debieron estar en el Norte de México (clados A1, A3, A4 y el clado tempranamente divergente A5), indicando que el origen de las poblaciones mexicanas ancestrales fue en el desierto chihuahuense. De hecho, algunos autores han concluido que el centro de origen y diversificación de las especies del género *Bouteloua* Lag. ocurrió en las áreas abiertas del norte de México, además existe evidencia de que algunas especies incluyendo a *B. gracilis*, migraron hacia el norte desde México.

En este estudio, la secuenciación RAD permitió obtener datos suficientes para establecer: a) las frecuencias alélicas de cada individuo y agruparlos de acuerdo a las mismas (Fig. 6.3, *izquierda*), b) calcular un índice de flujo genético y el modelo de cómo éste está ocurriendo, c) los haplotipos y su diversidad así como su diversificación, permitiendo esto evidenciar el movimiento de dispersión de la especie (Fig. 6.3, *centro* y *derecha*), d) la diversidad alélica dentro de las poblaciones, dando indicios de que algunas poblaciones se encuentran aisladas, e) los modelos de expansión demográfica para determinar cuáles son las poblaciones que tienen un crecimiento estable y cuáles han sido las últimas en expandirse. Los resultados enlistados anteriormente demuestran el potencial y versatilidad que tiene este método de secuenciación en estudios de genética ecológica y evolutiva.

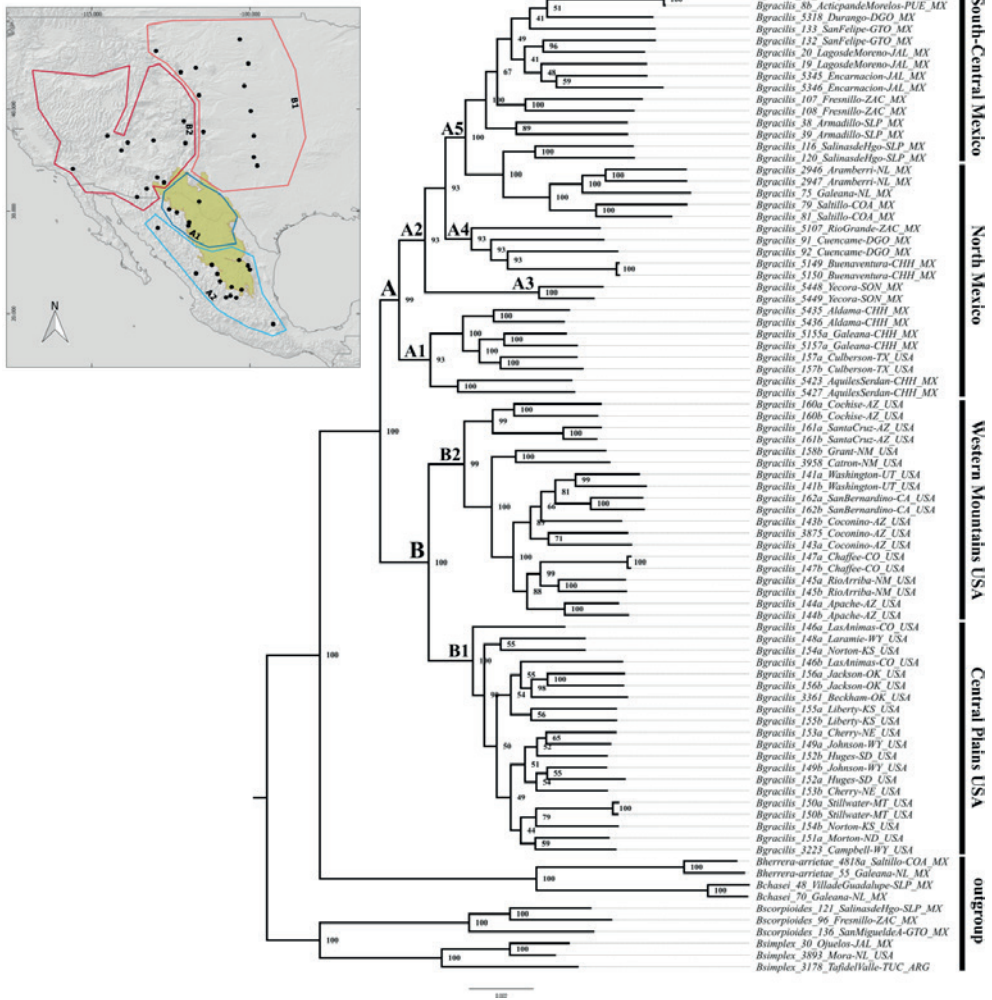


Figura 6.2. Inferencia filogenética molecular con el método de máxima verosimilitud empleando 33807 loci y 164045 SNPs de *B. gracilis*. Generado empleando IQTREE con 1000 réplicas de bootstrap ultrarrápido, los valores de soporte se muestran en los nodos; Log-likelihood: -7270163.539, longitud total del árbol: 0.296. Letras en los nodos indican el nombre asignado al clado, las etiquetas de la derecha señalan la ubicación geográfica de las muestras. Mapa de la ubicación geográfica de los clados A1 y A2 (México), B1 y B2 (EUA), Desierto chihuahuense en amarillo.

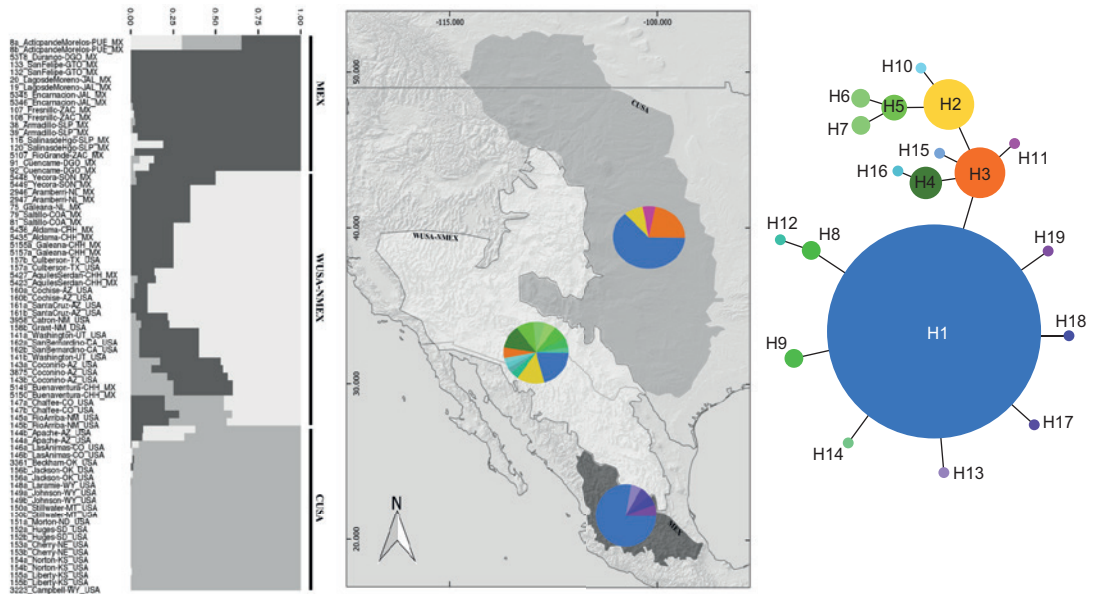


Figura 6.3. *Izquierda*: gráfico del análisis Bayesiano de agrupamiento con Structure, se muestra la probabilidad (barras) de cada muestra de ser asignada a uno de los tres grupos genéticos ($K=3$) de acuerdo con sus frecuencias alélicas. *Centro*: localización geográfica de los grupos: MEX- gris oscuro, CUSA- gris, WUSA-NMEX- gris claro. Los límites de los grupos se establecieron con base en las regiones ecoterrestres (L2 y L3); además se muestran los gráficos de pastel con la distribución de haplotipos para cada grupo genético, los colores corresponden a los observados en la red de haplotipos. *Derecha*: Red de haplotipos donde el tamaño del círculo corresponde a el número de muestras con el haplotipo.

Protocolo

Colecta en campo: se visitaron 42 localidades en donde se colectaron de uno a cinco individuos por población, de los cuales se obtuvieron muestras de hoja en fresco que se colocaron en bolsas con sílica gel para su deshidratación y conservación.

Extracción de ADN: se pesaron 0.3 g de tejido de hoja deshidratada. En un tubo de 1.5 ml el tejido se homogenizó empleando el Tissue Lyser II- QIAGEN con perlas de acero inoxidable. Se aplicó un ciclo (o dos) de disrupción

a 30/s por 2 a 3 min. Una vez homogeneizado el tejido, el ADN se extrajo siguiendo el protocolo CTAB 2X (Doyle, 1987). El ADN de cada muestra fue cuantificado usando el fluorómetro Qbit (kit dsDNA Assay) de Invitrogen y todas las muestras se ajustaron a la misma concentración molar (20 ng/ μ L).

Biblioteca genómica y secuenciación: la biblioteca genómica se preparó siguiendo el protocolo de Etter *et al.* (2011) empleando la enzima de alta fidelidad *SbfI* (New England Biolabs) para digerir 300 ng de ADN de cada muestra. Para este estudio se procesaron 94 muestras simultáneamente para las cuales los códigos de identificación de sus fragmentos fueron de 6 a 10 pb de longitud difiriendo por lo menos en dos bases. Después de restringir el ADN de cada muestra, se juntaron todas para formar la biblioteca genómica la cual se sometió a sonicación en un Covaris S220 para producir fragmentos de aproximadamente 400 pb, posteriormente se seleccionaron los fragmentos de entre 360 y 600 pb empleando cartuchos de agarosa al 1.5% (Pippin Prep; Sage Science, Beverly, MA). La amplificación final para el enriquecimiento de la biblioteca genómica se dividió en reacciones múltiples de 25 μ L, realizando 18 ciclos para cada amplificación. El tamaño, calidad y cantidad de la biblioteca genómica se evaluó con el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) empleando el DNA 1000 Kit. La secuenciación de la biblioteca se obtuvo mediante lecturas sencillas de 150 pb de longitud en una línea de la plataforma Illumina NextSeq500 (IIGB Genomic Core de la Universidad de California, Riverside).

Filtrado de calidad y recuperación de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP): las secuencias crudas se procesaron empleando el *software* ipyrad v.0.7.17 (Eaton, 2014). El alineamiento se realizó de *novo* (sin secuencia de referencia). A cada lectura de secuenciación se le cortaron 6 pb al inicio para eliminar el remanente del sitio de restricción de la enzima y se estableció que las lecturas quedaran a una longitud máxima de 145 pb. Los parámetros de alineamiento empleados fueron los de fábrica estableciendo un umbral de alineamiento de 90%. El alineamiento final se realizó solo con 74 muestras de poblaciones de *B. gracilis* y algunas muestras de las especies hermanas para formar el grupo externo (*B. chasei*, *B. herrera-arrietae*, *B. scorpioides* y *B. simplex*).

Inferencia filogenética: La inferencia de máxima verosimilitud (ML) se realizó en el programa IQTREE (Nguyen *et al.*, 2015) especially for maximum-likelihood (ML). Se realizaron 1000 réplicas de bootstrap ultrarápido. Para las inferencias se empleó el modelo de evolución molecular GTR+gamma empleado anteriormente en estudios con RAD-seq (Eaton *et al.*, 2017). Los

árboles resultantes se enraizaron y visualizaron con el programa FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Glosario

Filogenia: estudio de las relaciones evolutivas entre organismos empleando diagramas representativos parecidos a árboles.

Divergencia: referente a la evolución divergente en la cual dos poblaciones estrechamente relacionadas por exposición a presiones selectivas diferentes terminan por diferenciarse una de la otra.

Clado: grupo de organismos (linajes) que tienen un ancestro en común.

Grupo externo: taxón o grupo en un árbol filogenético conocido por haber divergido más tempranamente que el resto de los taxa en el árbol y se emplea para determinar la posición de la raíz del árbol.

Filogeografía: sub-rama de la biogeografía histórica que consiste en el análisis espacial de los linajes que se fundamenta en el estudio de los procesos geográficos históricos que podrían ser responsables de las distribuciones contemporáneas de individuos.

Genotipificación: determinar el genotipo

Restricción: cuando algunas enzimas reconocen una o varias secuencias donde cortan el ADN.

Polimórfico: que tiene o puede tener muchas formas, en el ADN los polimorfismos incluyen las diferencias en nucleótidos o en secuencias, al compararlos.

Indel: contracción de “inserción o delección”, en referencia a los dos tipos de mutaciones genéticas.

De novo: se refiere a la secuenciación de un genoma nuevo sin una secuencia de referencia disponible para su alineamiento.

Perenne: planta que vive más de dos años.

Haplotipo: conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos.

Bibliografía

- Aguado-Santacruz, G. A., Leyva-López, N. E., Pérez-Márquez, K. I., García-Moya, E., Arredondo-Moreno, J. T., & Martínez-Soriano, J. P. (2004). Genetic variability of *Bouteloua gracilis* populations differing in forage production at the southernmost part of the North American Gramineum. *Plant Ecology*, 170(2), 287-299.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.
- Avendaño-González, M., Morales-Domínguez, J. F., & Siqueiros-Delgado, M. E. (2019). Genetic structure, phylogeography, and migration routes of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. Ex Griffiths (Poaceae: Chloridoideae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 134, 50-60.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE*, 3(10), e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5-6), 416-423. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elq031>
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19, 11-15.
- Eaton, D. A. (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, btu121.
- Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, 99(2), 175-185. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200020>
- Gould, F. W. (1980). The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 348-416.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T., & Delwiche, C. F. (2001). The closest living relatives of land plants. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5550), 2351-2353. <https://doi.org/10.1126/science.1065156>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating

- Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1998). Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En *Molecular systematics of plants II* (pp. 1-42). Springer.
- Zimmer, E. A., & Wen, J. (2013). Reprint of: Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(2), 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.01.005>
- Zimmer, E. A., & Wen, J. (2015). Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects II. Next-gen approaches. *Journal of Systematics and Evolution*, 53(5), 371-379. <https://doi.org/10.1111/jse.12174>



Capítulo 7

Fitorremediación

Cristina Garcidueñas Piña

*Departamento de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La contaminación que perturba medios acuáticos, aéreos y terrestres ha ocasionado problemas de salud humana, trastornos en la vida de diversas especies y en la subsistencia de los ecosistemas. Los metales pesados son elementos que al ser expuestos a los seres vivos afectan diversos procesos biológicos y que, debido a actividades como la agricultura, la minería, la quema de combustible fósil, han incrementado su concentración en capas superficiales del suelo. Considerando esto, se han desarrollado estrategias que posibilitan la recuperación de espacios contaminados. Algunas plantas tienen la capacidad de absorber cantidades elevadas de metales acumulándolos, sus acciones tóxicas, eliminándolos del sitio en que se desarrollan. Esta propiedad es la que ha sido aprovechada para la

fitorremediación, técnica que ha sido utilizada con éxito en la eliminación de diferentes contaminantes, en especial de metales pesados. Diversas especies de plantas han sido evaluadas en su capacidad de fitorremediación, entre las que se cuentan las leguminosas. Las leguminosas forman asociaciones simbióticas con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, que no solo favorecen ciertos aspectos vitales de la planta, sino que también parecen contribuir en el proceso de fitorremediación.

Introducción

La contaminación de agua, aire y suelo ha ido en incremento con las actividades humanas y con el aumento desmedido de la población. Los contaminantes ambientales pueden entrar a la cadena trófica al ser absorbidos por las plantas, provocando efectos adversos en la salud humana que van desde moderados hasta mortales. Además, pueden provocar la pérdida de especies, de hábitats y de ecosistemas completos. Aunque el principal objetivo que debería considerarse sería buscar alternativas para evitar contaminar más, lo cierto es que existen una gran cantidad de zonas contaminadas que requieren atención urgente. La investigación de técnicas que permitan corregir estos sitios ha llevado a evaluar diferentes estrategias, entre las que se cuenta la fitorremediación. Muchos estudios han demostrado la eficacia de diferentes plantas para la eliminación de metales pesados y otros contaminantes de diversos sitios. En este capítulo exponemos las principales características de la fitorremediación, algunos estudios que han sido exitosos para eliminar metales pesados de suelo, cómo se pueden mejorar las cualidades de la planta para favorecer este proceso, y algunos resultados de nuestro trabajo realizado con mezquite.

Contaminación por metales pesados

Los metales pesados son elementos que por su peso molecular tienden estar en capas profundas de la corteza terrestre, pero que debido a procesos naturales y antropogénicos se pueden encontrar en la superficie, incluyendo áreas agrícolas. En la actualidad se pueden encontrar suelos con altas concentraciones de metales y metaloides, que han sido contaminados por el uso de fertilizantes, la

minería, la metalurgia, el uso de combustible fósil y las actividades militares. Los metales esenciales como el cobre (Cu), hierro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), manganeso (Mn) y zinc (Zn), son requeridos por los organismos en pequeñas cantidades para el desarrollo de los procesos biológicos, aunque a concentraciones elevadas resultan tóxicos, siendo capaces de inducir alteraciones a nivel de ADN, membrana celular, respiración, fotosíntesis y actividades enzimáticas. Por su parte, los metales no esenciales como cadmio (Cd), mercurio (Hg) o plomo (Pb), no poseen función biológica conocida, pero pueden ingresar a los organismos utilizando los mismos sistemas de transporte que los esenciales, y su presencia, aún en concentraciones muy bajas, causan efectos adversos. La contaminación de suelos con metales pesados representa un riesgo tanto a la salud humana como a la de los ecosistemas, microorganismos, animales y plantas.

Plantas y metales pesados

Las plantas cuentan con sistemas de transporte para absorber los metales esenciales del suelo, ya que la carencia de estos puede traer consecuencias negativas en su desarrollo. El Cu ingresa a las células de las plantas por canales iónicos especiales para Cu^{2+} , pero si en el suelo se encuentra como Cu^{1+} , la planta modifica sus canales para facilitar la captación de este metal. Esta estrategia asegura el suministro de este importante metal. La concentración del metal en el interior de la célula tiende a equilibrarse con la que hay en el suelo, por lo que en suelos altamente contaminados la planta absorbe grandes cantidades. Las plantas no cuentan con sistemas de transporte específicos para los metales no esenciales, sin embargo, estos utilizan los de los esenciales para llegar al interior de las células vegetales. Las plantas han desarrollado sistemas de control de ingreso, almacenaje y eliminación, para protegerse de los metales pesados y al mismo tiempo abastecerse de los metales esenciales. Las principales estrategias que utilizan las plantas para tolerar el exceso de metales pesados son: (1) la exclusión, limitando la asimilación de los metales, y (2) la acumulación de los metales en compartimientos donde no provoquen daño celular.

Además, las plantas responden a las condiciones estresantes que les aportan los metales pesados mediante una serie de cambios bioquímicos que les permiten eliminarlos o disminuir los efectos adversos. La presencia de metales

pesados induce la producción de hormonas como etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico; así como de compuestos quelantes tales como fitoquelatinas y metaloproteínas, que ayudan a la planta a tolerar el daño. Si las estrategias mencionadas son insuficientes, la célula aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que producen una inhibición de diversos procesos celulares por estrés oxidativo, con lo que se desencadenan en la célula varios mecanismos para contrarrestarlos como son la producción de compuestos como el glutatión, flavonoides, carotenoides y de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas.

Estrategias de remediación

La necesidad de corregir sitios contaminados con metales pesados ha llevado a desarrollar estrategias que incluyen técnicas fisicoquímicas y biológicas. Entre las fisicoquímicas están el lavado de suelos o aplicación de campo eléctrico, la excavación y el tratamiento térmico que, aunque son rápidos, también son costosos, contaminan agua, y el suelo y sus ecosistemas pueden quedar destruidos. La biorremediación es una técnica biológica que permite la eliminación de contaminantes de un sitio y que pueden ser llevada a cabo por microorganismos (bacterias y hongos) y sus enzimas, y por plantas (Fitorremediación).

Fitorremediación

La fitorremediación utiliza plantas y su rizósfera para remover los contaminantes, disminuir su biodisponibilidad o convertirlos a formas menos tóxicas, con la consecuente regeneración del sitio. Esta técnica hace uso de la capacidad que tienen algunas especies vegetales de crecer y desarrollarse en suelos contaminados, con ventajas técnicas y económicas en relación con los sistemas fisicoquímicos. Sin embargo, es una tecnología que ha presentado algunos inconvenientes como los siguientes: (1) se ve afectado por el clima y las condiciones estacionales, (2) requiere de largos periodos de tiempo, (3) funciona sólo para cierto tipo de contaminantes, (4) depende de la profundidad de las raíces y de la biodisponibilidad de los contaminantes, (5) los contaminantes pueden entrar a la cadena trófica, y (6) debe encontrarse un destino a la bio-

masa de la planta que queda contaminada. En este último punto, para plantas del género *Brassica* y *Helianthus tuberosus* L. empleadas en la fitorremediación se ha hallado una solución, la biomasa contaminada puede ser reutilizada para la producción de biodiésel.

La fitorremediación es llevada a cabo mediante diversas estrategias que en conjunto son responsables de la recuperación del suelo: fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y rizorremediación (Fig. 7.1).

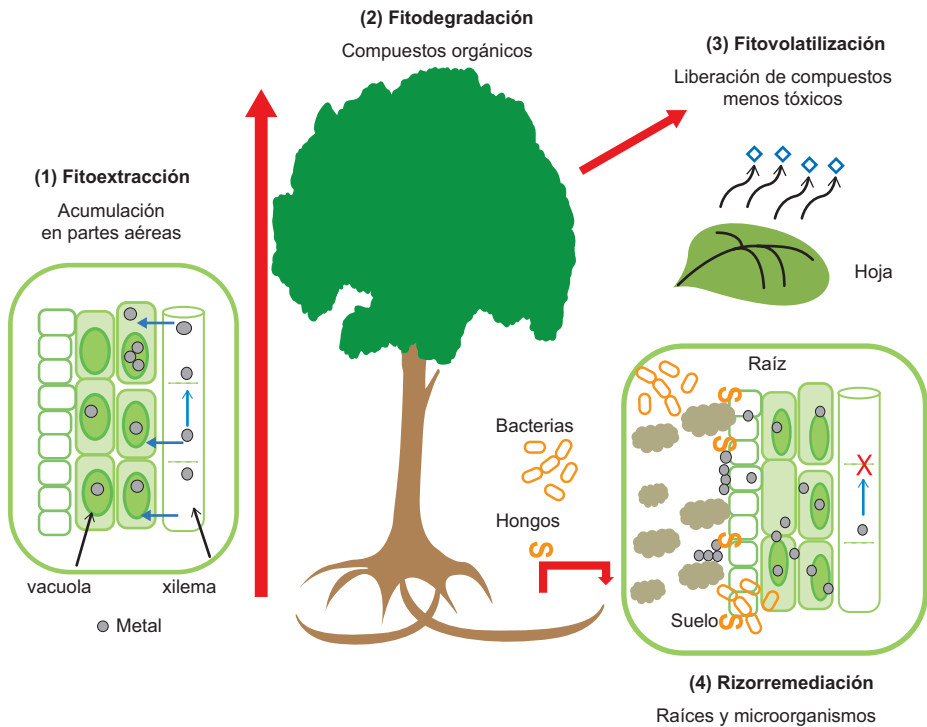


Figura 7.1. Estrategias de fitorremediación. (1) Fitoextracción: acumulación de metales en partes aéreas de la planta, traslocados a través del xilema y almacenados en vacuolas; (2) fitodegradación: biotransformación de compuestos orgánicos; (3) fitovolatilización: los compuestos volátiles salen de la planta a través de las hojas; y (4) rizorremediación: llevada a cabo en la rizósfera donde los microorganismos modulan el crecimiento de las plantas y facilitan la eliminación de contaminantes del suelo (Imagen modificada de DalCorso *et al.*, 2019).

Fitoextracción

En la fitoextracción, los metales del suelo son absorbidos por las raíces de las plantas, son conducidos por el xilema hasta las partes aéreas y almacenados y concentrados en compartimentos celulares (vacuolas) o extracelulares de hojas y tallos (Fig. 7.1). Las plantas tienen la habilidad de fitoextraer metales esenciales, no esenciales y metaloides (Se, As). Las plantas utilizadas en la fitoextracción (Figura 7.2) de metales pesados tienen que cumplir con ciertos requisitos: (1) ser hiperacumuladoras, es decir, tener la habilidad de acumular y tolerar altos niveles de metales; (2) llevar el metal de la raíz a las partes aéreas; (3) desarrollar gran cantidad de hojas y tallos; (4) tener raíces profundas. Se consideran hiperacumuladoras a las plantas que concentran más de 10,000 mg/kg peso seco de Zn o Mn, o más de 1000 mg/kg peso seco de Ni, Cu, o Pb, o más de 100 mg/kg peso seco de Cd. La planta debe contar con algún proceso que le permita hiperacumular el metal sin que le cause daño. Entre estos procesos se cuentan la compartimentalización, la complejación y la síntesis de proteínas que se unen al metal o que quelan a los iones metálicos, así como sustancias de respuesta al estrés. La estrategia de fitoextracción es la más efectiva en la descontaminación de suelos, y ya varias familias de plantas como las Lamiaceae, Fabaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, y Brassicaceae han sido empleadas por su capacidad de hiperacumular metales pesados. Plantas como *Populus* spp (álamos) y *Salix* spp (sauces) son plantas hiperacumuladoras y han sido utilizadas para eliminar Cd y Zn de sitios contaminados. Estos árboles producen una gran cantidad de biomasa en poco tiempo, y acumulan el metal en las hojas más que en el tronco, por lo que pueden ser removidas continuamente.

Fitodegradación

La fitodegradación es el metabolismo o biotransformación del contaminante que ocurre dentro de la planta. Algunas plantas tienen la capacidad de biotransformar compuestos orgánicos mediante reacciones enzimáticas, pasando por tres fases. En la fase I, monooxigenasas y carboxilesterasas llevan a cabo reacciones de óxido-reducción e hidrólisis, generándose compuestos más hidrofílicos que pueden ser más o menos tóxicos que el original. El producto de la fase I

entra en reacciones de fase II, donde las sustancias son atacadas por transferasas, propiciando su conjugación con azúcares, aminoácidos o glutatión, formando complejos sin actividad biológica. En la fase III los complejos provenientes de la fase II son atrapados por estructuras de la planta, ya sea que ingresen a las vacuolas o que formen enlaces con componentes de la pared celular, como la lignina. Plantas como *Brassica juncea*, *Cichorium intybus* son capaces de metabolizar el DDT (diclorodifeniltricloroetano), que es un plaguicida de gran persistencia y movilidad ambiental, que fue muy utilizado hace algunos años para combatir insectos, tanto los que afectan las cosechas como los que funcionan como vectores de malaria y tifus. Otras plantas, como *Myriophyllum aquaticum*, *Helianthus annuus* pueden biotransformar el TNT (2,4,6-trinitrotolueno), un explosivo muy tóxico que contamina suelo y agua debido a su uso bélico.

Fitovolatilización

Algunos metales y metaloides, al ingresar a la planta, son biotransformados a compuestos volátiles que pueden ser liberados a la atmósfera en la estrategia conocida como fitovolatilización (Fig. 7.1). Así, compuestos inorgánicos de Se, presentes en el suelo, son absorbidos por plantas, y mediante reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo del Se, los convierten a compuestos orgánicos, menos tóxicos que los originales, que son liberados a través de las hojas al aire. *Chara canescens* y *Arabidopsis thaliana* son plantas en la que se ha observado este mecanismo de remediación, y se ha reportado que en este proceso el Hg se volatiliza como el ion Hg^{2+} que es menos tóxico, y el selenio como $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ que es 600 veces menos tóxico que el elemento.

Rizorremediación

Con la rizorremediación se produce la eliminación de contaminantes del suelo por procesos que llevan a cabo las raíces de las plantas y los microorganismos que se encuentran en el sitio (Fig. 7.1). En el suelo, la planta puede participar con los procesos de fitoestabilización y rizofiltración. La fitoestabilización limita la lixiviación, la movilidad, la biodisponibilidad y la peligrosidad de los contaminantes. Un ejemplo de fitoestabilización es la conversión de la forma

nociva del cromo (Cr^{6+}) a su forma menos soluble (Cr^{3+}) sin que se remueva del suelo y afecte a la planta. La rizofiltración facilita la absorción y la concentración del contaminante en las células de la raíz. La rizofiltración ha sido empleada para eliminar metales pesados y metales radiactivos como uranio (U) y estroncio (Sr) con especies como *Brassica juncea* y *Helianthus annuus*.

Por otro lado, el suelo y las plantas son colonizados por una gran diversidad de microorganismos. Esto es especialmente evidente en la rizósfera, donde bacterias y hongos asociados a las raíces influyen positivamente en la vida de la planta. Los microorganismos participan tanto directa como indirectamente en la remediación del suelo, ya sea activamente degradando, adsorbiendo o absorbiendo los contaminantes; o previniendo o neutralizando efectos adversos que producen factores bióticos o abióticos, y aumentando la resistencia de las plantas a la presencia de los contaminantes. Los microorganismos contribuyen a que la planta esté en buenas condiciones para realizar la fitorremediación, proporcionando enzimas, solubilizando minerales, fijando nitrógeno y suministrando fitohormonas, como el ácido indol acético que promueva la elongación de la raíz. En suelos contaminados con metales pesados, bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Rhizobia*, y hongos como Ascomicetos, Basidiomicetos y micorrizas arbusculares, pueden cambiar la forma iónica del metal, disminuir su toxicidad o modificar su solubilidad. Estos procesos permiten la eliminación de contaminantes del suelo, sin que alcancen partes aéreas de la planta, como en la fitoextracción, limitando su ingreso a la cadena trófica y su volatilización.

Mejoras en la capacidad de fitorremediación

Plantas que se desarrollan en los sitios contaminados pueden ser útiles en la fitorremediación, en cuyo caso, la intervención humana consistiría en aportar humedad y fertilizantes para favorecer el desarrollo vegetal (Fig. 7.2a). Por su parte, los ensayos *in vitro* han permitido seleccionar plantas potencialmente útiles en la fitorremediación. Se busca que las plantas cumplan con las siguientes características: (1) que tengan un rápido crecimiento, (2) que sean de fácil mantenimiento, (3) que resten toxicidad al contaminante, (4) que produzcan gran cantidad de biomasa y por supuesto, (5) que sean tolerantes al contaminante. Pueden conseguirse plantas con una mayor producción de biomasa, de

acumulación de metal y de tolerancia a la toxicidad de los metales pesados por técnicas de fitomejoramiento clásicas o biotecnológicas, como la obtención de transgénicas (Fig. 7.2b). Mediante técnicas de ingeniería genética, se ha logrado la transformación de plantas, especialmente con genes provenientes de bacterias, que le confieren mejores características en el transporte de metales, en la respuesta al estrés oxidativo o la capacidad de detoxificación. También se ha empleado la estrategia de bioaumentación, que es el enriquecimiento del suelo con microorganismos que establecen simbiosis en la rizósfera con las plantas, bacterias (*Rizobium* o endofíticas) u hongos micorrízicos o con otro tipo de microorganismos no necesariamente simbióticos (Fig. 7.2c).

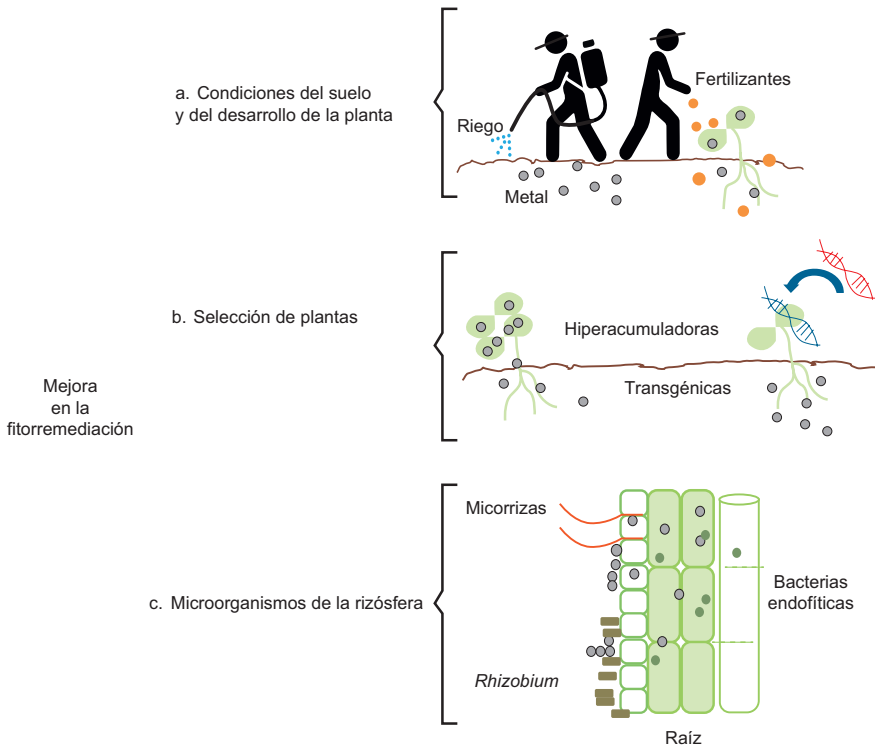


Figura 7.2. Plantas para la fitorremediación. (a) Intervención con técnicas de cultivo para favorecer el desarrollo de plantas nativas en los sitios contaminados; (b) selección de plantas con mejor capacidad de hiperacumulación, mayor biomasa y tolerancia a los metales; (c) enriquecimiento de la rizósfera con microorganismos que favorezcan la fitorremediación.

Leguminosas en la fitorremediación

La familia de las leguminosas (Fabaceae) incluye alrededor de 200 especies, y han sido consideradas en diversos estudios como candidatas para la fitorremediación, especialmente por su capacidad de desarrollarse en suelos con pocos nutrientes. Además, son conocidas por formar asociaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*. La rizerremediación y en general la fitorremediación pueden verse beneficiada por los microorganismos presentes en el suelo, ya que favorecen el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas, además de que están implicadas en la resistencia ante condiciones de estrés biótico y abiótico. Las plantas de la familia de las leguminosas son importantes en los ecosistemas, ya que incrementan la fertilidad por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, capacidad que se ve aumentada en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, y que puede ser benéfica en suelos contaminados con metales. En un estudio realizado con *Phaseolus coccineus* se observó el beneficio de la asociación de esta leguminosa con microorganismos de la rizósfera, tanto en el desarrollo de la planta como en la regeneración del suelo contaminado con hidrocarburos. En una investigación utilizando la especie *Acacia farnesiana* se demostró que tolera y acumula plomo, haciéndola una especie competente para este tipo de tecnologías. Por su parte, *Prosopis laevigata*, conocido comúnmente como mezquite, es capaz de germinar y crecer en diferentes concentraciones de Cd (II) y Cr (VI), por lo que también se considera con potencial en la fitorremediación de metales pesados.

Protocolo

Evaluación de la tolerancia a la exposición a metales y de la capacidad de fitorremediación de plantas

1. Preparar dos soluciones de CuSO_4 , una a 10 mM y la otra a 20 mM.
2. Mezclar 100 ml de cada una de las soluciones con 100 g de tierra libre de hojas, piedras o terrones. Incluir como control, tierra con agua sin cobre.
3. Colocar la mezcla en macetas.
4. Sembrar de 10 semillas de diferentes plantas.
5. Incubar a temperatura ambiente.

6. Contabilizar las semillas germinadas y mediante análisis estadístico de Chi cuadrada, determinar si existen diferencias entre las cultivadas en presencia del metal con las de su respectivo control.
7. Continuar la incubación durante 3 semanas, manteniendo la humedad de la tierra, evitando escurrimiento.
8. Observar crecimiento y desarrollo de las plantas.
9. Mantener el desarrollo durante 3 meses.
10. Mediante análisis en espectroscopio de absorción atómica determinar el contenido de Cu en diferentes secciones de la planta y suelo.
11. Calcular el factor de bioconcentración (FBC), cuyo valor indica la capacidad de la planta de acumular el metal; y el factor de traslocación (FT), que representa la capacidad de la planta para llevar el metal desde las raíces hasta los brotes utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{FBC} = \text{Cu planta } \mu\text{g/g} / \text{Cu suelo } \mu\text{g/g}$$
$$\text{FT} = \text{Cu aéreo } \mu\text{g/g} / \text{Cu raíz } \mu\text{g/g}$$

En un experimento, se pusieron semillas de mezquite, rábano, jitomate y lechuga a diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las semillas de mezquite mostraron un porcentaje de germinación y una elongación de la plántula sin diferencias significativas entre las concentraciones de 0 y 10 mM de CuSO_4 (Fig. 7.3a y 7.3b). Aunque con mezquite se observó un efecto inhibitorio con 20 mM de CuSO_4 , con las otras especies se presentó una inhibición de la germinación y del crecimiento a concentraciones menores (Fig. 7.3a y 7.3b), lo que sugiere una mayor tolerancia del mezquite.

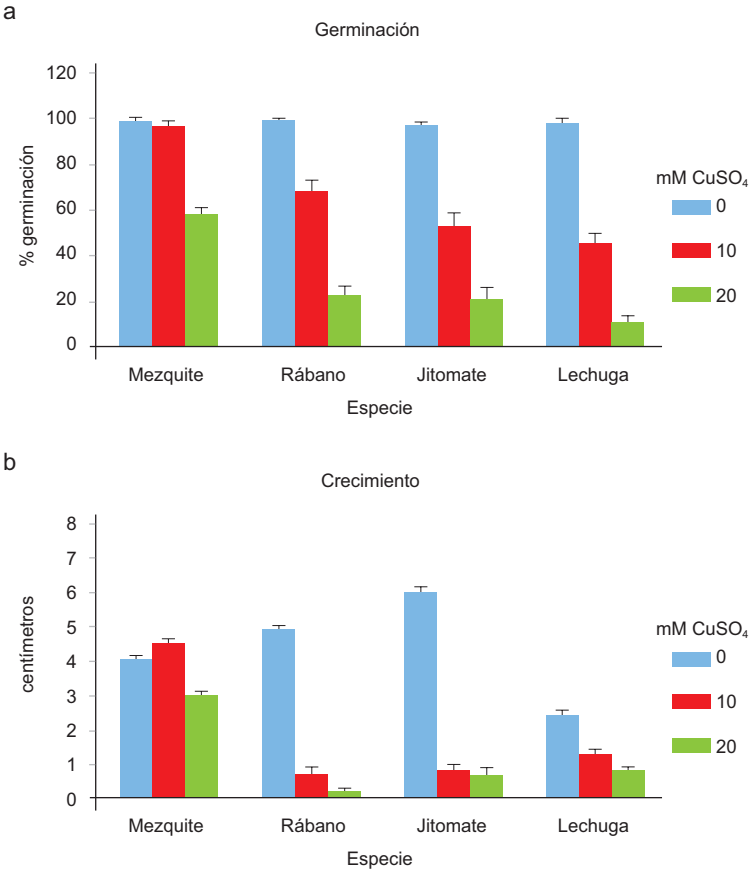


Figura 7.3. Germinación y crecimiento en presencia de CuSO₄. (a) El porcentaje de germinación del mezquite se mantuvo sin diferencias significativas con el control hasta la concentración de 10 mM de CuSO₄, en las concentraciones superiores se observa una inhibición de la germinación. (b) La elongación de las plántulas de mezquite no se vio afectada por la exposición a 10 mM de CuSO₄, pero sí a mayores concentraciones. Las otras especies evaluadas resultaron ser menos tolerantes a la toxicidad del cobre.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
EROs: especies reactivas de oxígeno
FBC: factor de bioconcentración
FT: factor de traslocación
CuSO₄: sulfato de cobre
mM: milimolar
g: gramos
μg: microgramo
ml: mililitros

Glosario

Antioxidante. Sustancia química que evitan la acción de los radicales libres y sus efectos adversos.

Bioconcentración. Acumulación de una sustancia química en un organismo al ingresar a él directamente del ambiente.

Biodiésel. Es un combustible obtenido a partir de lípidos de origen vegetal o animal.

Biodisponibilidad. Cantidad y velocidad con que una sustancia ingresa a un organismo.

Biomasa. Materia orgánica que puede ser utilizada para obtener energía.

Biotransformación. También llamado metabolismo. Es un proceso enzimático mediante el cual un organismo vivo modifica una sustancia química para convertirla en otra de más fácil eliminación.

Cadena trófica. También llamada cadena alimenticia. Secuencia de seres vivos que se alimentan unos de otros en un cierto orden.

Canales iónicos. Poros de la membrana celular formados por proteínas que permiten el paso de iones al interior o exterior de la célula.

Endofítico (a). Organismo que vive en el interior de una planta.

Enzima. También llamados catalizadores biológicos. Proteína que acelera la velocidad de una reacción.

Especies reactivas de oxígeno. Moléculas muy reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareados. Son inestables, contienen oxígeno y reacciona fácilmente con otras moléculas de la célula.

- Hiperamumulador (a). Se refiere a plantas capaces de crecer en suelo rico en metales y de concentrarlos en su interior. Una planta se considera hiperacumuladora si puede contener por lo menos 1000 mg de níquel por kilogramo de materia seca en algún tejido de la parte aérea.
- Leguminosas. También llamadas fabáceas. Son una familia del orden de las fabales que agrupa árboles, arbustos y hierbas que producen fruto tipo legumbre.
- Lignina. Polímeros orgánicos que forma parte de los componentes de la pared celular vegetal, le da estructura y soporte a las plantas vasculares y a algunas algas.
- Lixiviación. También llamada extracción sólido-líquido. Es la separación de una o varias sustancias contenidas en una matriz sólida, usualmente pulverizada, mediante el uso de disolventes líquidos.
- Metales pesados. Elementos químicos metálicos de alta y que pueden ser tóxicos para los seres vivos.
- Mezquite. Especies de planta leguminosa del género *Prosopis*.
- Quelante. También llamado secuestrante. Sustancia química que forma complejos con iones metálicos
- Rhizobium. Género de bacterias gramnegativas fijadoras de nitrógeno, que junto con *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* comprenden el grupo de rizobios.
- Rizósfera. Es la parte del suelo cercana a las raíces de las plantas en donde se desarrolla la vida microbiana. Es un ecosistema donde interactúa la planta a través de sus raíces con el suelo y sus microorganismos.
- Simbiosis. Interacción entre seres vivos de distinta especie en la que se benefician mutuamente.
- Tolerancia. Es la capacidad que tienen los individuos de una especie de soportar cantidades excesivas de alguna sustancia.
- Traslocación. Cambio de posición o de lugar.
- Vacuola. Organelo en forma de pequeñas vesículas de las células de los hongos y de las plantas que permiten el almacenamiento de distintas sustancias, como azúcares o agua.
- Volatilización. Es el proceso en el que una sustancia química se convierte de un estado líquido o sólido a un estado gaseoso o de vapor.
- Xilema. Es un tejido que transporta agua y minerales disueltos desde la raíz hasta el resto de la planta.

Bibliografía

- Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, Rodrigo MA, Adam V, Fujita M, Kizek R, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2015) Jaks of metal/metalloid chelation trade in plants-an overview. *Front Plant Sci.* 6:192. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00192>
- Arocena JM, Van Mourik JM, Schilder M, Faz A (2010) Initial soil development under pioneer plant species in metal mine waste deposits. *Restor. Ecol.* 18, 244–252
- Buendía-González J, Orozco-Villafuerte F, Cruz-Sosa CE, Barrera-Díaz, Vernon-Carter EJ (2010) *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology* 101. 5862–5867
- DalCorso G, Fasani E, Manara A, Visioli G, Furini A (2019) Heavy Metal Pollutions: State of the Art and Innovation in Phytoremediation. *Int J Mol Sci* 20(14). <http://doi.org/10.3390/ijms20143412>
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R. & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- Fagorzi C, Checcucci A, diCenzo GC, Debiec-Andrzejewska K, Dziewit L, Pini F, Mengoni A (2018) Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes. *Genes (Basel)* 9(11). <http://doi.org/10.3390/genes9110542>
- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Trejo-Aguilar D, Sangabriel W, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez JS, López-Ortiz C y Delgadillo-Martínez J (2007) Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41, 817-826
- Ghnaya T, Mnassri M, Ghabriche R, Wali M, Poschenrieder C, Lutts S, Abdely C (2015) Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. *Front Plant Sci* 6:863. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00863>
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable

- development in agriculture. *Microbiol Res* 206:131-140. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Hasan MM, Uddin MN, Ara-Sharmeen I, F Alharby H, Alzahrani Y, Hakeem KR, Zhang L (2019) Assisting Phytoremediation of Heavy Metals Using Chemical Amendments. *Plants (Basel)* 21;8(9). <http://doi.org/10.3390/plants8090295>
- Koźmińska A, Wiszniewska A, Hanus-Fajerska E, Muszyńska E (2018) Recent strategies of increasing metal tolerance and phytoremediation potential using genetic transformation of plants. *Plant Biotechnol Rep*12(1):1-14. <http://doi.org/10.1007/s11816-017-0467-2>
- Mahajan P & Kaushal J (2018) Role of Phytoremediation in Reducing Cadmium Toxicity in Soil and Water. *J Toxicol* 2018:4864365. <http://doi.org/10.1155/2018/4864365>
- Maldonado A, Favela-Torres E, Rivera-Cabrera F, Volke-Sepulveda T (2011) Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil* 339, 377-389
- Mishra J, Singh R, Arora NK (2017) Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Front Microbiol.* 8:1706. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
- Ojuederie OB & Babalola OO (2017) Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 14(12). <http://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, San A (2015) Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Frontier in Plant Science* 6:255. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00255>
- Saleem MH, Ali S, Rehman M, Hasanuzzaman M, Rizwan M, Irshad S, Shafiq F, Iqbal M, Alharbi BM, Alnusaire TS, Qari SH (2020) Jute: A Potential Candidate for Phytoremediation of Metals-A Review. *Plants (Basel).*;9(2). <http://doi.org/10.3390/plants9020258>
- Sangabriel W, Ferrera-Cerrato R, Trejo-Aguilar D, Mendoza-López M R, Cruz-Sánchez JS, López-Ortiz C, Alarcón A (2006) *Fuel*, 22(2), 63–73
- Suman J, Uhlik O, Viktorova J, Macek T (2018) Phytoextraction of Heavy Metals: A Promising Tool for Clean-Up of Polluted Environment? *Front Plant Sci* 9:1476. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.01476>

Capítulo 8

PCR y diseño de oligonucleótidos

Daniel Alejandro Díaz García
José Francisco Morales Domínguez
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary B. Mullis que permite amplificar *in vitro* una gran cantidad de fragmentos de ADN específicos a partir de una mezcla de reactivos sometidos a diversas temperaturas. Los componentes de la mezcla incluyen una plantilla de ADN, dNTPs, enzima polimerasa, buffer de reacción, magnesio y oligonucleótidos. Para este último componente, resulta indispensable el previo análisis y diseño, ya que deberán presentar características que permitan su correcto funcionamiento. Gracias a la existencia de plataformas bioinformáticas esta tarea se facilita. Diversas variantes como PCR anidada, múltiple, touchdown, RT-PCR, qPCR y RACE, han

sido desarrolladas con el objetivo de mejorar algunas características como sensibilidad y especificidad además de aumentar las aplicaciones.

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular que permite amplificar *in vitro* una gran cantidad de fragmentos de ADN específicos a partir de un molde. En esta técnica se aprovecha, aunque con ciertas diferencias, el principio de la replicación de ADN, donde, por medio de la exposición a ciclos de diferentes temperaturas y con reactivos como dNTPs, ADN molde, oligonucleótidos, buffer y una polimerasa, se sintetizan nuevas cadenas de ADN logrando obtener millones de copias.

Kary B. Mullis desarrolló esta técnica a mediados de los 80s del siglo pasado tomando en cuenta estudios sobre el uso de oligonucleótidos para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Gracias a esto, Mullis ganó el premio nobel de química en 1993.

La PCR se caracteriza por su rapidez, facilidad, especificidad, sensibilidad y fiabilidad. Gracias a su gran variedad de aplicaciones, resulta de gran importancia en laboratorios de investigación. Particularmente, en biotecnología vegetal, sus aplicaciones incluyen la identificación, secuenciación y análisis de expresión de genes, detección de patógenos, análisis de mutaciones y polimorfismos, entre otras.

Componentes para la PCR

Como ya se mencionó, la PCR utiliza una metodología similar a la replicación, sin embargo, la síntesis *in vivo* de ADN depende de varias enzimas y cofactores, mientras que *in vitro* se utiliza un conjunto de componentes expuestos a diferentes temperaturas. Estos componentes se presentan a continuación:

- ADN: Sirve como molde para generar las copias de un fragmento específico. Puede ser de cualquier organismo y de cualquier tipo (genómico, complementario, plasmídico, etc.).

- dNTPs: Es una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos libres (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) que serán utilizados para la síntesis del fragmento de ADN.
- Enzima ADN polimerasa: Se encarga de la síntesis de la nueva cadena por medio de los dNTPs con base en la cadena molde. Actualmente, entre las enzimas más utilizadas se encuentran la *Taq* y la *Pfu*, obtenidas de la bacteria *Thermus aquaticus* y la arquea *Pyrococcus furiosus*, respectivamente. Estas enzimas se utilizan por ser termoestables, ya que mantienen su actividad durante la reacción a pesar de las altas temperaturas a las que son sometidas.
- Buffer de reacción: Provee la fuerza iónica y mantiene el pH de la solución durante la reacción.
- Magnesio: Es un cofactor de la polimerasa, generalmente provisto como $MgCl_2$ o $MgSO_4$. La concentración de este elemento tiene un efecto sobre la especificidad de la reacción por lo que debe ser optimizada.
- Oligonucleótidos: También llamados cebadores o iniciadores. Son fragmentos cortos de ADN de una sola cadena complementarios a la hebra molde. Limitan el fragmento a amplificar y aportan el grupo 3'OH para que la polimerasa inicie su actividad. Estos deben ser específicos al amplicón que se desea obtener, por lo cual, es necesario llevar a cabo un análisis para su diseño.

Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos es un paso fundamental, ya que, de él dependerá el éxito de la PCR. De acuerdo con diversos autores los parámetros varían ligeramente, pero de forma general, los oligonucleótidos deben cumplir con las siguientes características:

- Longitud: Esta característica influye en la especificidad; a mayor tamaño más específico, sin embargo, oligonucleótidos muy largos dan como resultado una lenta hibridación. Generalmente el tamaño va de 18 a 24 nucleótidos de longitud.
- Temperatura de fusión (T_m): Es la temperatura en la cual el 50% del ADN bicatenario se desnaturaliza. Es recomendable una T_m de 55 a 60

°C con una diferencia máxima de 5 °C entre ambos oligonucleótidos. El cálculo preciso de este parámetro se realiza por medio del modelo termodinámico del vecino más cercano, sin embargo, una fórmula simple para el cálculo de este parámetro con oligonucleótidos de 20 nucleótidos o menos es la siguiente:

$$T_m \approx 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

Por medio de este parámetro es posible estimar la temperatura de alineamiento, frecuentemente calculada a 5 °C por debajo de la T_m , aunque, el valor óptimo debe ser obtenido experimentalmente.

$$T_a \approx T_m - 5 \text{ °C}$$

- Contenido de G y C: Influye directamente en la T_m de los oligonucleótidos. Se recomienda un porcentaje de G y C del 45 al 60 %.
- Presencia de 2 a 3 G o C dentro de los últimos 5 nucleótidos: Una de estas C o G debe estar en el extremo 3'. Esto ayuda a la unión específica de los oligonucleótidos.
- Especificidad: Los oligonucleótidos utilizados deben ser específicos al gen de interés, buscando regiones no conservadas con otros genes para evitar amplificaciones no deseadas.
- Longitud del amplicón: Para la PCR convencional la longitud recomendada es de alrededor de 500 pb. Para una PCR en tiempo real el fragmento recomendado es de 70 a 200 pb, además, cuando este tipo de PCR se utiliza para análisis de expresión, es recomendable que cada uno de los oligonucleótidos hibriden en un exón diferente, y de ser posible, en la unión de dos exones para evitar la amplificación no deseada de ADN.

Adicionalmente, debe evitarse la complementariedad entre oligonucleótidos, repeticiones consecutivas de dos nucleótidos (por ejemplo, ATATAT) y repetición de 4 veces o más el mismo nucleótido con el fin de evitar la formación de dímeros o estructuras secundarias.

Es importante señalar que por medio de los oligonucleótidos es posible agregar una secuencia corta en los extremos 5' o 3' del amplicón, por ejemplo, sitios de restricción. Para esto, además de la secuencia de reconocimiento de

la enzima, es necesario agregar de 3 a 6 nucleótidos extra hacia el extremo 5' para permitir el correcto anclaje de la enzima de restricción para el corte.

Para el diseño de oligonucleótidos, existe una gran variedad de programas o plataformas informáticas que facilitan la tarea. Entre estas se encuentran PrimerSelect de DNASTar, FastPCR, Primer designing tool de NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>], Primer3Plus [<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>] y PCR Primer Design Tool [<https://www.eurofinngenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>].

Proceso de la PCR

Una PCR se basa en la repetición de ciclos de tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión. La temperatura y tiempo de cada una de estas etapas dependerá del amplicón, de los oligonucleótidos y del kit utilizado.

La desnaturalización consiste en la separación de las dos cadenas de ADN por el rompimiento de los puentes de hidrógeno que las unen. En este paso, la mezcla de reacción se lleva a una temperatura de 94 o 95 °C.

En el alineamiento, los oligonucleótidos se hibridan a cada una de las cadenas previamente separadas. Aquí, la temperatura juega un papel importante en la eficiencia de amplificación y de ella depende la especificidad de la reacción: a mayor temperatura, mayor especificidad. En esta etapa, la temperatura varía entre 40 y 60 °C de acuerdo con la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Por último, la extensión es el proceso en el que la polimerasa genera una nueva cadena en dirección 5' a 3' a partir de los oligonucleótidos al unir los dNTPs. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 72 °C con una duración variable de acuerdo con la enzima y la longitud del amplicón. En la Figura 8.1 se muestra un esquema de un ciclo de PCR.

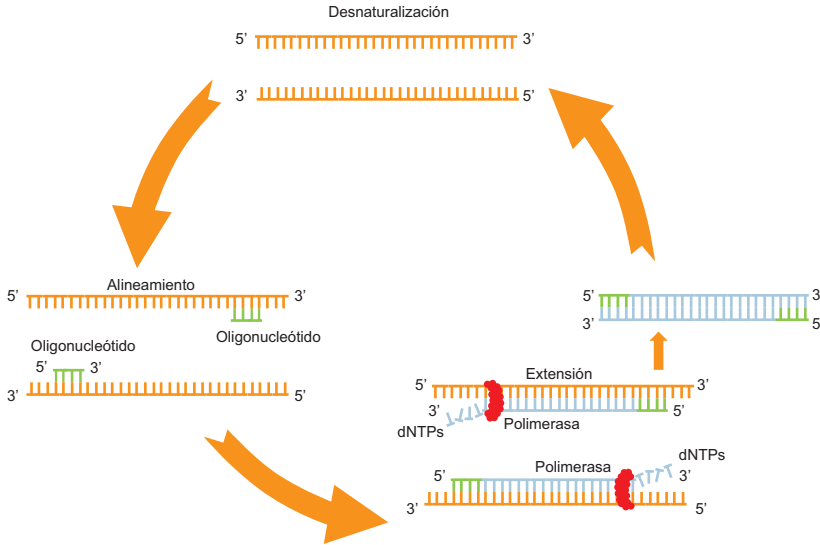


Figura 8.1. Esquema de un ciclo de PCR donde se muestran las tres etapas que lo componen: desnaturalización, alineamiento y extensión.

Por cada ciclo de la PCR se aumenta exponencialmente el número de copias del gen (durante el primer ciclo se obtienen dos copias, durante el segundo ciclo se obtienen cuatro copias, durante el tercero se obtienen ocho copias y así sucesivamente), por lo que, después de 30 ciclos, es posible obtener más de mil millones de copias del fragmento por cada molde de ADN de doble cadena inicial.

Entonces, una PCR convencional o también llamada PCR punto final, consiste en la repetición de alrededor de 30 ciclos (comúnmente entre 25 y 40 ciclos) de estas tres etapas, en la que, además se adiciona una desnaturalización inicial previa a los ciclos para asegurar la separación de las hebras de ADN, y una extensión final después de los mismos, para garantizar la completa extensión de los amplicones. Para esto, se utiliza un equipo llamado termociclador que permite mantener diferentes temperaturas durante periodos controlados.

Tipos de PCR más utilizados

Se han realizado algunas modificaciones a esta técnica, lo que ha dado como resultado el desarrollo de diversas variantes de la PCR, aumentando así, sus

aplicaciones y mejorando sus características. Algunas de estas variantes se presentan a continuación.

PCR anidada

Este tipo de PCR consiste en dos reacciones por separado, cada una, con un par de oligonucleótidos diferente. En la primera reacción, se utiliza un par de oligonucleótidos denominados externos para amplificar una secuencia de ADN de interés. El producto que se obtiene se toma como molde para la segunda amplificación, donde se utiliza el segundo par de oligonucleótidos (internos) para obtener un fragmento dentro del primer amplicón. De esta forma se obtiene mayor especificidad y sensibilidad en el producto final. En la Figura 8.2 se muestra un esquema de esta técnica.

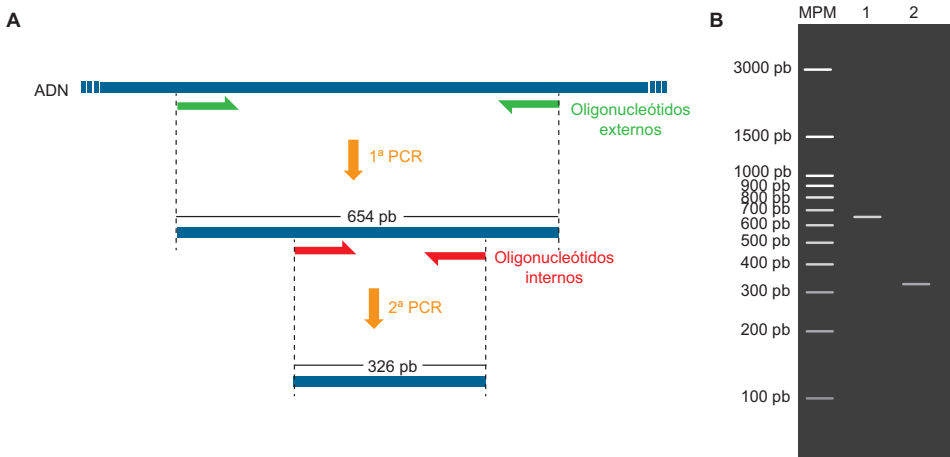


Figura 8.2. Esquema de PCR anidada. A) Se muestra una plantilla de ADN, a partir de la cual, con el par de oligonucleótidos externos (flechas color verde) se amplifica un fragmento de 654 pb; este amplicón es utilizado en una segunda reacción con el par de oligonucleótidos internos (flechas color rojo) que dan como resultado un fragmento de 326 pb que se encuentra dentro de la región del primer amplicón. B) Representación de la electroforesis de la PCR anidada, en el carril 1 se muestra la amplificación con los oligonucleótidos externos, en el carril 2 se muestra la amplificación obtenida con los oligonucleótidos internos.

Cabe mencionar que cuando se utiliza ARN como molde, este debe ser convertido a ADN complementario (ADNc); proceso donde actúa la transcriptasa reversa (este proceso se explica más adelante en el apartado de RT-PCR). Cuando se utiliza ADNc la técnica recibe el nombre de RT-PCR anidada.

La PCR anidada ha sido ampliamente utilizada para la identificación de patógenos de plantas como hongos, bacterias, virus y fitoplasmas.

Un ejemplo de esta técnica es la detección temprana de *Alternaria carthami*, hongo que produce la enfermedad de la mancha foliar (una de las principales enfermedades de cultivos como el cártamo), con el fin de establecer medidas para restringir su transmisión y proliferación. Para esto, en la primera amplificación se han utilizado oligonucleótidos universales (externos) que se unen a ITS, mientras que en la segunda amplificación, los oligonucleótidos (internos) son específicos de la especie. Así mismo, se han identificado otros organismos fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* en papa, *Pilidiella granati* en granada, entre muchos otros que representan un grave problema en el cultivo de diversas especies vegetales.

PCR múltiple

Este tipo de PCR surgió como una variante de la PCR convencional para obtener por medio de una sola reacción diferentes amplicones objetivo. Para llevarla a cabo, es necesario el uso de más de un par de oligonucleótidos en una única reacción y puede utilizarse una o varias plantillas. Las ventajas que presenta este tipo de PCR son el ahorro de tiempo y reactivos y menor cantidad de muestra necesaria, además, es útil para genes muy grandes donde se requiere obtener amplicones de varias regiones dentro del mismo gen. Una desventaja de este tipo de PCR es que se ve reducida la sensibilidad en comparación con una PCR simple. En la Figura 8.3 se muestra un esquema del uso de esta técnica con tres pares de oligonucleótidos.

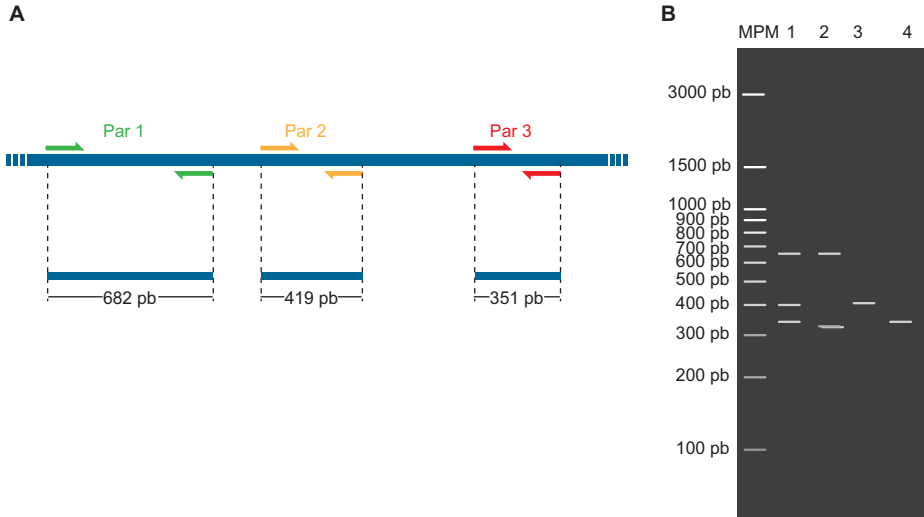


Figura 8.3. Esquema de PCR múltiple. A) Se muestra una plantilla de ADN, a partir de la cual, con tres pares de oligonucleótidos (flechas color verde indican par 1, flechas color beige indican par 2 y flechas color rojo indican par 3) se amplifican tres fragmentos de longitudes de 682, 419 y 351 pb, respectivamente. B) Representación de la electroforesis de la PCR múltiple, en el carril 1 se encuentra la muestra con la PCR múltiple donde se utilizaron los tres pares de oligonucleótidos en una sola reacción, en los carriles 2, 3 y 4 se observan las muestras de PCR individual con cada uno de los tres pares de oligonucleótidos.

La PCR múltiple tiene aplicaciones en el genotipado mediante marcadores moleculares, en la detección de organismos genéticamente modificados y en la detección de patógenos en plantas.

Por ejemplo, esta técnica se ha utilizado en el genotipado de microsatélites de algunas especies de roble, así como en especies de la familia Salicaceae. En cuanto a la identificación de fitopatógenos, se ha aplicado en la detección simultánea de tres especies de hongos del género *Phytophthora* en plantaciones de kiwi mediante oligonucleótidos específicos al gen *Ypt1* para cada una de las especies. Por último, en la identificación de organismos genéticamente modificados, se han utilizado eficiente y simultáneamente oligonucleótidos específicos al promotor 35S, al terminador NOS y al gen *epsps* en maíz y soya, además de proponerse su utilidad en otras especies vegetales.

RT-PCR

La PCR con transcriptasa reversa o RT-PCR consiste en la síntesis de ADNc a partir de ARNm. Esta reacción se lleva a cabo por medio de la enzima transcriptasa reversa capaz de retrotranscribir el ARNm a ADN. Para esto, se pueden utilizar tres tipos de oligonucleótidos: oligo dT, oligonucleótidos aleatorios u oligonucleótidos específicos.

El oligo dT consiste en una secuencia de 12 a 18 desoxitimidinas que se unen a la cola de poliA del ARNm por lo que se obtiene el ADNc completo. Para el uso de este oligonucleótido es necesario que el ARNm no se encuentre degradado.

Los oligonucleótidos aleatorios son secuencias cortas generalmente de seis bases en orden aleatorio. Estos pueden mejorar la síntesis de ADNc debido a que pueden unirse a cualquier sitio dentro del ARNm incluso degradado, siempre que este sea complementario, sin embargo, no produce la misma eficiencia para todos los objetivos de la muestra.

Los oligonucleótidos específicos son diseñados a partir de secuencias conocidas para obtener en un solo paso el gen de interés a partir de ARNm. Este es el método de mayor especificidad y sensibilidad, sin embargo, la cantidad de ARNm puede ser un factor limitante.

En la Figura 8.4 se presenta un esquema donde se observa la diferencia del amplicón que se obtiene de una PCR convencional utilizando como plantilla una muestra de ADN y ADNc (después de realizar RT-PCR).

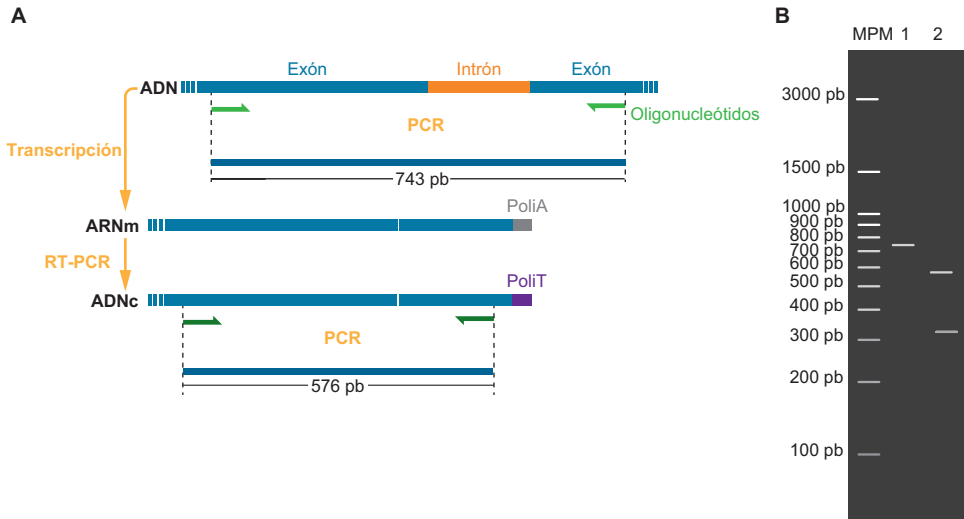


Figura 8.4. Esquema de PCR convencional diferenciando el uso de plantilla de ADN y ADNc. A) Se muestra el proceso donde el ADN, compuesto por dos exones separados por un intrón, es transcrito a ARNm, y este, es retrotranscrito a ADNc mediante RT-PCR utilizando un oligo dT. A partir de la plantilla de ADN, al amplificar mediante un par de oligonucleótidos específicos (diseñados en los exones), se obtiene un fragmento de 743 pb, mientras que, si la plantilla utilizada es ADNc, con los mismos oligonucleótidos se obtiene un fragmento de 576 pb. La diferencia de tamaño entre estos amplicones se debe a la ausencia del intrón en el ADNc. B) Representación de la electroforesis de la PCR realizada utilizando como plantilla ADN y ADNc, donde se observa la diferencia de tamaño, en el carril 1 se muestra la amplificación a partir de ADN, en el carril 2 se muestra la amplificación a partir de ADNc.

Por medio de este tipo de PCR (en algunos casos con algunas modificaciones, por ejemplo, el uso de oligo dT modificado) se sintetiza ADNc que es utilizado para la PCR cuantitativa, para la construcción de librerías de ADNc y el análisis de *splicing* alternativo.

Se han construido librerías de diversas especies de plantas bajo diferentes condiciones con el fin de identificar la respuesta de genes que ayuden al mejoramiento vegetal. Por ejemplo, el tabaco es una planta con gran capacidad de acumulación y tolerancia al cadmio, por lo que ha sido utilizada como planta fitorremediadora. Por ello, se han construido librerías de ADNc de la planta bajo condiciones de estrés por este metal para identificar genes involucrados

y así, poder generar plantas con mejores características. También existen muchos estudios con diferentes tipos de plantas y condiciones como estrés por sequía, salinidad y altas y bajas temperaturas para dilucidar el mecanismo de respuesta con el fin de obtener cultivos mejorados.

PCR en tiempo real o cuantitativa

La qPCR, PCR cuantitativa o PCR en tiempo real permite cuantificar la cantidad de copias de ADN presentes en una muestra. Es ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, reproducibilidad y precisión. Durante la reacción se detecta por medio de fluorescencia, la cantidad de producto de PCR obtenido tras cada ciclo, lo que permite calcular la cantidad de cadenas de ácidos nucleicos. Uno de los fluorescentes más utilizados es SYBR Green que al unirse a ADN bicatenario y ser excitado emite fluorescencia. Una desventaja de este colorante es que puede unirse a cualquier producto bicatenario incluyendo dímeros de oligonucleótidos. Debido a esto, se ha recomendado el uso de sondas fluorogénicas TaqMan, ya que por la forma en que funcionan presentan mayor especificidad. El equipo que se utiliza es un termociclador de PCR en tiempo real capaz de excitar al colorante, medir la señal que emite y realizar el análisis cuantitativo.

En esta técnica se utilizan al menos dos pares de oligonucleótidos en diferentes reacciones: un par específico al gen de interés, los demás a genes de referencia.

El gen de referencia cumple la función de normalizar la expresión del gen diana y se caracteriza por tener una única copia dentro del genoma, expresarse de forma constitutiva y no presentar variación en diferentes tejidos y etapas fisiológicas. Es recomendable usar más de un gen de referencia para disminuir el error en el análisis de la expresión, ya que se ha demostrado que ciertos genes utilizados presentan variación en su expresión bajo diferentes condiciones experimentales. Algunos de los genes de referencia más utilizados son *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*, gen codificante a la subunidad ribosomal 18S, *ubiquitina*, β -*actina* y β -*tubulina*. Para determinar si un gen es adecuado debe validarse su uso como gen de referencia para cada especie.

La PCR en tiempo real ha sido ampliamente utilizada para cuantificar la expresión de genes bajo diversas condiciones, determinar el número de copias de genes y transgenes y detectar patógenos.

Un ejemplo es la cuantificación del número de copias de un péptido natriurético de plantas (*PNP*) en ajo. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos específicos de este gen, mientras que, para el gen de referencia, se utilizaron oligonucleótidos específicos a actina. Además, esta técnica ha sido utilizada para cuantificar la expresión de genes implicados en la respuesta de defensa de las plantas y desarrollar estrategias de mejoramiento y control, por ejemplo, se ha cuantificado la expresión de genes como *PR1*, *ERF1*, *CH5b*, *HPL*, *GSTa*, entre otros, durante la interacción de frijol con *Rhizoctonia solani* (hongo que causa enfermedad de raíz e hipocótilos) y *Trichoderma velutinum* (usado como control biológico de enfermedades fúngicas).

PCR touchdown

Es una técnica que permite el aumento de la sensibilidad, rendimiento y especificidad de la reacción, facilitando la amplificación de fragmentos difíciles y en reacciones donde se sospecha que la secuencia de los oligonucleótidos no es totalmente complementaria a la cadena molde. En esta, en el ciclo inicial, la temperatura de alineamiento es alrededor de 10 °C arriba de la T_m calculada y conforme avanzan los ciclos, esta temperatura va disminuyendo de 1 a 2 °C cada ciclo durante 10 a 15 ciclos hasta llegar de 2 a 5 °C debajo de la T_m calculada, a partir del cual, se continúa con 20 o 25 ciclos manteniendo la misma temperatura de alineamiento.

RACE

La amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para obtener un fragmento de secuencia desconocida a partir de una región conocida. Por medio de este proceso es posible obtener la secuencia completa de ADNc de un gen, a partir de solo un fragmento conocido. Existen dos tipos de reacción dependiendo del extremo que se desconozca de la secuencia: 5' RACE y 3' RACE.

En el 3' RACE se puede obtener la secuencia desconocida hacia el extremo 3'. Esto es posible mediante el uso del fundamento de la RT-PCR con oligo dT, para lo cual, se aprovecha la cola de poliA del ARNm. En esta técnica se sintetiza por transcripción reversa el ADNc mediante un oligo dT unido a una secuencia adaptadora. Después, se utiliza un oligonucleótido específico

de la región conocida y otro a la secuencia adaptadora y por medio de PCR se obtiene la región intermedia entre ambos oligonucleótidos.

En el 5' RACE se puede obtener la secuencia desconocida hacia el extremo 5'. Aquí, se utiliza ARNm y un oligonucleótido específico a la región conocida en antisentido, a partir del cual se sintetiza el ADNc. Una vez obtenido, se elimina el ARNm, los dNTPs y oligonucleótidos no incorporados y se agrega una enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) capaz de agregar nucleótidos sin necesidad de un molde, y alguno de los 4 dNTPs para agregar una cadena homopolimérica al extremo 3' del ADNc. Posteriormente, se realiza una PCR con un oligonucleótido que se alinea al extremo 3' del primer oligonucleótido utilizado y uno complementario a la región homopolimérica.

Un ejemplo del uso de la técnica 3' RACE es la obtención de la secuencia de un nuevo gen del factor de transcripción *NAC* en trigo para predecir la proteína a la que codifica, así como sus dominios y motivos para determinar su papel en el desarrollo y bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.

Protocolos

En el laboratorio de Biología Molecular de plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se identificó una dehidrina en maíz (*Zea mays* L.) por medio de PCR. Estas proteínas son parte del grupo de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales, son intrínsecamente desordenadas y cumplen una función como protectoras de estructuras celulares. Las dehidrinas se caracterizan por la presencia de regiones conservadas llamadas segmentos K, Y, S y F y regiones ricas en histidinas. Se clasifican en 5 grupos de acuerdo con la presencia y disposición de estas regiones.

Se ha visto que estas proteínas responden ante condiciones de estrés abiótico, tales como altas y bajas temperaturas, salinidad y sequía, brindando a la planta una mayor tolerancia a condiciones adversas. La condición estresante bajo la cual se expresan los genes codificantes para dehidrinas depende de su tipo.

Debido a esto, es importante la identificación y clasificación de los genes que codifican a estas proteínas en diversas especies vegetales, determinando las condiciones bajo las cuales, se aumenta su expresión. Una vez identificada esta característica, es posible sobreexpresarlas en plantas de interés para aumentar su tolerancia a un tipo de estrés específico.

Para esto, primero se realizó la búsqueda de secuencias codificantes a dehidrinas en maíz. En la base de datos de Phytozome [https://phytozome.jgi.doe.gov/] se seleccionó una de ellas [número de acceso Zm00008a031183] y se nombró *ZmDHN*.

Esta secuencia es de 1075 pb y codifica a una proteína del tipo YSK₃, es decir, tiene un segmento Y, un segmento S y tres segmentos K (Figura 8.5). De acuerdo con diversos estudios, este gen podría ser inducido por deshidratación y ácido abscísico.

```

M A H Y Q Q G R R Q Q V D E Y G N P V P
ATGGCGCACTACCAGCAGGGGAGGCGGCAGCAAGTGGACGAGTACGGCAACCCGGTCCCT
G G H G V Q Q G Q Q L G E S A G G Y G V A
GGGGGCCACGGTTCAGGGCCAGCAGCTGGGTGAATCCGCCGGGCGGTACGGGCTCGCA
G T G S Y G G Q H Q A G Y G P T G T G T
GGCACCGGCAGCTACGGCGGCCAGCATCAGGCTGGGTATGGACCCACGGCCACCGGCACG
H D A G G Y G G S G H P G Y G V T G T G
CATGACGCCGGGGCTACGGCGGCTCGGGCCATCCGGGTACGGGGTTACCGGAAACGGGC
V H D A G G P G A Y G A A T G T R A H G
GTCCACAGCCGGTGGCCAGGTGCGTATGGAGCAGCCACGGGCACGAGAGCCACGGC
T H G G V T G I Q D G A A G L T G G G L
ACTCATGGCGCGTACCGGGATCCAGGACGGCGCGCCGGCCTCACCGTGGTGGTCTG
H G G A T G M G T T A G T G A H G A I G M
CATGGCGCAACAGGCATGGGTACGACTGCCGTTACTGGCGCGCACGGTCCATCGGAATG
L D T G V L G G G G H A A T G M P A G H
CTTGACACGGGGTCTTAGGCGGGAGGGCAGCGGCCACCGGCATGCCCGCGGGCCAC
G T R P G A T G I S G T G G A F P H A A
GGCACGGCTCCCGGCCACAGGCATATCTGGAACCGCGCGCGTTCGCCCATGCAGT
E H K T G D D I L R R S G S S S S S S S
GAGCACAAAGCGGGCAGCACATCCTTCGCGCTCCGGCAGGAGCTGGAGTCCAGGAC
S
TCGGTGGTTTCGTTGCTCCATCGCAATATTCTCGTCCGGCTATATCCACTCCCACACCA
S S E D D
TGCATGTGCATGCAGTACCTGGTGTGGCATGTCTCTCCATGCAGTCATCGAAGACGA
G M G G R R K K G L K E K I R E K M P A
CGGCATGGTGGGCGCGAAGAAGGGCCTGAAGGAGAAGATCAAGGAGAAAATGCCAGC
S H R E G Q A T A T G A Y G G T G Y V A
AGGCCACAGGGAAGGCCAGGGCAGGCCACCGGGCGGTACGGCGGGACAGGGTACCTGGC
G L T T G G P H E K K G V V E K I K E K
TGGGCTGACGACCGGAGGCCCCACGAGAAGAGGGTGTGGTGGAGAAGATCAAGGAGAA
I P G G H K D Y D Q H Q H T T A A T G G
GATCCAGCGGGCCACAAGGACTACGACCAGCATCAGCACACCACCGGGCAACCGGTGG
G G G Y G G T T D T T Y G T T T E G T H
CGGCGTGGCTATGGCGGAACCCAGCACGACGATATGGGACGAGCTGAGGGTACGGA
E K K G F M E K I K E K L P G Q H *
CGAGAAGAGGGCTTCATGGAGAAGATCAAGGAGAACTCCAGGTTCAGCACTAA

```

Figura 8.5. Secuencia de dehidrina *ZmDHN* reportada en Phytozome. El segmento Y se encuentra subrayado; en el recuadro con líneas diagonales se encuentra resaltado el segmento S; en el recuadro blanco se encuentra resaltado el intrón; en el recuadro gris se encuentran resaltados los segmentos K.

Esta secuencia contiene dos exones separados por un intrón de 103 pb. El primer exón contiene una secuencia codificante de 603 pb y el segundo de

369 pb. Con el fin de obtener una secuencia a partir de la cual sea posible diseñar oligonucleótidos de PCR en tiempo real, se diseñaron oligonucleótidos que amplifiquen parte de los dos exones. El diseño se realizó por medio de la plataforma bioinformática de NCBI, agregando parámetros como el tamaño de amplicón, la Tm de los oligonucleótidos y la región donde hibriden ambos oligonucleótidos (Figura 8.6).

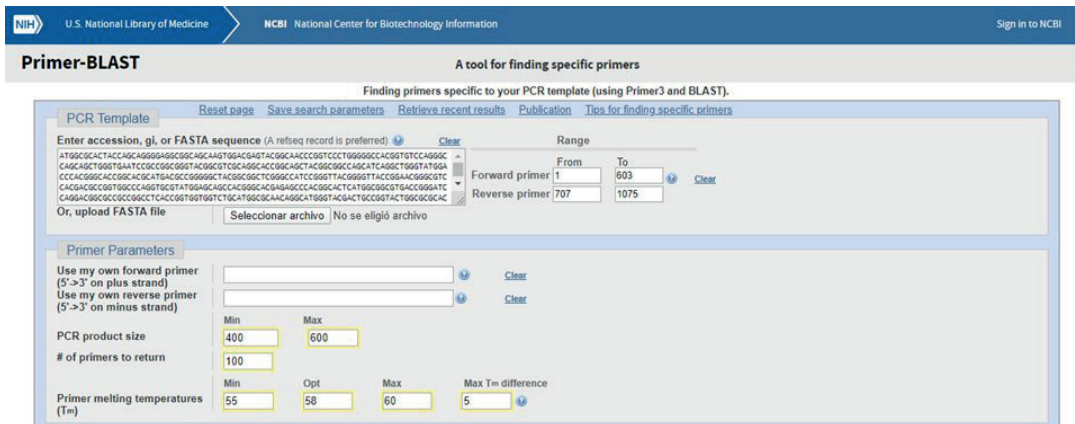


Figura 8.6. Plataforma de NCBI para el diseño de oligonucleótidos.

Las condiciones del par de oligonucleótidos seleccionado se muestran en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Características de los oligonucleótidos seleccionados.

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Tm	%GC	Longitud del amplicón
FZmDHN	GCCATCGGAATGCTTGACAC	20 pb	59.90	55	531
RZmDHN	TGCTGATGCTGGTCGTAGTC	20 pb	59.83	55	

Una vez sintetizados los oligonucleótidos se llevó a cabo la PCR con el programa de la tabla 8.2.

Tabla 8.2. Programa de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	45 s	
Alineamiento	56°C	30 s	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

La PCR se verificó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet. Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500 pb (Figura 8.7).

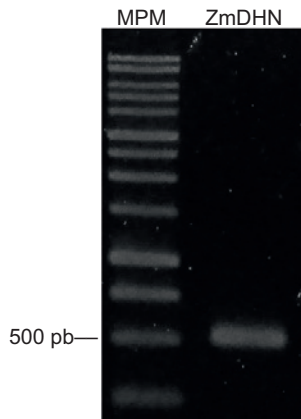


Figura 8.7. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón obtenido del gen parcial de la dehidrina ZmDHN. MPM, Marcador de peso molecular 1 Kb (Promega); ZmDHN, dehidrina de maíz.

Hasta este punto se realizó la parte experimental de este protocolo, sin embargo, a continuación se puede realizar la secuenciación del amplicón obtenido para confirmar que se trata de la dehidrina deseada. Posterior a esto, se puede llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real con el fin de analizar su expresión bajo diferentes condiciones y corroborar si solo se expresa bajo déficit hídrico o también bajo diferentes condiciones como temperatura, salinidad, etc.

Finalmente, cabe mencionar que esta investigación puede ser utilizada para el mejoramiento genético de plantas con el fin de obtener especies con características deseadas como mayor tolerancia a diversos tipos de estrés.

Abreviaturas

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

C: citosina

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato

G: guanina

ITS: internal transcribed spacer (espaciador interno transcrito)

MgCl₂: cloruro de magnesio

MgSO₄: sulfato de magnesio

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PNP: péptido natriurético de plantas

RACE: rapid amplification of cDNA ends (amplificación rápida de los extremos de ADNc)

T: timina

U: uracilo

Glosario

Ácidos nucleicos: macromoléculas compuestas por nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos: ADN y ARN.

ADN: material genético que almacena toda la información de los organismos vivos y algunos virus.

ADN complementario: ADN obtenido a partir de ARNm por medio de una retrotranscriptasa.

ADN genómico: ADN contenido en los cromosomas que almacena la información genética de cada organismo.

ADN plasmídico: ADN circular que puede encontrarse en bacterias y se replica y transcribe independientemente del ADN cromosómico.

Amplicón: conjunto de copias de un fragmento de ADN obtenido a partir de PCR.

Electroforesis: técnica para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas de acuerdo con su tamaño y carga por medio de un campo eléctrico.

Enzima: proteína catalizadora de reacciones químicas.

Exón: región del gen codificante a proteína que se mantiene en el ARNm maduro después del proceso de *splicing*.

Gen: región de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de ARNm y proteínas.

Genoma: secuencia de ADN completa de un organismo.

Genotipado: estudio de la diversidad genética para identificar variaciones en el genoma entre individuos.

Intrón: región del gen no codificante a proteína que es eliminado durante el proceso de *splicing*.

Librería de ADNc: colección de secuencias de ADNc clonadas que son obtenidas a partir de ARNm mediante retrotranscripción por lo que solo representa la región codificante a proteínas.

Mutación: cambio en la secuencia de ADN o ARN de un organismo provocado por un error en la replicación o por la exposición a algún factor o agente mutágeno.

Nucleótido: molécula formada por una de las bases nitrogenadas (A, G, C o T para ADN y A, G, C o U para ARN), una pentosa y un grupo fosfato.

Organismo genéticamente modificado: organismo cuyo material genético ha sido modificado.

Polimorfismo: presencia de variantes de una secuencia específica de ADN en una población.

Sitio de restricción: secuencia de ADN que puede ser reconocida y cortada por una endonucleasa específica.

***Splicing*:** proceso de maduración del ARNm donde se eliminan los intrones y se unen los exones. Comúnmente se le conoce como corte y empalme.

Splicing alternativo: proceso en el que un gen puede generar diversas isoformas de ARNm debido al diferente orden en que se pueden unir los exones.

Bibliografía

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91-95.
- Anand, G. & Kapoor, R. (2020). Nested PCR assay for specific and sensitive detection of *Alternaria carthami*. *Archives of Microbiology*, 202, 171-179.
- Apte, A. & Daniel, S. (2009). PCR Primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 1-10.
- Ashmawy, N. A. (2015). Detection and molecular characterization of some Egyptian isolates of *Ralstonia solanacearum* by nested-PCR and PCR-RFLP analyses. *Plant Pathology Journal*, 14(4), 168-174.
- Bertioli, D. (2000). Rapid Amplification of cDNA Ends. En *The Nucleic Acid Protocols Handbook* (pp. 613-617). Totowa, NJ: Humana Press.
- Bi, X., Hieno, A., Otsubo, K., Kageyama, K., Liu, G. & Li, M. (2019). A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China. *Journal of General Plant Pathology*, 85, 12-22.
- Campbell, S. A. & Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 137, 61-74.
- Carr, K. (1993). Nobel rewards two laboratory revolutions. *Nature*, 365, 685.
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H. & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35, 1541-1549.
- Datukishvili, N., Kutateladze, T., Gabriadze, I., Bitskinashvili, K. & Vishnepolsky, B. (2015). New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organism in foods. *Frontiers in Microbiology*, 6, 757-765.
- Deepa, N., Adkar-Purushothama, C. R. & Sreenivasa, M. Y. (2016). Nested PCR method for early detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* un pure cultures, cereal simples and plant parts. *Food Biotechnology*, 30(1), 18-29.
- Díaz, A., Taberner, A. & Vilaplana, L. (2020). The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67, 225-239.

- Erlich, H. A., Gelfand, D. & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252, 1643-1651.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2, 175-178.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Léger, P. & Petit, R. J. (2011). Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 578-585.
- Hahim, I., Borth, W., Melzer, M. J. & Hu, J. (2018). Ultra-sensitive detection of papaya ringspot virus using single-tube nested PCR. *Acta virológica*, 62, 379-385.
- Hernández-Camacho, S., Pérez-Molphe-Balch, E., Alpuche-Solís, A. G. & Morales-Domínguez, J. F. (2017). Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 86, 151-162.
- Ingham, D. J., Beer, S., Money, S. & Hansen, G. (2001). Quantitative Real-Time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques*, 31(1), 132-140.
- Jamal, A., Shahid, M. N., Aftab, B., Zahur, M., Rashid, B., Johargy, A. K. & Husnain, T. (2019). Generation and analysis of expressed sequence tags from root cDNA library of cotton (*Gossypium arboreum*). *Pakistan Journal of Botany*, 51(4), 1303-1310.
- Kageyana, K., Komatsu, T. & Suga, H. (2003). Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology*, 69, 153-160.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O. & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: an *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109, 312-319.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2), 341-361.
- Korbie, D. J. & Mattick, J., S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456.
- Kozera, B. & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406.

- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. & Kinard, G. (2008). A reliable and inexpensive method of a nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3998.
- Marquez, Y., Brown, J. W., Simpson, C., Barta, A. & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, 22(6), 1184-1195.
- Mayo, S., Cominelli, E., Sparvoli, F., González-López, O., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, S. & Casquero, P. A. (2016). Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum* - *Rhizoctonia solani* interaction. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1109.
- Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Ochoa-Alfaro, A. E., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M. B., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velazquez, C. L., Gómez-Anduro, G. & Jiménez-Bremont, J. F. (2012). Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*, 235, 565-578.
- Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. & Day, M. J. (2004). Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*, 286, 203-217.
- Raza, A., Mehmood, S. S., Ashraf, F. & Ahmad-Khan, R. S. (2018). Genetic diversity analysis of *Brassica* species using PCR-based SSR markers. *Gesunde Pflanzen*, 71, 1-7.
- Ren, Y., Li, Z., He, Z., Wu, L., Bai, B., Lan, C., Wang, C., Zhou, G., Zhu, H. & Xia, X. (2012). QTL mapping of adult-plant resistances to strip rust and leaf rust in Chinese wheat cultivar Bainong 64. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 1253-1262.
- Rydzak, P., Ochoa-Corona, F. M., Whitfield, A. E. & Wayadande, A. C. (2020). Combining multiplex PCR and high-resolution melting for the detection and discrimination of arthropod transmitted viruses of cereals. *Journal of Virological Methods*, 278, 113823.

- Sibarani, S. M., Joko, T. & Subandiyah, S. (2019). Detection and identification of Banana-associated phytoplasma using nested-PCR method. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 23(1), 148-155.
- Sint, D., Raso, L. & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 898-905.
- Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. & Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164, 49-53.
- Stimbeck, G. R. (2017). Hiding in plain sight: the F segment and other conserved features of seed plant SK_n dehydrins. *Plant*, 245(5), 1061-1066.
- TerMaat, J. R., Pienaar, E., Whitney, S. E., Mamedov, T. G. & Subramanian, A. (2009). Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 295-300.
- Valle-Rodríguez, C. M., Valdés-Rodríguez, S., Vasco-Méndez, N. L., Garcidueñas-Piña, C., Soria-Guerra, R. E. & Morales-Domínguez, J. F. (2017). Evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia de un péptido natriurético de plantas en ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton*, 86, 143-150.
- Van Orsouw, N. J., Li, D., Van der Vlies, P., Scheffer, H., Eng, C., Buys, C. H., Li, F. P. & Vijg, J. (1996). Mutational scanning of large genes by extensive PCR multiplexing and two-dimensional electrophoresis: application to the *RB1* gene. *Human Molecular Genetics*, 5(6), 755-761.
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. & Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Berlin: Springer.
- Xia, N., Zhang, G., Sun, Y. F., Zhu, L., Xu, L. S., Chen, X. M., Liu, B., Yu, Y. T., Wang, X. J., Huang, L. L. & Kang, Z. S. (2010). *TaNAC8*, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), 394-402.
- Xu, F., Feng, S., Wu, R. & Du, F. K. (2012). Two highly validated SSR multiplexes (8-plex) for Euphrates' poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae). *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 144-153.
- Yadav, S. K. U., Singh, J., Padmanaban, B. & Kumar, L. S. (2017). Genetic variability in Indian populations of banana corn weevil [*Cosmopolites sordidus*

- (Coleoptera: Curculionidae)] assessed by RAPDs and AFLPs. *International Journal of Tropical Insect Science*, 37(3), 149-162.
- Yang, A. & Juzwik, J. (2017). Use of Nested and Real-Time PCR for the detection of *Ceratocystis fagacearum* in the Sapwood of diseased Oak species in Minnesota. *Plant Disease*, 101, 480-486.
- Yang, X., Hameed, U., Zhang, A. F., Zang, H. Y., Gu, C. Y., Chen, Y. & Xu, Y. L. (2017). Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. *Scientific Reports*. 7(40954).
- Zhang, M., Mo, H., Sun, W., Guo, Y. & Li, J. (2016). Systematic isolation and characterization of cadmium tolerant genes in tobacco: A cDNA library construction and screening approach. *PloS one*, 11(8), 1-22.
- Zhu, W., Zhang, D., Lu, X., Zhang, L., Yu, Z., Lv, H. & Zhang, H. (2014). Characterisation of an SKn-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 664-678.

Capítulo 9

Péptidos antimicrobianos de plantas

Jesús Josafath Quezada Rivera
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Juárez del Estado de Durango

Mariana Georgina Muñoz Carrillo
José Francisco Morales Domínguez
Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Resumen

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) forman parte importante del sistema inmunitario innato de todos los seres vivos. Son antibióticos de origen peptídico y constituyen la primera línea de defensa del organismo. En plantas estos compuestos se sintetizan para resistir el estrés causado por el ataque de algún depredador o patógeno y suelen ser efectivos en la inhibición de agentes potencialmente dañinos. Esta característica los ha vuelto atractivos para ser utilizados como una alternativa a los antibióticos convencionales ya que difícilmente los patógenos muestran resistencia hacia estos compuestos. No obstante, el aislamiento a partir de fuentes naturales es un proceso laborioso y lento, por lo que se suele realizar la síntesis química que, aunque muy eficiente, es un proceso complejo y costoso. Por

lo que tampoco es una vía ideal para la producción de péptidos a gran escala. Una opción viable es la tecnología del DNA recombinante que comparada con la síntesis química resulta ser escalable, accesible y con la capacidad de producir PAMs efectivos. Dentro de las plataformas de expresión de estos péptidos podemos mencionar *Escherichia coli*, levaduras como *Pichia pastoris* y una gran diversidad de plantas como *Nicotiana tabacum*. Esta tecnología hace posible la obtención de PAMs efectivos y a gran escala.

Introducción

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son componentes indispensables de los mecanismos de defensa innatos de los seres vivos. Son la primera línea de defensa constitutiva inducida por una infección de agentes nocivos, deteniendo a la mayoría de las infecciones antes de que causen algún daño celular o síntoma. Estructuralmente los PAMs son oligopéptidos de entre 2 a 9 kDa, con una longitud de 10-50 residuos de aminoácidos. Presentan una estructura helicoidal de naturaleza catiónica y anfipática o hidrofóbica, lo que facilita la interacción inicial con la membrana bacteriana que está cargada negativamente, dañándola y provocando la muerte celular, además estos péptidos muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos, virus y parásitos eucariotas.

Hasta la fecha, más de 5,000 PAMs han sido descubiertos o sintetizados. Tanto procariontes como eucariotas pueden sintetizar PAMs de manera natural. A diferencia de los antibióticos convencionales, que en general, se dirigen hacia una enzima y pueden selectivamente inducir resistencia, los PAMs inhiben microorganismos principalmente por mecanismos de formación de poros dirigidos a la membrana, un mecanismo que es inherentemente más difícil para que estos desarrollen algún tipo de resistencia.

PAMs reportados en plantas

Las plantas son seres vivos inmóviles que al igual que otros organismos son vulnerables a infecciones microbianas. Estas han evolucionado y desarrollado eficaces sistemas de defensa contra patógenos. Estas medidas de defensa

incluyen barreras físicas contra su penetración y propagación, como capas cerosas de cutículas y tricomas, y barreras químicas para inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos, como sistemas complejos de reconocimiento celular, redes intrincadas de fitohormonas, innumerables vías transcripcionales, diversas proteínas y metabolitos secundarios. Entre las moléculas de defensa de las plantas, los PAMs son una de las barreras químicas más comunes que las plantas han desarrollado para resistir el estrés biótico. La síntesis de PAMs ocurre a nivel sistémico en casi todas las partes de una planta durante cualquier etapa de su vida. Por ejemplo, las semillas de la planta de rábano producen continuamente PAMs pertenecientes a la familia de las defensinas. Durante la germinación de estas semillas, la producción de defensinas aumenta significativamente para ayudar a proteger las plántulas contra los patógenos.

Estos PAMs han sido el foco de interés en investigación para comprender su relación e interacción con patógenos de plantas, patógenos del deterioro de alimentos e incluso la salud humana. Patógenos importantes como *Pythium graminicola*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* y *Aspergillus niger* son organismos con capacidad de afectar cultivos, pero que han sido inhibidos con éxito por los PAMs sintetizados y extraídos del arroz, tubérculos de papa, amaranto, chicharos, etc. Por su parte el péptido de tionina producido por *Arabidopsis thaliana* es efectivo inhibidor contra los patógenos comunes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Mientras que el péptido clasificado como ciclotido sintetizado por la planta *Viola odorata* es efectivo contra *Klebsiella pneumoniae*. Se ha reportado el aislamiento de un buen número de PAMs sintetizados por plantas, los cuales se enlistan en la tabla 9.1.

Tabla 9.1. Péptidos antimicrobianos de origen vegetal

Fuente	Nombre	Tipo	Características	Actividad
<i>Raphanus sativus</i>	Rs-AFP1	Defensina	Péptidos altamente básicos, ricos en residuos de cisteína; pesos moleculares de 5 kDa; Contienen carga neta de +4 y +6, respectivamente. Motivo $\alpha\beta$ estabilizado con cisteína típico de las defensinas vegetales	Antifúngico (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>)
	Rs-AFP2			
<i>Medicago sativa</i>	MsDef1	Defensina	Una región conservada de dos hebras beta antiparalelas con un bucle interpuesto que contiene una carga catiónica. La carga neta para MsDef1 es +3 y +6 para MtDef4	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)
	MtDef4			
<i>Impatiens balsamina</i>	IbAMP1	Defensina	Péptido altamente básico. Contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro intramoleculares. Contiene una carga neta de +5	Antibacteriano (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
<i>Vigna unguiculata</i>	Cp-thionin II	Defensina	La conformación se estabiliza mediante cuatro enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Contiene una carga neta de +8	Antifúngico (<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium expansum</i>)
<i>Tulipa gesneriana</i>	Tu-AMP 1	Tionina	Péptido rico en cisteína y aminoácidos básicos (arginina y lisina). Péptido monocatenario que contiene cuatro enlaces disulfuro	Antimicrobiano (<i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Curtobacterium flaccumfacien</i>)
	Tu-AMP 2	Tionina	Péptido rico en cisteína y aminoácidos básicos (arginina y lisina). Péptido con una estructura única; es un heterodímero con cadena α y β	
<i>Triticum aestivum</i>	β -Purotionina de trigo	Tionina	Péptido que contiene 8 cisteínas y 10 residuos básicos. 4 enlaces disulfuro están presentes	Antibacterial (<i>Corynebacterium michiganense</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tionina 2.4	Tionina	Un péptido de 5 kDa con 3 enlaces disulfuro presentes en su secuencia. Contiene una carga neta de +1	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)

Fuente	Nombre	Tipo	Características	Actividad
<i>Medicago sativa</i>	MsSN1	Snakina	MsSN1 contiene 12 residuos de cisteína con una región conservada al extremo C-terminal	Antifúngico (<i>Phytophthora medicaginis</i>)
<i>Ziziphus jujuba</i>	Snakin-Z	Snakina	Un péptido conformado por 31 aminoácidos con un peso molecular de 3.318 kDa	Antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>Viola odorata</i>	Cycloviolacin O2	Ciclotido	Los péptidos consisten en una columna vertebral circular y 3 puentes disulfuro que están dispuestos en forma de nudo. Los péptidos contienen una carga neta de +2	Antibacteriano (<i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>)
<i>Mirabilis jalapa</i>	Mj-AMP1	Knotina	Los péptidos son muy básicos y contienen 3 puentes disulfuro dentro de sus estructuras. Ambos péptidos contienen una carga neta de +3	Antifúngico (<i>F. oxysporum</i>)
<i>Euonymus europaeus</i>	Ee-CBP	Tipo Hevein	El péptido contiene 5 puentes disulfuro (unidos por 10 residuos de cisteína presentes en su estructura) y una carga neta de +5	Antifúngico (<i>F. culmorum</i> y <i>Alternaria brassicicola</i>)
<i>Stellaria media</i>	SmAMP3	Tipo Hevein	Un péptido básico y rico en cisteína que contiene una carga neta de +2 y 3 puentes disulfuro en su estructura	Antifúngico (<i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium solani</i>)
<i>Helianthus annuus</i>	Ha-AP10	Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	Un péptido básico de 10 kDa que contiene 4 puentes disulfuro	Antifúngico (<i>Fusarium solani</i>)
<i>Capsicum annuum</i>	Ca-LTP1	Proteína de transferencia de lípidos (LTP)	Un péptido de 9 kDa con 4 α -hélices dentro de su estructura	Antifúngico (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)
<i>Passiflora edulis</i>	Pe-AFP1	2S albumin	El péptido consta de 2 enlaces disulfuro en su secuencia formada por 2 residuos de cisteína conservados	Antifúngico (<i>F. oxysporum</i>)
<i>Malva parviflora</i>	CW-1	2S albumin	Un péptido de 15 aminoácidos con un peso molecular de 1,783 kDa	Antifúngico (<i>Fusarium graminearum</i>)

Clasificación de PAMs

La gran diversidad de PAMs sintetizados o producidos de forma natural dificulta su clasificación. Por lo que se suelen clasificar según: 1) la maquinaria biosintética productora, 2) la fuente biológica que los produce, 3) su actividad inhibitoria, 4) sus características estructurales, 5) sus especies ricas en aminoácidos y según 6) sus objetivos moleculares (Fig. 9.1).

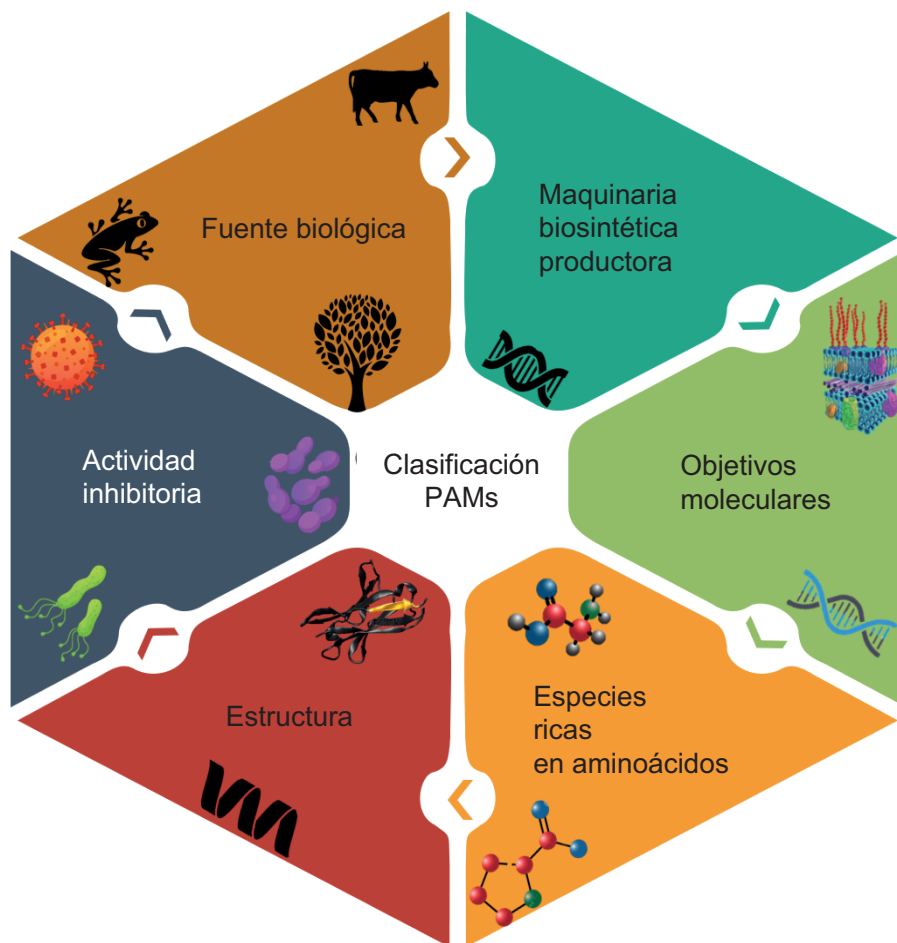


Figura 9.1. Clasificación de péptidos antimicrobianos.

Clasificación según la maquinaria biosintética productora

La gran mayoría de los PAMs son codificados por genes y algunos otros son sintetizados por sistemas enzimáticos múltiples, por ejemplo, algunos PAMs son liberados tras la proteólisis de la glicoproteína lactoferrina por medio de diversas enzimas proteolíticas.

Clasificación según la fuente de producción

De acuerdo a lo reportado en la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos (APD3) las fuentes de PAMs pueden ser divididas en mamíferos, plantas, anfibios, insectos y microorganismos.

PAMs derivados de mamíferos

En mamíferos, los PAMs se encuentran principalmente dentro de gránulos de los neutrófilos y en las secreciones de las células epiteliales que cubren la piel y las superficies mucosas. Generalmente, los PAMs se codifican en grupos en el genoma y se expresan conjuntamente, lo que da como resultado que se acumulen múltiples péptidos en un solo sitio. Un buen número de PAMs se producen como precursores inactivos que requieren escisión proteolítica para volverse activos por lo que su regulación no solo depende de su propia expresión, sino también de la abundancia de proteasas apropiadas. La mayoría de PAMs de mamíferos se han reportado en humanos, ovejas, vacas y otros vertebrados. Las defensinas y las catelicidinas son las principales familias de PAMs en mamíferos. Las defensinas se pueden dividir en α -, β - y θ -defensinas según la posición de los enlaces disulfuro. Los péptidos de defensa del huésped humano (PDH) pueden proteger a los humanos de infecciones microbianas, sin embargo, la expresión o producción de estos se realiza de forma diferencial de acuerdo a la etapa del crecimiento humano. Por ejemplo, la catelicidina LL-37, generalmente se detecta en la piel de los recién nacidos, mientras que la beta-defensina 2 humana (hBD-2) generalmente se expresa en los ancianos. Los PDH se pueden identificar en varias partes del cuerpo, como la piel, ojos, oídos, boca, vías respiratorias, pulmones, intestino y la uretra. Destacar que los PAMs encontrados en la leche materna humana también juegan un papel importante en la lactancia porque pueden disminuir la morbilidad y mortalidad

de los lactantes. Además de la actividad antimicrobiana, las PDH (catelicidinas y defensinas), también afectan la regulación inmunitaria, la apoptosis y la cicatrización de heridas.

PAMs derivados de plantas

Se han reportado PAMs de plantas a partir de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de una amplia variedad de especies. Dichos péptidos han demostrado actividades contra fitopatógenos, así como contra organismos patógenos para humanos, virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y células neoplásicas. El repertorio de PAMs sintetizados por las plantas es extremadamente grande con cientos de péptidos diferentes en algunas especies de plantas. En este grupo biológico la mayoría de los PAMs son ricos en cisteína (Cys), una característica que permite la formación de múltiples enlaces disulfuro (generalmente de dos a seis) que contribuyen a una estructura compacta y resistencia a la degradación química y proteolítica. Los PAMs se dividen en familias en función de su similitud de secuencia, motivos Cys y patrones distintivos de enlaces disulfuro que, a su vez, determinan el plegamiento de su estructura terciaria. Las principales familias de PAMs comprenden defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, ciclótidos, snakinas y proteínas tipo heveína, según la homología de secuencia de aminoácidos.

PAMs derivados de anfibios

Las ranas son la principal fuente de PAMs de anfibios y la magainina es el péptido más famoso ya que las secreciones cutáneas de las ranas de los géneros *Xenopus*, *Silurana*, *Hymenochirus* y *Pseudhymenochirus* de la familia Pipidae son ricas en PAMs. Al igual que en los mamíferos, estos péptidos juegan un papel importante en la protección de los anfibios de los patógenos que han disminuido la población mundial de anfibios.

PAMs derivados de insectos

En insectos los PAMs se sintetizan principalmente en los cuerpos grasos y las células sanguíneas, esta característica es una de las principales razones por las que este grupo biológico tiene una gran adaptabilidad para sobrevivir. La Cecropina es la familia más importante de PAMs de insectos, y se puede encontrar en gusanos de seda, abejas, *Drosophila*, etc. La síntesis de PAMs varía mucho entre las especies, por ejemplo, la mariquita (*Harmonia axyridis*) y la mosca soldado (*Hermetia illucens*) tienen hasta 50 PAMs, mientras que el pulgón del guisante (*Acyrtosiphon pisum*) carece de estos péptidos. El péptido jeleina derivado de la jalea real de abejas muestra efectos promisorios contra bacterias y hongos y conjugado con ácido láurico tiene el potencial de inhibir al protozoario parásito *Leishmania major*.

PAMs derivados de microorganismos

Todos los organismos vivos sin excepción producen PAMs, incluso los considerados como patógenos (bacterias y hongos). Los PAMs sintetizados por bacterias se denominan bacteriocinas y son péptidos sintetizados ribosomalmente de tamaño pequeño (30-60 aminoácidos), de naturaleza catiónica, termo estables (100 °C por 10 min), activos y altamente específicos contra bacterias muy relacionadas al organismo productor (espectro estrecho) o contra bacterias de otro género (amplio espectro). Las bacterias productoras de PAMs son inmunes a sus propias bacteriocinas, debido a la síntesis de proteínas de inmunidad específica. El grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) es uno de los principales productores de bacteriocinas y de los más estudiados debido a que la mayoría de estas bacterias son aisladas de fuentes alimentarias, por lo que se consideran como bacterias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, Generally Recognized As Safe).

Clasificación según su actividad inhibitoria

PAMs antivirales

Los PAMs antivirales neutralizan los virus al integrarse a la envoltura viral o a la membrana de la célula hospedera causando su inestabilidad, lo que propicia que los virus no puedan infectar las células del huésped. También pueden reducir la unión de virus a las células huésped. Por ejemplo, las defensinas se unen a las glicoproteínas virales haciendo que los virus del herpes simple (VHS) no puedan unirse a la superficie de las células del huésped. Además de la interrupción de las envolturas virales y el bloqueo de los receptores virales, algunos PAMs pueden evitar que las partículas virales ingresen a las células hospedadoras al ocupar receptores específicos en células de mamíferos.

PAMs antibacterianos

Los péptidos antibacterianos son los PAMs más estudiados hasta la fecha y la mayoría de ellos son catiónicos, dirigiéndose a la membrana celular bacteriana provocando la desintegración de la estructura de la bicapa lipídica. La mayoría de estos péptidos son anfipáticos con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que les proporciona la capacidad de unirse a los componentes lipídicos (región hidrofóbica) y a los grupos de fosfolípidos (región hidrófila). De forma interesante, se ha demostrado que algunos PAMs a bajas concentraciones pueden eliminar bacterias sin cambiar la integridad de las membranas, gracias a la inhibición de algunas vías importantes dentro de la célula como la replicación del DNA y la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la buforina II puede difundirse en las células y unirse al DNA o RNA sin dañar la membrana celular.

PAMs antifúngicos

Al igual que los PAMs antibacterianos, los péptidos antifúngicos pueden matar hongos al dirigirse a la pared celular o a los componentes intracelulares. Sin embargo, la membrana celular bacteriana y la pared celular de hongos tienen diferentes contenidos. La quitina es uno de los principales componentes de las paredes celulares de los hongos y algunos de los péptidos antifúngicos son capaces de unirse a la quitina. Tal capacidad de unión ayuda a los PAMs a

atacar las células fúngicas de manera eficiente. Los PAMs dirigidos a la pared celular matan a las células diana debido a una alteración de la integridad de las membranas fúngicas, al aumento de la permeabilización de la membrana plasmática o a la formación de poros directamente. Aunque la mayoría de los PAMs antifúngicos contienen aminoácidos polares y neutros en sus estructuras, no parece haber una correlación clara entre la estructura del PAM y el tipo de células a eliminar.

PAMs antiparasitarios

Los PAMs antiparasitarios son un grupo más pequeño en comparación con las otras tres clases de PAMs. Aunque algunos microorganismos parásitos son multicelulares, el modo de acción de los péptidos antiparasitarios es el mismo que el de otros PAMs, ya que matan a las células al interactuar directamente con la membrana celular. Ejemplos de este tipo de péptidos es la magainina, que puede matar a *Paramecium caudatum*, la catelicidina capaz de matar a *Caenorhabditis elegans* formando poros en la membrana celular, la cecropina sintética eficaz contra el parásito *Leishmania*.

Clasificación según la estructura tridimensional

Con base en este criterio los PAMs se clasifican en 4 familias: α , β , $\alpha\beta$ y no $\alpha\beta$ (Figura 9.2 a-d) de acuerdo a los tipos de estructuras tridimensionales que presentan. La familia α consiste de PAMs con estructuras helicoidales (por ejemplo, magaininas y LL-37). La familia β está compuesta por PAMs con estructuras de cadenas β (por ejemplo, alfa defensinas humanas). Por su parte la familia $\alpha\beta$ comprende las estructuras tridimensionales antes mencionadas (helicoidales y β plegadas), unos ejemplos de esta familia son las beta defensinas. La familia no $\alpha\beta$ (no alfa beta) no contiene cadenas helicoidales ni beta (por ejemplo, la indolicidina).

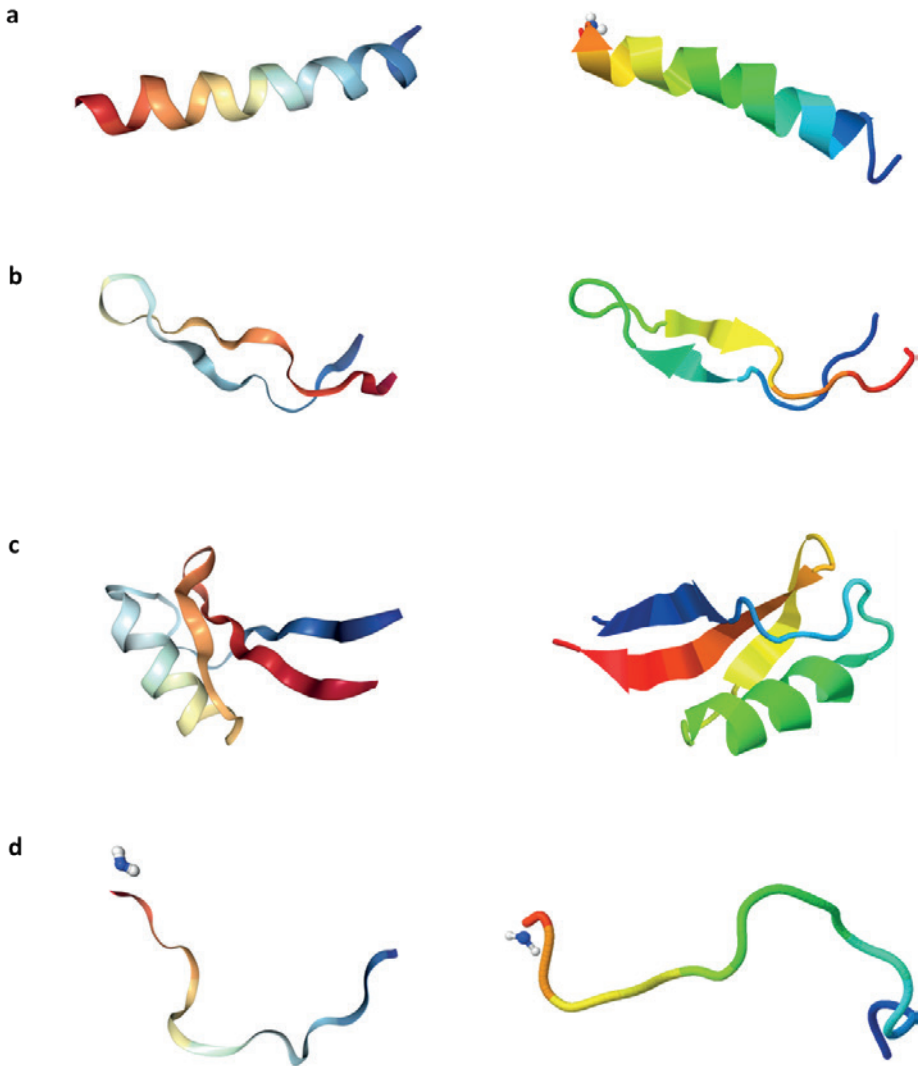


Figura 9.2. Estructuras tridimensionales de PAMs representativos de cada familia.

a) Familia α . Magainina 2 de la rana *Xenopus laevis* (Acceso PDB: 2MAG). b) Familia β . Lactoferricina B del bovino *Bos taurus* (Acceso PDB: 1LFC). c) Familia $\alpha\beta$. Defensina vegetal Psd1 de *Pisum sativum* (Acceso PDB: 1JKZ). d) Familia no $\alpha\beta$. Indolicidina bovina de *Bos taurus* (Acceso PDB: 1G89).

Clasificación según sus objetivos moleculares

Los PAMs pueden clasificarse ampliamente en dos familias: péptidos cuyo objetivo es la superficie celular (por ejemplo, nisinas y temporinas) y péptidos con objetivos intracelulares (como péptidos ricos en Prolina). Los péptidos dirigidos a la superficie celular incluyen tanto péptidos dirigidos a membrana como no dirigidos a membrana y pueden incluso subdividirse más según los objetivos específicos como pared celular/ carbohidratos, lípidos / membranas y proteínas / receptores. Del mismo modo, los PAMs con objetivos intracelulares pueden clasificarse adicionalmente con base a las moléculas diana específicas, por ejemplo, proteínas, DNA y RNA.

Mecanismos de acción de PAMs

La capacidad de los PAMs para eliminar bacterias generalmente depende de su capacidad para interactuar con las membranas bacterianas o las paredes celulares. Generalmente, los PAMs muestran una carga neta positiva y una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, lo que les permite unirse selectivamente a las membranas bacterianas cargadas negativamente. La unión de los PAMs a la membrana bacteriana conduce a una alteración no enzimática. La selectividad para especies específicas se debe a diferencias en la composición de la membrana de diferentes microbios y tipos de células.

PAMs dirigidos a membrana celular

Los mecanismos dirigidos a la membrana se pueden describir a través de los modelos de poste y alfombra, y el modelo de poste se puede dividir en modelos de poro toroidal y de duela de barril (Fig. 9.3).

Modelo de poro toroidal

El modelo de poro toroidal también se conoce como modelo de agujero de gusano. En este modelo, los PAMs incrustados verticalmente en la membrana celular se acumulan y luego se doblan para formar un agujero anular con un

diámetro de 1 a 2 nm. Los ejemplos típicos de este modelo son magainin 2, lacticin Q y arenicin.

Modelo de duela de barril

Los péptidos antimicrobianos se agregan entre sí, penetran la bicapa de la membrana celular en forma de multímeros y forman canales que dan como resultado el flujo de salida citoplásmico. En casos severos, los PAMs pueden inducir el colapso de la membrana celular y provocar la muerte celular.

Modelo tipo alfombra

Los PAMs se disponen paralelos a la membrana celular. Su extremo hidrofílico se perfila hacia la solución y su extremo hidrofóbico hacia la bicapa de fosfolípidos. Los PAMs cubren la superficie de la membrana de manera similar a una alfombra y destruyen la membrana celular de una manera similar a un “detergente”. Sin embargo, este mecanismo de formación de poros requiere un cierto umbral de concentración y la concentración requerida de PAM es alta.

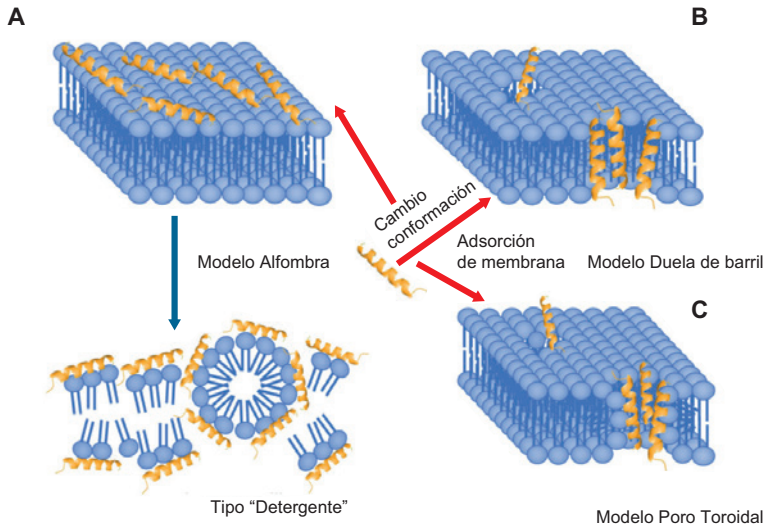


Figura 9.3. Modelos de mecanismos de acción para la actividad de PAMs a nivel extracelular. (A) Modelo de alfombra; (B) Modelo de duela de barril y (C) Modelo de poro toroidal.

Mecanismo de direccionamiento sin membrana

La forma en que los PAMs ingresan a las células es por penetración directa o endocitosis. Después de ingresar al citoplasma, los PAMs identificarán y actuarán sobre el objetivo. Según el objetivo, los PAMs se pueden dividir en las siguientes categorías.

Inhibición de la biosíntesis de proteínas

Los PAMs afectan la transcripción, traducción y ensamblaje en péptidos funcionales a través del plegamiento de chaperonas moleculares al interferir con enzimas relacionadas y moléculas efectoras. Por ejemplo, Bac7 1–35 se dirige a los ribosomas para inhibir la traducción de proteínas, mientras que Tur1A inhibe la síntesis de proteínas en *E. coli* y *Thermus thermophilus* al inhibir la transición de la fase inicial a la fase de extensión.

Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos

Los PAMs pueden afectar enzimas clave o inducir la degradación de moléculas que participan en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. La indolicidina, un PAM catiónico rico en triptófano (Trp) con 13 aminoácidos, se dirige específicamente al sitio básico del DNA, sitio importante de entrecruzamiento del DNA de una o dos cadenas y también puede inhibir la topoisomerasa I del DNA.

Inhibición de la actividad de proteasas

Muchos PAMs pueden inhibir varias actividades metabólicas al inhibir la actividad de proteasas. Un ejemplo es la histatina 5 que tiene un fuerte efecto inhibidor sobre las proteasas secretadas por el huésped y las bacterias. Los PAMs eNAP-2 e indolicidina inhiben las serin proteasas microbianas, la elastasa y la quimotripsina. La catelicidina-BF es un péptido aislado del veneno de *Bungarus fasciatus* que puede inhibir eficazmente la agregación plaquetaria inducida por trombina y bloquear aún más el receptor 4 activado por proteasas.

Inhibición de la división celular

Algunos PAMs impiden la división celular al inhibir la replicación del DNA y la respuesta al daño del DNA (respuesta SOS), ya sea bloqueando el ciclo celular o provocando la falla de la separación cromosómica. Por ejemplo, el péptido APP es un PAM con 20 residuos de aminoácidos, que puede eliminar de manera eficiente a *Candida albicans* debido a su eficiencia de penetración celular, fuerte afinidad de unión al DNA y capacidad para inducir la detención de la fase "S" en el entorno intracelular. Por otra parte, el péptido MciZ, contiene 40 residuos y es un inhibidor eficaz de la división celular bacteriana, la formación del anillo Z y la localización.

Tecnología del DNA recombinante para la producción de PAMs

Como se mencionó, los PAMs son antibióticos peptídicos endógenos que forman parte importante del sistema inmunitario innato de los seres vivos, y tienen dos propiedades atractivas. La primera es que poseen una amplia gama de actividades antimicrobianas, y la segunda, es que se dirigen principalmente a las membranas microbianas, lo que impide la capacidad de los microbios para desarrollar resistencia contra ellas. Estas dos propiedades las posiciona como candidatos prometedores para nuevos antibióticos. Sin embargo, se deben abordar una serie de cuestiones fundamentales, como los mecanismos, la eficacia y la seguridad, antes de que los péptidos puedan pasar a una etapa de ensayos clínicos. Responder a estas preguntas requiere rigurosos estudios funcionales y estructurales, cuyo éxito depende en gran parte de la disponibilidad de péptidos puros. No obstante, el aislamiento a partir de fuentes naturales es un proceso laborioso y lento, y por lo tanto no proporciona un método eficaz para obtener péptidos en grandes cantidades. La síntesis química, aunque muy eficiente, es un proceso complejo y costoso. Por lo tanto, tampoco es una vía ideal para la producción de péptidos a gran escala.

Afortunadamente, la tecnología del DNA recombinante proporciona un medio económico para la producción de proteínas, péptidos o enzimas. En comparación con la síntesis química, la expresión recombinante es escalable, barata y puede producir PAMs más grandes que contienen más de 30 aminoácidos. Esta tecnología muestra ventajas no solo en cuanto a tiempo reducido y

protocolos bien establecidos, sino también costos de producción reducidos y fácil ampliación. Los genes que expresan la proteína/péptido diana se clonan en vectores específicos para su producción en sistemas de expresión en células huésped. Las bacterias y las levaduras son los sistemas huésped más utilizados para la expresión de productos recombinantes. También en el caso de los PAMs, se ha informado que estos dos huéspedes de expresión producen más del 95 % de los PAMs expresados heterológamente. A continuación, se mencionan algunos de estos huéspedes utilizados para la producción de PAMs por vía recombinante.

Sistemas de expresión procariota (*Escherichia coli*)

E. coli es el huésped más utilizado para la producción de PAMs, particularmente la cepa *E. coli* BL21 (DE3), ha sido la más utilizada. La elección de *E. coli* como hospedero ideal se atribuye a su rápida tasa de crecimiento, a la obtención de mayores rendimientos, a la existencia de protocolos de expresión bien establecidos, a la gran disponibilidad comercial de vectores de expresión y a su rentabilidad. Otros sistemas bacterianos como *Bacillus subtilis* también se han utilizado como huéspedes para la expresión de PAMs, pero no en la misma medida que *E. coli*. A pesar de que esta bacteria es la más utilizada como plataforma procariota tiene algunas complicaciones en la producción de PAMs, como lo es que la expresión de la proteína sea de potencial letalidad hacia la propia bacteria productora. Aunado a lo anterior, la gran mayoría de los PAMs tienen una carga catiónica y, por lo tanto, son susceptibles a la degradación por proteasas endógenas. Una estrategia que supera con eficacia ambos obstáculos es fusionar el péptido de interés con una proteína transportadora o proteína de fusión. Las proteínas fusionadas pueden enmascarar la actividad de los PAMs y, por lo tanto, reducir su toxicidad hacia el huésped y la protección de los PAMs de la posible escisión proteolítica. Estas proteínas de fusión también aumentan la solubilidad de los PAMs expresados y facilitan su recuperación y aislamiento. Sin embargo, esta estrategia conduce a niveles bajos de expresión de proteínas, del orden de 10 a 30 mg/L⁻¹ (proteínas de fusión) y de 1 a 5 mg/L⁻¹ (péptidos). Las proteínas de fusión más comunes que se han utilizado para expresar y purificar PAMs incluyen tiorredoxina, pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO), glutatión S-transferasa (GST), una proteína transportadora de carboxilo de biotina (BCCP), proteína fluo-

rescente verde (GFP), etc. Una vez producido el PAM de interés fusionado a la proteína transportadora el péptido diana puede liberarse de la fusión en una etapa posterior mediante escisión enzimática o química en el sitio correspondiente alrededor de la unión del péptido portador.

Sistemas de expresión eucariota

Pichia pastoris

Una alternativa viable al uso de células bacterianas como huéspedes para la expresión heteróloga de PAMs es el uso de levaduras para producir estos agentes, ya que estos organismos tienen la ventaja de ser resistentes a la destrucción mediada por PAMs. Las levaduras, células fúngicas eucarióticas y unicelulares, también se utilizan para la producción de proteínas recombinantes que no son bien plegadas en *E. coli* debido a problemas de plegamiento o a modificaciones postraduccionales que *E. coli* es incapaz de realizar. Particularmente la especie *Pichia pastoris*, puede secretar los péptidos al medio de manera eficiente para aumentar los títulos de proteína y eliminar posteriores procesos de purificación. Esta levadura tiene ventajas sobre los procariotas tradicionales y sistemas de expresión de mamíferos, dichas ventajas son: limita la secreción de proteínas de la célula huésped pero es capaz de secretar grandes cantidades de proteínas recombinantes heterólogas, lo que reduce significativamente la carga de la purificación posterior; su tasa de crecimiento es más rápida que la de los huéspedes mamíferos, como las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293); puede crecer fácilmente en medios económicos; posee un promotor inducible endógeno de alcohol oxidasa 1 (AOX1); produce cultivos libres de endotoxinas y virus por lo que se considera no toxigénico y no patógeno, por lo que Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha aprobado varios productos preparados con ayuda de este organismo, y estos productos son generalmente aceptados como sustancias seguras (GRAS).

Plantas

La expresión recombinante de PAMs en bacterias y levaduras se asocia con limitaciones como la potencial inhibición del crecimiento o muerte mediada por PAMs en el huésped, la inestabilidad del péptido, pero sobre todo por la incapacidad de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales correctas. Si bien el uso de proteínas de fusión, como se mencionó anteriormente, hasta cierto punto resuelven las limitaciones, no garantizan la correcta síntesis de las proteínas recombinantes producidas. Por su parte, las plataformas de expresión como las plantas también se han utilizado para la producción de PAMs en las últimas décadas.

La expresión de PAMs en plantas tiene una doble intención, por una parte, su actividad antimicrobiana ayuda en la protección de las plantas y, al mismo tiempo, satisface la demanda de nuevos agentes antimicrobianos en la industria biofarmacéutica. El proceso de utilizar plantas y cultivos de células vegetales como una plataforma de producción eficaz para proteínas recombinantes con importancia industrial o farmacéutica se denomina agricultura molecular. Los avances en ingeniería genética han permitido la creación de plantas transgénicas con la ayuda de diferentes técnicas de transformación como el bombardeo con micro proyectiles o biobalística, la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada con polietilenglicol etc. Se prefiere el uso de plantas superiores debido a los menores costos de producción involucrados; el fácil manejo y el potencial escalamiento; mayor seguridad en comparación con células bacterianas o de mamíferos, ya que el riesgo de contaminación durante los procesos de fabricación es bajo y no presentan amenazas graves para la bioseguridad; y una mayor estabilidad en comparación con los animales transgénicos. Además, las plantas superiores generalmente sintetizan proteínas con plegamiento correcto y modificaciones postraduccionales precisas, lo que conduce a productos biológicamente activos. Además, las nuevas proteínas recombinantes se acumulan fácilmente en los organelos de las células vegetales como el retículo endoplásmico, las vacuolas y los plastidios protegidos de la actividad de las proteasas. El tabaco (*Nicotiana sp.*) es una de las plataformas de producción basadas en hojas más exploradas para la expresión de proteínas recombinantes. Una ventaja importante del uso del tabaco como sistema de producción de plantas es el alto volumen de biomasa que se puede producir con solo unos pocos pasos

de procesamiento. También se dice que este sistema de expresión es muy susceptible a la manipulación genética, junto con protocolos de transformación y regeneración bien establecidos. También se han identificado otros sistemas de expresión entre vegetales (papa, tomate), frutas (cítricos, plátano) y cereales (arroz, trigo). Se han reportado la producción vía recombinante de numerosos PAMs en diversas plantas (Tabla 9.2).

Tabla 9.2. Algunos péptidos antimicrobianos producidos por vía recombinante en plantas

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	MSI-99 (Magainina)	Estable	Cloroplasto	No definido	Mayor resistencia a bacterias fitopatógenas (<i>Pseudomonas syringae</i>) y hongos (<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Fusarium moniliforme</i> ; <i>Verticillium dahlia</i>)
	MsrA2 (Dermaseptina)	Estable	Núcleo	6–7 µg/g PF	Resistencia a hongos fitopatógenos (<i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Esclerotinia sclerotiorum</i>), oomicetos (<i>Pythium aphanidermatum</i>) y bacterias (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)
	Retrociclina-101 (Defensina)	Estable	Cloroplasto	32–38% Proteína total soluble	Controlar infecciones virales (virus del mosaico del tabaco) y bacterianas (<i>Erwinia carotovora</i>)
	Protegrina-1 (Cathelicidina)	Estable	Cloroplasto	17–26% Proteína total soluble	Controlar infecciones bacterianas (<i>Erwinia carotovora</i>)
	Lactoferricin B (Lactoferrin)	Estable	Núcleo	No definido	Mayor tolerancia a enfermedades bacterianas patógenas (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>) y fúngicas (<i>Botrytis cinerea</i>)

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	SP1-1 (diseño <i>de novo</i>)	Transitoria	Núcleo	0.025 mg/g PF	Actividad antimicrobiana (<i>P. syringae</i> pv. <i>Syringae</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomate</i> ; <i>P. corrugate</i> ; <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>)
	Colicinas Recombinantes (Colicina)	Transitoria	Núcleo	0.6–3 mg/g PF	Control efectivo y amplio de cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> transmitidas por los alimentos
	PaeM4 (Pyocin)	Transitoria	Núcleo	800 µg/g PF	Amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	MsrA2 (Dermaseptina)	Estable	Núcleo	1–5 µg/g PF	Resistencia amplia y mejorada a hongos fitopatógenos virulentos (<i>Alternaria</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> ; <i>Verticillium</i> sp.) y bacterias (<i>Erwinia carotovora</i>)
	pro-SmAMP2 (Péptido tipo Heveina)	Estable	Núcleo	No definido	Protección de cultivos de papa resistente a <i>Alternaria</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Thi2.1 (Thionina)	Estable	Núcleo	No definido	Protección de cultivos (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ; <i>R. solanacearum</i> cepa Pss4)
	CecB (Cecropin)	Estable	Núcleo	0.001 µg/mg PF	Protección vegetal contra patógenos bacterianos (<i>Ralstonia solanacearum</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i>)
	Snakin-2 (Snakin)	Estable	Núcleo	No definido	Mayor resistencia a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
	LL-37 (Cathelicidina)	Estable	Núcleo	16.8–58.2 µg/mL Proteína total soluble	Actividad antibacteriana mejorada (<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>Carotovorum</i> (Pcc); <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i> (Xcv))

Planta huésped	Péptido antimicrobiano	Expresión Estable o transitoria	Organelo transformado	Nivel de expresión	Aplicación
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Mj-AMP2 (Knottina)	Estable	Núcleo	0.32–0.38% Proteína total	Mayor resistencia al patógeno fúngico (<i>Magnaporthe oryzae</i>)
	Dm-AMP1 (Defensina)	Estable	Núcleo	0.43–0.57% Proteína total soluble	Mayor resistencia a patógenos (<i>Magnaporthe oryzae</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>)
	rLF (Lactoferrina)	Estable	Núcleo	0,1% peso de salvado de arroz	Aditivo funcional para lechones destetados prematuramente
	Rs-AFP2 (Defensina)	Estable	Núcleo	0.45–0.53% Proteína total soluble	Mayor resistencia a patógenos fúngicos (<i>Magnaporthe oryzae</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>)
	Lactostatina (Péptido aniónico)	Estable	Núcleo	2 mg/g semilla seca	Fármaco anti hipercolesterolémico para uso clínico potencial
Lechuga (Lactuca sativa)	ChIFN-alpha (interferón- α)	Transitoria	Núcleo	0.393 μ g/kg PF	Actividad antiviral contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV)
Canola (<i>Brassica napus</i>)	PmAMP1 (Proteína rica en cisteína)	Estable	Núcleo	No definido	Resistencia efectiva contra patógenos fúngicos (<i>Alternaria brassicae</i> ; <i>Leptosphaeria maculans</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	SN-1 (Snakina)	Estable	Núcleo	No definido	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> y mayor resistencia a hongos (<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>)
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Thanatina (S) (thanatin sintética)	Estable	Núcleo	No definido	Resistencia adquirida a patógenos bacterianos (<i>Pseudomonas syringae pv. tomatate</i>) y patógenos fúngicos (<i>Botrytis cinerea</i> ; oidio) Actividad antibacteriana y antifúngica <i>in vitro</i>
Fruta cítrica (Carrizo <i>Citrango</i>)	D2A21 (Péptido sintético)	Estable	Núcleo	No definido	Reducción del desarrollo de la enfermedad del cancro causada por la bacteria (<i>Xanthomonas citri</i>)

Algunas estrategias para la predicción, diseño y producción de PAMs

Análisis bioinformático. ¿Cómo buscar PAMs candidatos?

Predicción in silico

Una estrategia para la identificación de PAMs dentro de secuencias proteicas previamente reportadas es mediante herramientas bioinformáticas. Generalmente estas predicciones bioinformáticas o *in silico* toman en cuenta parámetros como la similitud con otros péptidos previamente identificados, reportados y almacenados en bases de datos.

En el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se ha trabajado con la identificación *in silico* de varios péptidos con probable actividad antimicrobiana, las plataformas bioinformáticas resultan relevantes para la identificación de PAMs, además de considerarse como punto de partida para la modificación o diseño de genes sintéticos con actividad contra un amplio número de microorganismos.

Un ejemplo es la proteína de la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente (α NAC) de *Sorghum bicolor* que tiene múltiples funciones entre las que destaca la de proteger a los polipéptidos recién sintetizados y trasladarlos al retículo endoplásmico y mitocondrias, además de actuar como proteínas chaperonas.

Para la identificación *in silico* de PAMs en α NAC se utilizó la plataforma del Sistema de escaneo de secuencias antimicrobianas o AmpA por sus siglas en inglés (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) y la plataforma Anti Bacterial Peptides Server (AntiBP) (<http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/>). Se identificaron dos probables péptidos con acción antimicrobiana, no obstante, para corroborar esta actividad se analizaron en otras plataformas, en la Database of antimicrobial activity and structure of peptides (DBAASP) (<https://dbaasp.org/prediction>), en la Antimicrobial Peptide Scanner v1.2, y en la Collection of Anti-microbial Peptides (CAMPr3) (camp.bicnirrh.res.in).

Para determinar el grado presuntivo de actividad antimicrobiana se utiliza el modelo de árbol de decisión creado a partir del algoritmo j48 que se basa en propiedades fisicoquímicas descritas en otros péptidos antimicrobianos disponibles en bases de datos como Antimicrobial Peptide Database (APD).

Las predicciones de la actividad antimicrobiana de los dos péptidos fueron estimadas en la plataforma Database of antimicrobial activity and structure of peptides (DBAASP).

Los dos péptidos con presunta actividad antimicrobiana se muestran en la Figura 9.4; donde se muestra la secuencia de aminoácidos de α NAC y en color gris oscuro y gris claro señalados los PAMs. El péptido KSRKAMLKLGMP tiene una mayor probabilidad de ser funcional (Tabla 9.3), todo esto con base en la predicción de las plataformas las cuales basan su decisión en similitudes con otros PAMs. En alineamientos realizados en la plataforma APD3, dio como resultado que este péptido presenta una similitud del 43.75% con un péptido sintético denominado DP1, el cual se le ha atribuido actividad anticancerígena y con un péptido denominado Histone H6 – like protein el cual se le atribuye actividad contra bacterias Gram + y Gram –.

Por otra parte, resultan de gran la utilidad las plataformas predictivas de la capacidad antimicrobiana de péptidos, como la DBAASP, ya que según el análisis realizado en esta plataforma el péptido KSRKAMLKLGMP es funcional para inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis* y la lisis de eritrocitos humanos, mientras que SRVTVKKSKNMLFVI tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 9.4).

```
>XP_002445811.1 nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1
[Sorghum bicolor]
MTAQAAEELAAQIEQQKLEEQKTEAEVVVEDEDDDDDDDDKDDDELGDGHEGD
ASGKSKQSRSEKKSRKAMLKLGMPITGVSrvTVKKSKNMLFVISKPDVFKSPNSDTY
VIFGEAKIEDLSSQLQTQAAEQFKAPDLSQMISKPETSGLGQEDNEEEVDETGV EAKDI
ELVMTQATVSRKAVKALKASNGDIVTAIMELTN
```

Figura 9.4. Secuencia proteica en formato FASTA de α NAC de *S. bicolor* donde se resaltan los dos péptidos con potencial actividad antimicrobiana

Tabla 9.3. Predicción *in silico* de actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en α NAC de *Sorghum bicolor*

Péptido	DBAAS ¹	CAMPr3				AntiBP Server	Antimicrobial Peptide Scanner vr.2
		SVM ²	RFC ³	ANN ⁴	DAC ⁵		
KSRKAMLKLGMP	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
SRVTVKKSKNMLFVI	Sí	No	No	No	No	Sí	No

¹ Database of antimicrobial activity and structure of peptides

² Algoritmo máquinas de vectores de soporte (support vector machine)

³ Algoritmo de bosques aleatorios (random forest)

⁴ Algoritmo red neuronal artificial (artificial neuronal network)

⁵ Algoritmo de análisis discriminatorio (discriminant analysis)

Propiedades fisicoquímicas

Los parámetros fisicoquímicos de los péptidos identificados se calculan en plataformas como The Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) y ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

El grado de actividad se basa en las propiedades fisicoquímicas del péptido ya que a partir de ellas se puede predecir el modo de interacción con el microorganismo. De acuerdo a los resultados de la tabla 9.5, se puede concluir que ambos péptidos identificados en la proteína α NAC son de naturaleza catiónica. Generalmente todos los PAMs tienden a la carga positiva para la facilidad de interacción con los componentes negativos (fosfolípidos) de la membrana plasmática, el valor de la carga generalmente tiende a tener un valor de entre 2-9 a un pH de 7 por lo que se podría afirmar que el grado de cationicidad del péptido está estrechamente relacionado con la actividad antimicrobiana. El porcentaje de residuos hidrofóbicos en un péptido con actividad antimicrobiana se ha reportado que debe de ser mayor o igual al 30%, ambos cumplen con esta característica. Otro parámetro relevante es su peso molecular, se ha reportado que este tipo de péptidos se caracterizan por tener poca longitud y por lo tanto bajo peso molecular (menor a 10 kDa), sin embargo, la predicción del peso molecular de los péptidos predichos es mayor a los 10 kDa. En cuanto al punto isoeléctrico (pI), se define como el pH en el que la proteína/péptido tiene una carga neta cero y su valor es fundamental para la predicción de la solubilidad del péptido, entre

más parecido sea la pI del péptido al pH del solvente aumenta la tendencia a precipitarse y por lo tanto a la pérdida de su actividad biológica, los pI reportados para los péptidos con este tipo de actividad tiende a ser cercanos a 10, ambos péptidos identificados se acercan a este valor. El índice de Boman predice la facilidad de unión del péptido a la membrana o a otras proteínas, un valor alto indica la probabilidad de que el péptido sea multifuncional, que puede ejercer una amplia variedad de funciones dentro de la célula e interactuar con muchas proteínas. En cuanto al coeficiente de partición ($\log P$) es un indicador de hidrofobicidad, altos niveles de este parámetro indican baja solubilidad, en ambos péptidos tenemos presente valores negativos que indican una buena solubilidad. Con base en todos estos parámetros, se generaron algoritmos para predecir el grado de actividad antimicrobiana, por lo que el péptido KSRKAMLKLGMP podría tener una actividad media, mientras que el péptido SRVTVKKSKNMLFVI no tendría actividad antimicrobiana.

Modelado tridimensional de la estructura del péptido

La estructura tridimensional de los péptidos se obtuvo en la plataforma PEP-FOLD 3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>).

Los péptidos con actividad antimicrobiana generalmente se clasifican en cuatro grupos de acuerdo con su estructura secundaria: α , β , $\alpha\beta$, y $\text{ni-}\alpha\beta$. De acuerdo con el modelado tridimensional obtenido (Figura 9.5), el péptido de secuencia KSRKAMLKLGMP tiene una estructura terciaria de α -hélice, la cual es una estructura común dentro de los PAMs, mientras que el péptido de secuencia SRVTVKKSKNMLFVI entraría dentro de la familia β de los PAMs.

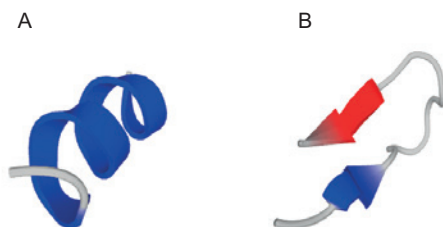


Figura 9.5. Modelado tridimensional de los péptidos con presunta actividad antimicrobiana identificados en la proteína α NAC en *S. bicolor*. A. Péptido 1: KSRKAMLKLGMP. B. Péptido 2: SRVTVKKSKNMLFVI.

Las plataformas bioinformáticas resultan relevantes para la identificación de PAMs, además de considerarse como punto de partida para la modificación o diseño de genes sintéticos con actividad contra un amplio número de microorganismos.

Tabla 9.4. Predicción *in silico* de actividad de los péptidos contra diversos microorganismos y células humanas

Proteína Péptido	SbaNAC	
	KSRKAMLKLGMPK	SRVTVKKSKNMLFVI
<i>Eritrocitos humanos</i>	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	-	-

+ péptido con actividad antimicrobiana

- péptido sin actividad antimicrobiana

Tabla 9.5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos identificados en α NAC de *Sorghum bicolor* a partir de sus características fisicoquímicas.

Proteína	Sb α NAC	
Péptido	SRVTVKKSKNMLFVI	KSRKAMLKLGMP
Formula Molecular	C79H141N21O20S1	C65H122N20O15S2
Peso Mol (Kda)	17.5	14.87
Hidrógeno	141	122
Oxígeno	20	15
Log P	-4.0	-5.1
pI	11.26	11.33
CARGA	+4	+5
Res. Hidrofóbicos	46	38
IB (kcal/mol)	1.35	1.78
Energía Drending (kJ/mol)	941.93	809.59
ASA_p	419.45	434.87
PA	Sin Actividad	Actividad Media

Log P: coeficiente de partición

pI: punto Isoeléctrico

IB: Índice Boman

ASA_P: área de superficie accesible al péptido

PA: Probable actividad

Protocolos

Protocolo 1. Diseño y producción de PAMs en E. coli; unión de amplicones a partir de PCR

De forma rutinaria se suelen diseñar oligonucleótidos que contengan sitios de restricción para amplificar fragmentos de DNA por PCR, posteriormente tanto el vector de destino como el amplicón obtenido se tratan con la enzima o enzimas de restricción para crear sitios complementarios homólogos que puedan ligarse fácilmente y obtener una "construcción", conformada por el plásmido o vector y el amplicón de interés.

A. Diseño de oligonucleótidos que incluyen sitios de restricción.

En el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se han diseñado oligonucleótidos a partir de la secuencia de la planta *Moringa oleifera* para la amplificación de 2 fragmentos que contenían PAMs de interés, como son el péptido FLO (actividad antibacteriana) y el péptido *Mo*-CBP₃ (actividad antifúngica). A los oligonucleótidos diseñados se les adicionó la secuencia correspondiente a sitios de restricción *Nco*I y *Hind*III para el caso del amplicón *Mo*-CBP₃ mientras que para FLO se añadieron los sitios *Hind*III y *Spe*I (Tabla 9.6) con la finalidad de realizar un empalme de ambos fragmentos por complementariedad de secuencias. Cada uno de los amplicones fueron clonados en el vector pGEM-T[®] Easy (Promega, Fitchburg, WI) obteniendo las construcciones *Mo*-CBP₃/pGEM y FLO/pGEM.

Tabla 9.6. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de *Mo*-CBP₃ y FLO.

Especie	Fuente proteína	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos	Referencia
<i>M. oleifera</i>	<i>Mo</i> -CBP ₃ P86528.1	<i>Nco</i> I 5' CCATGG CAGCGCTTCATCCGACGACAG 3' <i>Hind</i> III 5' AAGCTT AGCTCATTGGCCGACGGTTG 3'	289 pb	RPAIQRCQQQLRNQPRCR	Gifoni <i>et al.</i> , 2012
	FLO P24303.1	<i>Hind</i> III 5' AAGCTT TGCAGAAGCACCAACAATGG 3' <i>Spe</i> I 5' ACTAGT ACAAGCACCCATGATTTGGTA3'	210 pb	QGPGRQPDFQRCGQQLRNISPP QRCPSLRQAVQLTHQQGQVG PQQVRQMYRVASNIPST	Gassenschmidt <i>et al.</i> , 1995, Suarez <i>et al.</i> , 2003

B. Empalme de amplicones

Para lograr el empalme de ambos amplicones primero se liberó el fragmento FLO por medio de los sitios de restricción *Hind*III (adicionado a los primers) y *Sac*II (sitio del vector pGEM-T[®] Easy), a su vez la construcción *Mo*-CBP₃/pGEM fue linealizada con *Hind*III, ambos fragmentos fueron purificados utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, para luego ser ligados mediante la secuencia del sitio *Hind*III por complementariedad (Fig. 9.6). Para verificar tanto el empalme como el marco de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) se extrajo el DNA plasmídico de las clonas putativas y

fue secuenciado. Una vez corroborado el correcto empalme de ambos amplicones se liberó este fragmento para ser ligado al vector de expresión pET32.

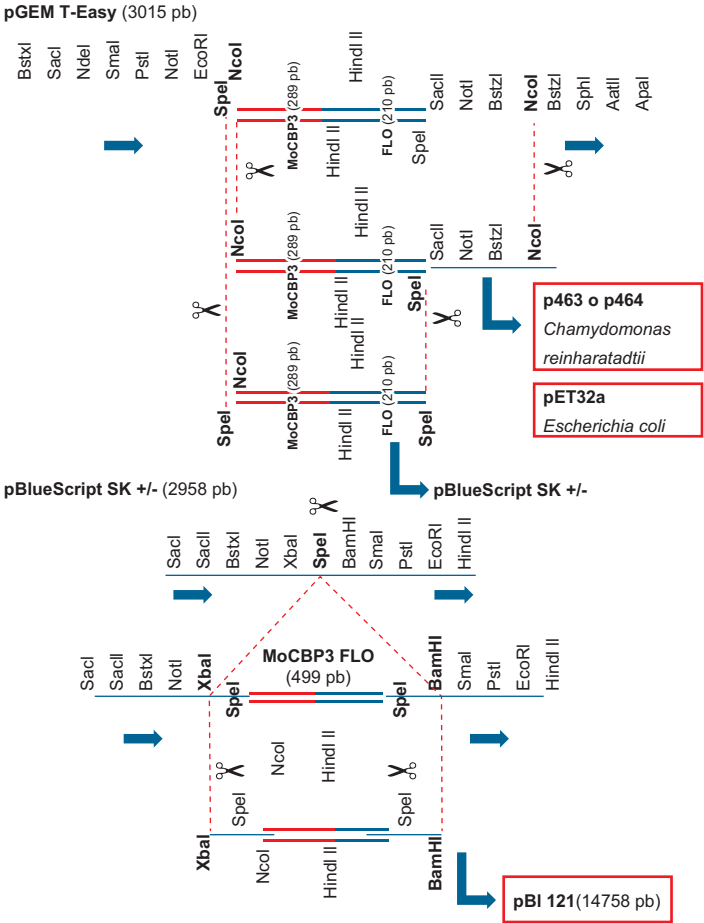


Figura 9.6. Estrategia para el empalme de amplicones de péptidos antimicrobianos en *M. oleifera*

C. Pruebas de inducción de la proteína recombinante

Con esta nueva construcción *Mo*-CBP₃-FLO/pET32 se transformó la cepa *E. coli* BL21 y se hizo crecer en medio LB líquido adicionado con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una OD600 de 0.7. Se realizaron varias réplicas del cultivo para adicionar a cada uno isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido o IPTG a concentraciones finales de 0, 0.1, 0.5 y 1 mM además, se colectaron muestras a las 2, 4, 6 y 12 horas de inducción de cada cultivo. Lo anterior se realizó para optimizar las condiciones de inducción y asegurar la obtención de la mayor expresión de la proteína recombinante.

D. Extracción de Proteínas Totales Solubles (PTS)

Una vez determinado el tiempo y concentración del inductor se escalaron los cultivos de la cepa transgénica de *E. coli* BL21. La biomasa celular se concentró por centrifugación para después ser re suspendida en un volumen de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT), se incubó la suspensión celular en hielo por 10 min y se agregaron 10 µl de del inhibidor de proteasas PMSF (100 mM) por cada mililitro de suspensión celular. Posteriormente se realizó la lisis celular mediante sonicación a 40% de amplitud durante 10 ciclos con pulsos de 10 s de lisis y 10 s de descanso, todo el proceso de lisis se realizó en frío evitando la formación de espuma. El lisado se centrifugó a 14,000 g por 10 min para después recuperar la fracción soluble y cuantificar el contenido de PTS por el método de Bradford y posteriormente ser evaluados por SDS-PAGE al 15%.

Protocolo 2. Diseño de secuencia sintética denominada gBlock

Existen varias ventajas para sintetizar el gen para una proteína de interés en lugar de depender de una fuente de DNA natural como plantilla. La síntesis directa de genes permite que la codificación de genes coincida con las preferencias del organismo huésped que se utilizará para la producción de proteínas recombinantes. En segundo lugar, cualquier sitio de restricción puede agregarse o eliminarse fácilmente durante la síntesis para facilitar la clonación, el truncamiento, la eliminación del dominio y otras alteraciones de la secuencia de longitud completa. En tercer lugar, los intentos de aumentar la expresión

mitigando el impacto de la estructura secundaria de mRNA, eliminando secuencias repetitivas y la optimización de otras características de la secuencia génica a través del diseño de secuencia se pueden incorporar fácilmente.

En el LBMP se han diseñado gBlocks codificantes para péptidos de interés, un ejemplo es el gBlock diseñado para codificar solo la secuencia madura de los péptidos de interés (Mo-CBP₃ y FLO). La síntesis y optimización de codones para su expresión en *E. coli* fue realizada por la compañía Integrated DNA Technologies (San Diego, CA). El gBlock diseñado tuvo una longitud de 269 pb, hacia el extremo 5' se agregó el sitio de restricción *Nco*I seguido del codón de inicio (ATG), luego las secuencias maduras de los péptidos Mo-CBP₃ y FLO (separadas por un codón de inicio) y hacia el extremo 3' se colocó un codón de paro (TAA) y el sitio de restricción *Hind*III (Fig. 9.7).

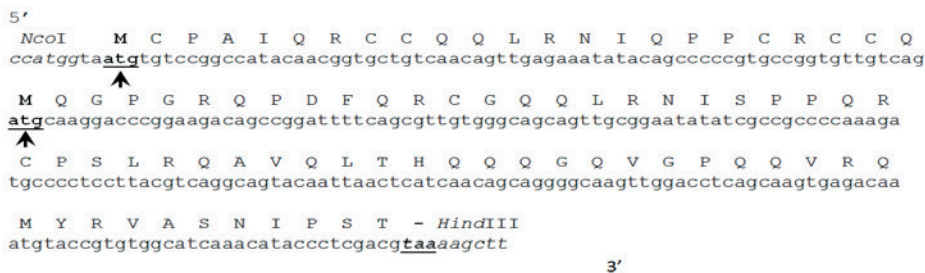


Figura 9.7. Secuencia nucleotídica y putativa en aminoácidos de gBlock. La secuencia del gBlock está flanqueada por los sitios de restricción *Nco*I y *Hind*III a los extremos 5' y 3' respectivamente. Resaltados en negritas se señala el codón de inicio (M), la secuencia del péptido FLO y, subrayado y en itálicas se señala el codón de paro (-).

A su vez, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gBlock (Tabla 9.7) y clonarlo al vector pGEM-T® Easy. Tanto el vector de expresión pET32 como el gBlock fueron digeridos con la enzima *Eco*RI y posteriormente purificados. Los fragmentos se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Fitchburg, WI). Con esta construcción (pET32 / gBlock) se transformaron por choque térmico células competentes de *Escherichia coli* DH5α y se seleccionaron en medio LB adicionado con ampicilina 100 mg/L. Se extrajo DNA plasmídico por el método de Birboin-Dolly y se identificaron algunas clonas con la construcción deseada mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

Las pruebas de inducción de la proteína recombinante y posterior extracción y evaluación de las proteínas producidas se realizaron conforma e lo mencionado en el apartado anterior.

Tabla 9.7. Oligonucleótidos diseñados para amplificación del gBlock.

Secuencia sintética	Oligonucleótidos diseñados	Longitud Amplicón	Péptidos contenidos
gBlock	5' ATGTGTCCGCCATACAACGGT 3' 5' TTACGTCGAGGGTATGTTTGATGC 3'	255 pb	RPAIQRCCQQLRNIQPRCR QGPGRQPDFQRCGQQLRNISPPQRCPSLRQAV QLTHQQGQVGPQQVRQMYRVASNIPST

Bibliografía

- Arнау, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 1-13.
- Azad, M. A., Huttunen-Hennelly, H. E. K., & Friedman, C. R. (2011). Bioactivity and the first transmission electron microscopy immunogold studies of short de novo-designed antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), 2137-2145.
- Bahar A. A. & Ren D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411-421.
- Bergström, C. A., & Larsson, P. (2018). Computational prediction of drug solubility in water-based systems: qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. *International Journal of Pharmaceutics*, 540(1-2), 185-193.
- Chen, J. J., Chen, G. H., Hsu, H. C., Li, S. S., & Chen, C. S. (2004). Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2256-2261.
- Daliri, E. B., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana press.
- gBlocks Gene Fragments, s/f. Recuperado de: <https://www.idtdna.com/pages/products/genes-and-gene-fragments/double-stranded-dna-fragments/gblocks-gene-fragments>
- Gifoni J. M., Oliveira J.T.A., Oliveira H. D., Batista A. B., Pereira M.L., Gomes A. S. & Vasconcelos I. M. (2012). A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Pept Sci.* 98(4), 406-415.
- Gould, N., Hendy, O., & Papamichail, D. (2014). Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 41. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00041>
- Huang Y., Kong Q., Mou H. & Yi H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2405954. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster *de novo* structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W449-W454.
- Lira, F., Perez, P. S., Baranauskas, J. A., & Nozawa, S. R. (2013). Prediction of antimicrobial activity of synthetic peptides by a decision tree model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(10), 3156-3159.
- Muñoz-Carrillo, M. G., Valdés-Rodríguez, S. E., Garcidueñas-Piña, C. & Morales-Domínguez, J.F. (2018). Análisis de expresión de genes de respuesta al estrés hídrico en plantas de *Sorghum bicolor* (L) Moench en presencia y ausencia de asociaciones con hongos micorrízicos. Tesis Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/1601>

- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W. & Goździcka-Józefiak A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59:181-196
- Osorio, D., Rondón-Villarrea, P., & Torres, R. (2015). Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *R Journal*, 7(1).
- Pirtskhalava, M., Gabrielian, A., Cruz, P., Griggs, H. L., Squires, R. B., Hurt, D. E. & Alekseev, V. (2016). DBAASP v. 2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1104-D1112.
- Quezada-Rivera, J.J., Soria-Guerra, R.E., Vasco-Méndez, N.L. & Morales-Domínguez, J.F. (2018). Obtención de péptidos antimicrobianos recombinantes derivados de *Moringa oleifera* Lam. y *Enterococcus* sp. Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/1612>
- Quezada-Rivera, J.J., Soria-Guerra, R.E., Pérez-Juárez, F.S., Martínez-González, L., Valdés-Rodríguez, S.E., Vasco-Méndez, N.L., & Morales-Domínguez, J.F. (2019). Heterologous expression of bacteriocin E-760 in *Chlamydomonas reinhardtii* and functional analysis. *PHYTON-International Journal of Experimental Botany*. 88: 25-35.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- Shanmugaraj, B., Bulaon, C. J. I., Malla, A., & Phoolcharoen, W. (2021). Biotechnological insights on the expression and production of antimicrobial peptides in plants. *Molecules*, 26(13), 4032. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26134032>
- Sneh, L., Sharma, B. K. & Raghava, G.P.S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8:263
- Suarez, M., Entenza, J. M., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marison, I., Moreillon, P. & Mermod, N. (2003). Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol Bioeng.* 81(1), 13-20.
- Torrent, M., Nogués, V. M., & Boix, E. (2009). A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. *BMC bioinformatics*, 10(1), 373.
- Varasteh-Shams, M., Nazarian-Firouzabadi, F. & Ismaili, A.J. (2020). The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant

- Dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. *Curr Plant Biol.* 24:100177.
- Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics*, 34(16), 2740-2747.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics*, 7, 285. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-285>
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P. & Idicula-Thomas, S. (2016). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1094-D1097.
- Wang, G. (2014). Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Computational Peptidology*, 43-66. doi:10.1007/978-1-4939-2285-7_3
- Wang, G. (2015). Improved methods for classification, prediction and design of antimicrobial peptides. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1268, 43-66.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.
- Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. (2011). Designing genes for successful protein expression. En *Methods in Enzymology* (Vol. 498, pp 43-46): Academic Press.
- Zhao X., Wu H., Lu H., Li G. & Huang Q. (2013). LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* 8: e66557

Capítulo 10

Expresión genética en plantas; transcriptomas y miARNs

Carolina Enríquez González
Mario Alejandro Mejía Mendoza
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Los genes son unidades moleculares que almacenan la información hereditaria y permiten transmitirla a la descendencia. Mediante el uso de la información contenida en cada gen estos son capaces de codificar una proteína o parte de ella; a este proceso se le llama expresión genética y es realizada por todos los seres vivos. Si bien existen ciertas diferencias entre como lo hacen procariontes y eucariontes, en ambos casos, el procedimiento se basa en la lectura del gen en grupos de 3 pares de base llamados *codones*. Cada codón corresponde a uno de los 20 diferentes aminoácidos usados para construir proteínas. La expresión genética de un organismo es vital para su metabolismo, supervivencia, adaptación y defensa contra estreses bióticos y abióticos.

En plantas al ser eucariontes, su expresión genética se da en el núcleo mediante la síntesis de ARN mensajero (ARNm) a partir de ADN por medio de la enzima ARN Polimerasa II. Posteriormente los codones del ARNm son leídos por los ribosomas que también empiezan la construcción de la proteína *de novo*. En este capítulo profundizaremos acerca de los procesos expresión génica en plantas, generalidades, inducción, regularización y métodos para medir los niveles de expresión de genes de interés.

Introducción

La expresión genética se define como el uso de la información contenida en un gen para la síntesis de una proteína. Para que esto pase, primero deben de suceder una serie de pasos que permitan transformar el ADN en aminoácidos. De estos pasos se distinguen dos principales: la transcripción, que es el proceso mediante el cual el ADN es transformado a ARNm, y la traducción, que se define como la codificación de codones a aminoácidos. Estos dos procesos suceden tanto en procariontes como eucariontes y son llevados a cabo mediante una serie de enzimas que trabajan de manera conjunta. La traducción y transcripción pueden ser ilustrados mediante el *Dogma central* que explica de manera gráfica la síntesis de proteínas a nivel citoplasmático a partir del ADN (Fig. 10.1). El *Dogma central* fue propuesto en 1958 por Francis Crick, y a partir de esa fecha ha sido modificado para lograr representar de manera más exacta el como ocurre la expresión genética en todos los seres vivos.

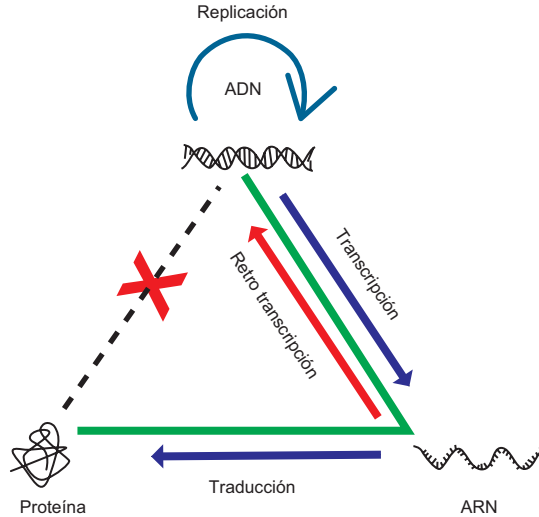


Figura 10.1. Dogma central de la biología. La línea punteada con la cruz roja indica que no es posible ir desde proteína a ADN.

El genoma de organismos vegetales está contenido en cada una de sus células, se compone de ADN (ácido desoxirribonucleico), el cual comprende toda la información y las instrucciones necesarias para llevar a cabo todos los procesos biológicos: para que el ADN pueda llevar cabo todos estos mecanismos, necesita transcribirse y traducirse, como resultado del primer proceso se obtendrá el ARN (ácido ribonucleico).

Existen varios tipos de ARN, sin embargo, al que le podemos atribuir cierta relevancia es al ARNm, también llamado como transcrito, la producción y regulación de transcritos, es el resultado de la respuesta de la célula ante estímulos intra o extra celulares, estos activan vías de cascadas de señalización para indicar cuales son los genes que se van a expresar, o bien, si así lo requiere la célula, que el gen se apague de acuerdo con el aliciente inicial. El primer paso de la expresión génica es la transcripción que se define como el proceso mediante el cual se genera ARNm a partir de la secuencia de ADN de un gen dentro del núcleo.

El proceso de transcripción comienza con la apertura del locus (sitio donde se ubica un gen), de la cromatina que contiene el gen de interés con ayuda de la enzima principal de este proceso: la ARN Polimerasa II (Pol II),

que además de separar las hebras de ADN, utiliza una de las cadenas como molde para sintetizar la cadena complementaria de ARN. Este proceso consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación (Figura 10.2).

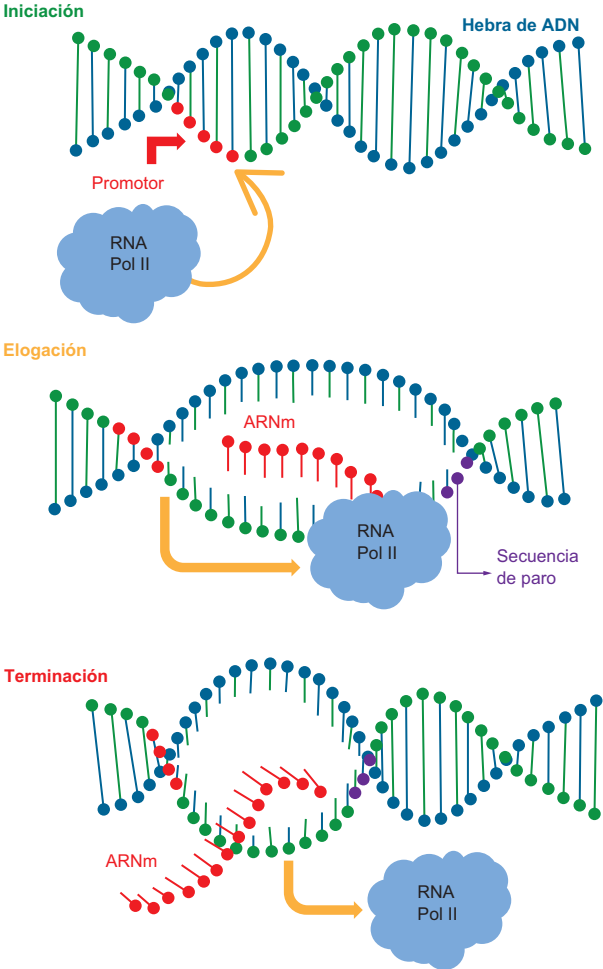


Figura 10.2. Proceso de transcripción. Principales etapas del proceso de transcripción de un fragmento de ARNm a partir de una hebra de ADN genómico.

- **Iniciación:** La Pol II, se une a la secuencia de ADN del gen de interés en una región llamada *promotor* al inicio del mismo. Posteriormente la Pol II procede a separar las cadenas de ADN y se pega a una de ellas para usarla como molde.
- **Elongación:** La Pol II comienza a “leer” la cadena molde del ADN y empieza a sintetizar su cadena complementaria en sentido 5’ a 3’ con la única diferencia de que contiene la base Uracilo en lugar de Timina. La cadena resultante se le llama pre-ARNm o transcrito ya que aun contiene *intrones* (secuencias no codificantes para aminoácidos) que deben de ser removidas antes de su salida del núcleo.
- **Terminación.** Cuando Pol II ha llegado al final de la secuencia de ADN del gen, encontrara un *terminador* que al contrario del *promotor* le indica que debe de terminar de “leer” la secuencia y separarse. Las bandas de ADN vuelven a unirse por afinidad de bases.

Una vez se ha llevado a cabo la transcripción, al pre-ARNm se le deben hacer una serie de modificaciones para asegurar la eliminación de los *intrones* y asegurar su integridad una vez este salga del núcleo. Estas modificaciones son la adición de las moléculas *cap* y *polyA* a los extremos del transcrito que ayudaran a protegerlo de nucleasas (Enzimas que degradan ácidos nucleicos) nativas de la célula. Por otra parte, tenemos el proceso de separación de *intrones* o *splicing* con el fin de que al momento de la traducción se genere una proteína funcional.

La primera modificación consta de la adición de un nucleótido de guanina al cual se le ha agregado un grupo metilo (CH_3) en la posición del carbono 7 mediante un proceso llamado metilación. Esta guanina se une al extremo 5’ de la cadena de pre-ARNm, mediante un enlace trifosfato 5’-5’. Posteriormente la enzima Poli A polimerasa, comienza a añadir en el extremo 3’ del pre-ARNm de 100 a 200 residuos de adenina que ayudan a proteger el ARNm de la degradación causada por nucleasas encontradas en el citoplasma.

La segunda modificación es la remoción de los *intrones* mediante el *splicing*, el cual comienza con el reconocimiento de los *intrones* por un sistema enzimático llamado *Spliceosoma* y posterior corte y eliminación de estas secuencias “basura”. Terminado este paso tenemos un ARNm maduro que puede ser transportado al citoplasma de la célula y seguir con el proceso de traducción.

La traducción como tal, se define como el proceso en el cual el ARNm maduro es leído en codones por los ribosomas en el citoplasma y traducido a una

secuencia de aminoácidos. Esta traducción está definida por el código genético que establece la relación que existe entre los codones de una secuencia y el aminoácido específico para el que codifica. Este mecanismo se lleva a cabo de igual manera en 3 pasos que son: iniciación, elongación y terminación (Figura 10.3).

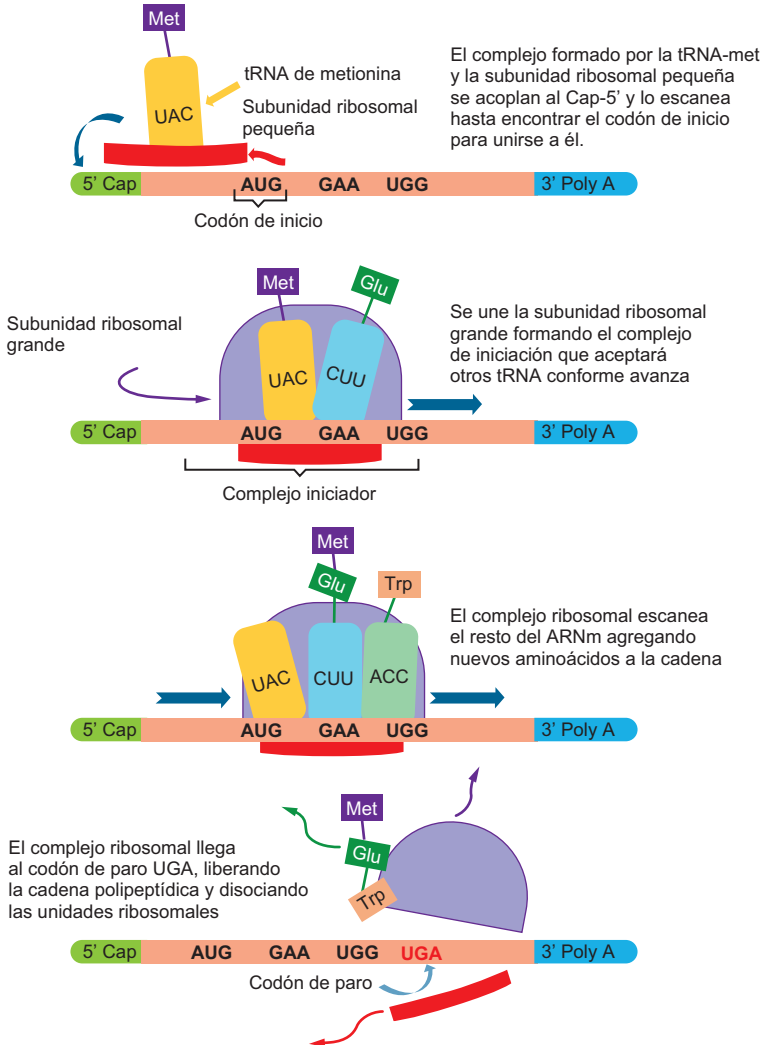


Figura 10.3. Proceso de traducción. Principales etapas de procesamiento de un ARNm maduro a proteína (Adaptación de Berg J. *et al.* (2002)).

- **Iniciación:** los ribosomas se acoplan alrededor del ARNm y comienzan a leerlo a partir del primer codón llamado de *iniciación* (AUG en eucariontes), posteriormente con la ayuda de una molécula de ARN de transferencia (ARNt) que tiene como función llevar el aminoácido codificante al codón leído, que en este caso siempre se trata de metionina (en eucariontes) y así comenzar con la traducción.
- **Elongación:** durante esta etapa los ribosomas van leyendo codón por codón y agregando con ayuda de los ARNt los aminoácidos correspondientes a la cadena de péptidos que inició con metionina.
- **Terminación:** al acercarse el final de la cadena de ARNm, los ribosomas encontrarán uno de los siguientes codones: UAA, UAG, UGA llamados *codones paro* que les indican a los ribosomas que ha llegado el final del transcrito y por tanto deben de detenerse y liberar la cadena de aminoácidos (polipéptido).

Métodos para analizar la expresión del gen

Existen múltiples herramientas moleculares que en conjunto ayudan a comprender y visualizar que genes y cuanto llegan a expresarse en diferentes órganos y/o bajo determinadas condiciones. La primera técnica de expresión fue el Northern blot; que consiste en la hibridación de una cadena de ARNm con un gen o fragmento de ADN específica llamado sonda, el cual está marcado radioactivamente. Esta técnica consiste en una electroforesis del ARNm en un gel desnaturalizante y posteriormente es transferido a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se hibrida con la sonda (gen marcado) sondas que se unen al ARN y por último se coloca una película de rayos X y posteriormente se revela la película y se observa en esta las manchas. Otra de las técnicas que fueron más utilizadas –y aún se siguen utilizando– es el RT-PCR. Esta técnica consiste en la extracción de ARNm y posteriormente es convertido a ADN complementario (ADNc) por la enzima transcriptasa reversa. El ADNc es utilizado como molde para la PCR donde se utilizan oligonucleótidos específicos del gen de interés.

En la actualidad tanto el RT-PCR como el Northern blot son poco utilizadas ya que existen más y mejores técnicas gracias a la secuenciación de nueva generación tales como: los transcriptomas, las librerías de ADNc y los análisis de PCR en tiempo real (qPCR). Esta última es una de las más importantes e indis-

pensables para el análisis de expresión ya que ya que permite con certeza medir que tanto se expresa un gen en un momento, condiciones y órgano específico. La teoría de esta técnica radica en la fluorescencia emitida cada que se lleva a cabo la síntesis de una nueva cadena de ADN, la cual es detectada por foto sensores incluidos en el equipo de qPCR como ya se mencionó en capítulos anteriores.

La base de la expresión génica y su regulación se basa principalmente en una serie de cambios y modificaciones que afectan directamente al ARNm, en diferentes etapas de su desarrollo. Estos cambios pueden ocurrir durante el *splicing* de los intrones, en las etapas traducción y postraduccional y sobre todo son motivo de pequeñas variaciones inducidas en el medio ambiente del organismo, como lo son cambios en la luz, temperatura, hidratación, pH del suelo, etc, etc.

Sin embargo, estos cambios pueden llegar a ser imperceptibles a simple vista, es por ello que se han desarrollado diferentes técnicas bioinformáticas como la secuenciación de nueva generación y la construcción de librerías de ADNc y transcriptomas que permite monitorear estos cambios.

Otra manera de analizar la expresión de un gen de interés es mediante la aparición y correlación con un microARN (miARN) característico, esto debido a que los miARN son elementos reguladores específicos de genes. Con esto en mente, se puede saber si un gen se expresa o no, analizando si el miARN que es específico para ese gen está presente o no. Incluso la relación que existe entre los niveles de expresión de un miARN y su gen objetivo ha sido utilizada para tener conocimiento en qué etapas, estreses o bien periodos de desarrollo del organismo un gen este encendido y en cuales debe ser apagado.

Transcriptomas

Un transcriptoma se define como la identificación y cuantificación total de moléculas de ARNm que están presentes en una célula, tejido, órgano u organismo bajo una condición y un momento dado, a los cuales se les conocen como transcritos, y la relación de estos con la expresión diferencial de cada uno de los genes que hacen posible dicha expresión.

En esencia un transcriptoma es la colección de ARNm producidos por una planta, en un tejido bajo tiempos y condiciones específicas.. De alguna forma se podría decir que es una foto exacta de los genes expresándose en ese momento determinado. Ahora bien, esto tiene más aplicaciones que saber

simplemente la producción total de ARNm de la planta, por ejemplo, al inducir un tratamiento deseado a otra planta de la misma especie y generar otro transcriptoma, ambos se comparan y se observan los cambios en los genes expresados. A este tipo de análisis se les conoce como: expresión diferencial de genes, el cual indica, si los genes expresados son los mismos o se expresaron otros genes o por el contrario dejaron de expresarse e incluso determinar que tanto se expresa un gen con respecto a su parte control. El transcriptoma también es una herramienta importante y casi indispensable para la obtención de datos valiosos correspondientes a la parte de regulación en la expresión de un gen determinado, puesto que no solamente se puede inducir cambios en la expresión de un gen con estímulos ambientales, sino también se puede utilizar una serie de herramientas moleculares para silenciar o regular la expresión de un gen y comparar estos niveles con los originales de la planta control. Estos mecanismos se basan principalmente del silenciamiento de genes mediante mutaciones con químicos, Knock Out por ARN antisentido o bien ARNs pequeños de interferencia (siARN), este último siendo una de las técnicas más populares y específicas que existen.

Se debe tomar en cuenta que no todos los genes se transcriben al mismo tiempo, sino que, cada gen se regula de forma individual, por lo que sólo se van a transcribir los genes que tienen relevancia en la respuesta a cierto estímulo y bajo cierta circunstancia (Fig. 10.4). También existen genes que pueden permanecer apagados y al haber otro estímulo o cambio de situación se va a requerir que se enciendan, iniciando así su propia transcripción. La colección de todos estos transcritos presentes en la célula se le llama Transcriptoma.

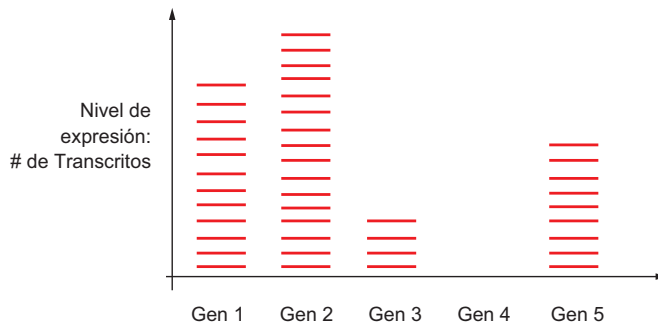


Figura 10.4. Ejemplificación de la diferencia de expresión entre distintos genes de un mismo individuo, bajo un mismo estímulo.

En la actualidad a través de la secuenciación de nueva generación (NGS, Next Generation Sequencing) y gracias a la implementación de la técnica de la secuenciación directa del ARN (ARN-seq), ha sido posible la caracterización y análisis completo de una célula sin ninguna información genómica previa, a lo que se le conoce como transcriptoma *De novo*, a un bajo costo y con muy altos rendimientos.

Pasos para la construcción de un transcriptoma

Para llevar a cabo la secuenciación de nueva generación con el fin de obtener un transcriptoma, se deben de seguir una serie de metodologías desde la extracción de ARN hasta el ensamble de las secuencias; la siguiente información se describe de manera sintetizada en la Figura 10.5.

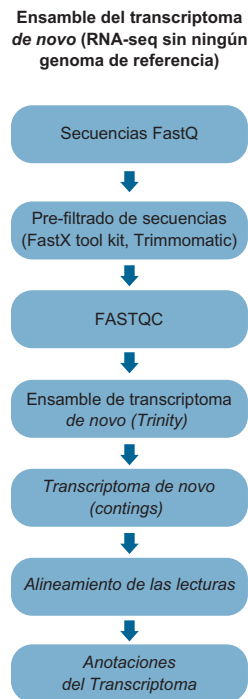


Figura 10.5. Diagrama en el que se muestran la metodología a seguir para realizar un transcriptoma *de novo*.

En este texto se describe sólo una de las aplicaciones de ARN-seq, el transcriptoma *De novo*, exponiendo algunas metodologías utilizadas y de las cuales se han obtenido resultados favorables (descripción de la Figura 10.5), el material biológico utilizado es de origen vegetal de la familia *Cactaceae*.

Paso 1: extracción de ARN total

El ARN total del material vegetal se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen), al final cada pastilla se resuspendió en 30 mL de agua DEPC. La pureza e integridad de las muestras se analizaron en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer ARN 6000 Nano Assay chip (Agilent Technologies, Stockport). Se sintetizó el ADNc y con este se realizaron las bibliotecas.

Paso 2: Generación de ARN-seq

Existen varias plataformas y estrategias para la secuenciación directa del ARN (ARN-seq), entre los cuales se pueden clasificar en tres tipos principales: 1) Secuenciación por Síntesis; donde realiza una librería de ARN, se ligan adaptadores a cada una de las secuencias, se amplifican para mejorar la señal fluorescente y colocan en celdas de flujo para su posterior secuenciación. Secuenciadores más utilizados en esta técnica: *Roche 454 pyrosequencing*, *Ion Torrent* y la más utilizada *Illumina*. 2) Secuenciación por Ligación: Este método usa oligonucleótidos en presencia de fluorescencia; como ejemplo esta la técnica de *SOLiD* y *polonator*, y 3) Secuenciación de molécula única: Produce una señal de oligonucleótidos detectada por quimioluminiscencia, entre las técnicas más comunes se encuentran: *Helicos* y *Pacific Biosceinces*.

Paso 3.- Secuenciación en plataformas Illumina

En las plataformas *Illumina* las bibliotecas de ADNc son diluidas y cargadas en una celda de flujo, aquí se lleva a cabo una amplificación por PCR-puente. Esta PCR se realiza con el fin de formar un *cluster* anclado a una base sólida, se lleva a cabo por nucleótidos marcados por fluorescencia, estos nucleótidos hacen el papel de cebadores creando puentes facilitando la amplificación elongando la cadena, el nucleótido marcado es excitado y su manifestación lumínica es captada por un sistema óptico. Los resultados obtenidos de cada

cluster son procesados para formar un *calling* y así producir las lecturas, esta metodología se realiza en ambos sentidos *forward* y *reverse* conocidas como secuencias *paired-end* (Fig. 10.6).

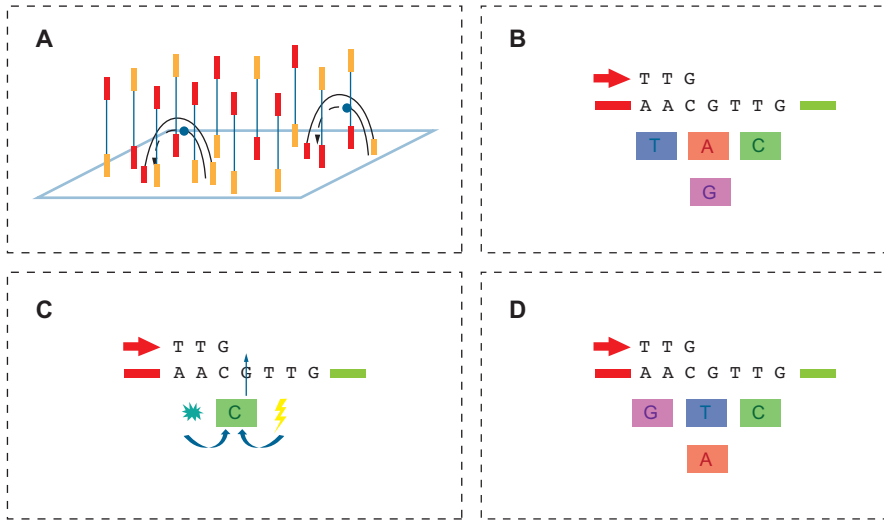


Figura 10.6. Secuenciación por síntesis masivo ARN-seq, en la plataforma *Illumina*. El proceso utiliza el principio de amplificación en puente y el marcaje por fluorescencia de terminadores reversibles. A) Los adaptadores de los extremos de las secuencias ligándose por complementariedad a cebadores adheridos a una “Flow cell”, los amplicones permanecen de esta manera hasta la próxima desnaturalización en la cual permitirán la formación de un nuevo puente y así dar pie a la amplificación. B) el amplicón se genera a partir de oligonucleótidos únicos para los adaptadores, en cada flujo los cebadores con fluorescencia elongan la cadena. C) se unen las bases complementarias a la cadena por una fuente lumínica excitando el fluoróforo del nucleótido añadido. D) el resto de los nucleótidos son eliminados y el ciclo se repite nuevamente.

Paso 4.- Control de calidad de las secuencias obtenidas

A) Análisis con el programa FASTQC

Se realiza el análisis de la secuencia obtenida con la plataforma *Illumina* mediante el programa *FastQC*, el cual permite analizar las calidades de las secuencias obtenidas.

B) Fastq_quality_filter

Posteriormente se realiza un filtrado de las secuencias con la herramienta `Fastq_quality_filter`, esto a partir del gráfico de la “calidad de secuencia por base”, que nos muestra el promedio y el rango de los valores de calidad de secuencia a lo largo de la lectura, esto por medio del comando:

```
$fastq_quality_filter -v Q 64 -p 32 -q 80 -i *MB1R1_trimmer.Fastq -o
*MB1R1_filter.fastq
```

Donde:

- i: input file
- o: output file
- v: report number of sequences
- Q 64: determines the input quality ASCII offset (in this case 64).
- q 32: the quality value required.
- p 80: the percentage of bases that have to have that quality value

A las secuencias obtenidas se les vuelve a verificar la calidad mediante el programa `FASTQC`

C) Ensamble de las secuencias

Para el ensamble de las secuencias a partir de los datos de ARN-seq sin un genoma de referencia, se usó el programa `Trinity`, el cual se compone de 3 módulos: 1) `Inchworm` el cual reconstruye eficientemente secuencias específicas consecutivas unas a otras y superpuestas (contigs) de transcritos lineales, 2) `Chrysalis` que superpone los contigs en conjuntos de componentes conectados, y construye gráficos completos de `Bruijn` para cada componente y 3) `Butterfly` que reconstruye transcritos aceptables de longitud completa al comparar los gráficos individuales de `Bruijn` generados en el módulo anterior con las lecturas originales y a partir de esto reconstruir transcripciones distintas para empalmar isoformas y genes parálogos (Figura10.7).

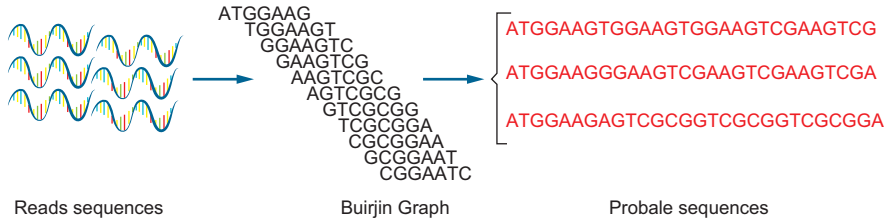


Figura 10.7. Representación gráfica del ensamblaje de novo utilizando el programa Trinity.

D) Anotación del transcriptoma

Todos los unigenes fueron anotados mediante un análisis de similitud de secuencias realizado en la plataforma BLASTx, la cual las contrasta con *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org) y también se buscó la referencia de proteínas vegetales.

Para los genes no referenciados se utiliza el programa WEGO y la herramienta KEGG, con los cuales se puede determinar la ontología de un gen no caracterizado en un organismo determinado. La identificación de los marcos abiertos de lectura presentes en cada contig, se realizó con el programa TransDecoder. Posteriormente, se utilizó Blast2GO, para asignar un conjunto de categorías jerárquicas, u ontologías génicas, a partir de la homología entre la proteína predicha para cada contig.

Ejemplos de transcriptomas *de novo* y diferenciales

A la fecha son muchos los transcriptomas que se han hecho ya que, cada vez es más sencillo y barato acceder a las tecnologías de secuenciación de nueva generación (SNG) como es el ARN-seq, haciendo que la transcriptómica sea más redituable que tecnologías anteriores, considerando el costo- beneficio.

En el área vegetal, uno de los mejores ejemplos de transcriptomas diferenciales es el de *Oryza sativa*, en el que se observó la regulación de la expresión génica en brotes de arroz expuestos a diferentes concentraciones de cadmio (Sun *et al.* 2019). En *Arabidopsis thaliana*, se realizó un análisis diferencial de genes que codifican a receptores que crean patrones moleculares asociados a patógenos comunes. Hay transcriptomas en cactaces y en agaves, por ejemplo esta el de *Agave sisalana*, donde se identificaron algunos genes

relacionados con el estrés, el de *Hylocereus undatus*, se realizó un ensamble *de novo* y un análisis diferencial en genes relacionados con la inducción floral y en *Mammillaria bombycina* se realizó un ensamble *de novo* para dilucidar algunos genes implicados en la homeostasis de la cactácea bajo condiciones de estrés abiótico.

Los miARN y la regulación genética

El mecanismo de silenciamiento o regulación genética mediante el uso de ARNs pequeños (ARNp) se ha vuelto increíblemente popular debido a que ha sido identificado como uno de los mecanismos naturales de regulación mayormente conservado entre los eucariontes. Los principales tipos de ARN que han tenido mayor auge son los ARN de interferencia (ARNi), los ARN pequeños de interferencia (ARNsi) y micro ARN (miARN).

Los miARN son fragmentos de ARN de entre 18 a 22 nucleótidos, no codificante que actúan de manera específica regulando la expresión de genes, estos se encuentran en el genoma de todas las células eucariontes. Estos se sintetizan a partir de regiones en forma de bucle provenientes de precursores de transcritos endógenos, estas regiones se conocen como pre-miARN, las cuales posteriormente forman un complejo dúplex de ARN por la acción de una endoribonucleasa III (Dicer-like1). El miARN maduro se une a la proteína argonauta (AGO1), formando un complejo proteico de silenciamiento de genes inducido por complementariedad de ARN llamado RISC que causa la degradación de un ARNm o bien la represión transcripcional (Fig.10.8).

La manera en que actúa este sistema proteico llamado RISC, por sus siglas en inglés de *ARN-induced silencing complex*, comienza al unirse a la secuencia de miARN y llevarla con precisión al gen objetivo, una vez ahí tiene dos mecanismos de acción: el primero se basa en la regulación postranscripcional, en donde el complejo RISC se une al gen objetivo y este lo corta como una enzima de restricción, y el segundo que es mediante el bloqueo durante la transcripción de ADN a ARNm, ya que el complejo RISC se pega a la cadena de ADN evitando que la Pol II actúe.

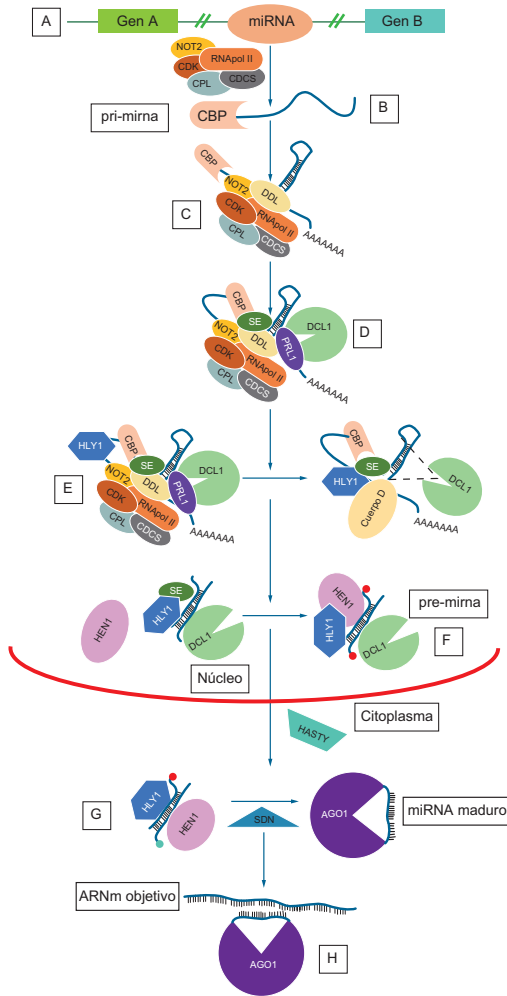


Figura 10.8. Biosíntesis de miARN en plantas. A) Los miARN de plantas son transcritos a partir de secuencias no codificantes entre genes por la *ARN polimerasa II* (ARNPol II) con ayuda de los cofactores NOT2, CDK, CPL y CDC5 generando un producto llamado pri-miARN. B) El pri-miARN es modificado en su extremo 5' por la *Cap Binding Protein* (CPB). C) El complejo ARNPoII pliega la hebra de ARN consigo misma atrayendo a la CPB y formando el bucle característico de los miARN. Esta estructura lleva el nombre de cuerpo D (D-bodies) y es estabilizada por la proteína DAWDLE (DDL). D) La reacción anterior genera el plegamiento de los factores PRL1 y SE que ayudan al plegamiento de la enzima *Dicer Like-1* (DCL1) al complejo ARNPoII. E) La enzima HLY1 fosforila los extremos del bucle del pri-miARN activando la acción de corte de DCL1 (líneas punteadas). F) Una vez cortado el bucle la estructura recibe el nombre de pre-miARN, el cual es metilado en sus extremos (puntos rojos) por la enzima HEN1 que desplaza al factor SE y deja al pre-miARN listo para su exportación al citoplasma con ayuda de la enzima HASTY. G) Uno de los extremos del pre-miARN pierde su grupo metilo y es degradado por la nucleasa *ARN Degrading Nuclease* (SDN). La hebra restante es miARN maduro que posteriormente se une a una proteína AGO1 formando el complejo de silenciamiento dirigido por ARN, RISC. H) El complejo RISC es llevado hasta el ARNm objetivo para su regulación (Adaptación de Voinnet O. (2009); Achkar N. *et al.* (2012))

En plantas se ha observado que las secuencias de miARN tienen una alta complementariedad con su gen objetivo, con máximo cinco diferencias entre las secuencias de miARN y gen objetivo y aun así tener actividad catalítica sobre el gen.

Como ejemplo, en el 2005 un grupo de investigadores liderado por el Dr. Schwab, demostró la actividad del miARN 159, sobre un gen objetivo con cinco diferencias entre sus secuencias, resultando en la regulación negativa del gen de interés. Además de esto en el 2015 un grupo de investigadores, demostró que, aunque no sea un objetivo específico y conservado evolutivamente entre especies, se da la regulación, lo que indica, en conjunto con el cambio evolutivo de ARNm, el miARN cambia a la par. Estos hallazgos resaltan el hecho de que miARN maduros, así como las secuencias de sus genes objetivos están altamente relacionadas y conservadas entre diferentes especies de plantas. Esto se ha logrado mediante la secuenciación de ARN, herramienta con la cual se pueden caracterizar e identificar los ARNp expresados en una planta.

En años recientes se han descubierto que muchas de las secuencias de miARN en plantas están conservadas entre especies, sobre todo los correspondientes a estrés hídrico. Sin embargo, en otros estudios también otros tipos de miARN se han descrito y encontrado entre especies por ejemplo, los responsables de la regulación de genes de maduración en frutos climátricos. Esto genera la posibilidad a que un perfil completo de miARN de una planta puede ser comparado con un transcriptoma de la misma planta y así encontrar posibles genes objetivos de los miARN.

En este capítulo se explicará a detalle la manera para construir y analizar una biblioteca y perfil completo de miARN en una planta, además de ejemplificar su desarrollo con material vegetal del fruto del guayabo.

Construcción de Bibliotecas de miARN

a) Cuantificación y verificación de la integridad de las muestras

Utilizando la metodología de extracción de ARN mencionada anteriormente, se trabajó con muestras de fruto de guayaba en estadio maduro. Se calcula la concentración de las muestras y se realiza una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, para comprobar la integridad y calidad del ARN (Fig. 10.9).

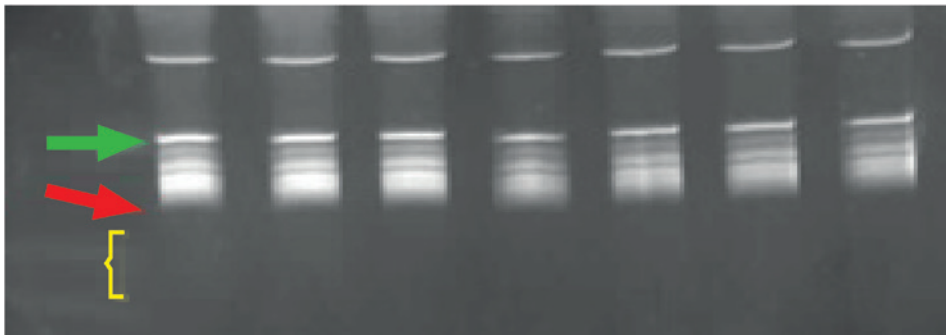


Figura 10.7. Extracción de ARN total. Flecha verde: banda correspondiente a la subunidad ribosomal 28 S. Flecha roja subunidad 18 S ribosomal. Corchete amarillo, localización de los ARNp, ARNt, miARN.

b) Aislamiento de microARNs a partir de muestras de ARN total

Se cortan las áreas del gel de poliacrilamida donde se encuentran las bandas correspondientes a 20 y 27 pares de base del marcador de peso molecular. Posteriormente los cortes se dividen en 6 microtubos y se les agrega 700 μL de agua tratada con DEPC, estéril y se dejan eluir durante toda la noche a 5 $^{\circ}\text{C}$.

Las muestras eluidas junto con la poliacrilamida se recuperan con una jeringa de 5 mL conectada a un filtro estéril el cual impide el paso de partículas no deseadas de poliacrilamida, pero sí la recuperación del sobrenadante. Las muestras fueron colectadas en un tubo nuevo de 1.5 mL, se afora con agua destilada estéril hasta un volumen de 500 μL por tubo. A continuación, los

miARN se precipitan utilizando acetato de sodio 3 M, glicógeno puro, etanol absoluto (2 volúmenes) y se incuban a -20 °C durante 8 horas.

c) Ligación del adaptador 3'

Para este caso se utilizó el adaptador 3' de secuencia: 5' rAppCTGTAGGCACCATCAAT-NH₂ 3', la cual contiene un grupo amino (NH₂) en su extremo 3' que previene la ligación consigo mismo, además de tener una adenilación activa en su extremo 5' que la ARN ligasa reconoce y ayuda a la ligación covalente con el OH del extremo 3' del miARN, sin la necesidad de ATP (Fig. 10.10).

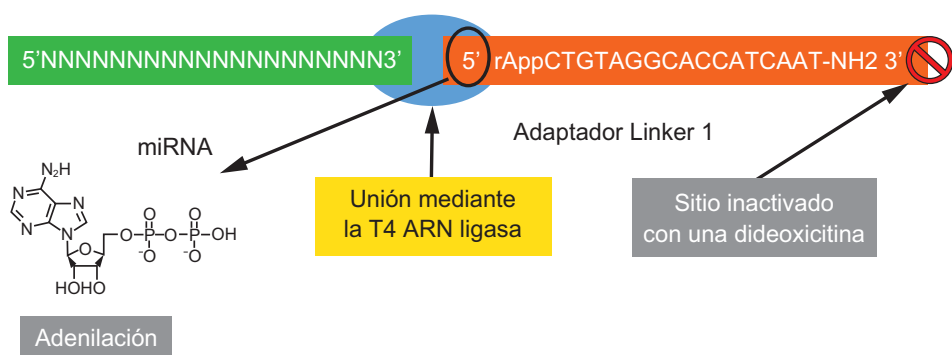


Figura 10.10. Ligación del adaptador 3' Linker1. Estructura y plegamiento del extremo 5' del adaptador Linker1 a la secuencia de miARN en su extremo 3', con la enzima T4 ARN ligasa.

El extremo 3' del adaptador está desactivado mediante una dideoxicitina para evitar el plegamiento consigo mismo.

d) Ligación del adaptador 5'

Para este paso, se utilizó el producto de la marca Illumina[®], ya que la mayoría de los secuenciadores de nueva generación son de esta marca y están programados para reconocer estas secuencias. Al igual que la parte 3' estas secuencias se caracterizan por la falta un grupo fosfato en su extremo 5', lo que lo hace particularmente vulnerable a ligarse consigo mismo en su propio extremo 3' (Fig. 10.11).

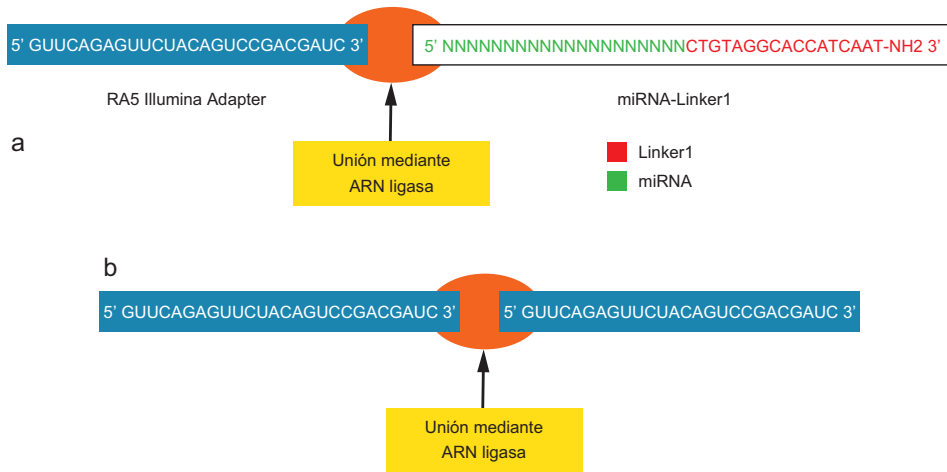


Figura 10.11. Ligación del adaptador 5'. a) Unión deseada entre la primera ligación y el RA5 en el extremo 5'. b) Producto vacío o no deseado, en donde dos adaptadores RA5, se pliegan en sus extremos 3' y 5'.

e) Síntesis de ADN complementario del producto de las ligaciones

Para este paso, se puede utilizar cualquier kit para síntesis de ADNc. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se necesita introducir un oligonucleótido especialmente diseñado para ser la reversa complementaria exacta del adaptador 3', así como del adaptador 5', el cual, para propósitos demostrativos, elegimos el Illumina adapter, esto con la finalidad de tener un oligonucleótido que sea capaz de también transcribir esta parte a ADNc, como se muestra en la figura 10.12.

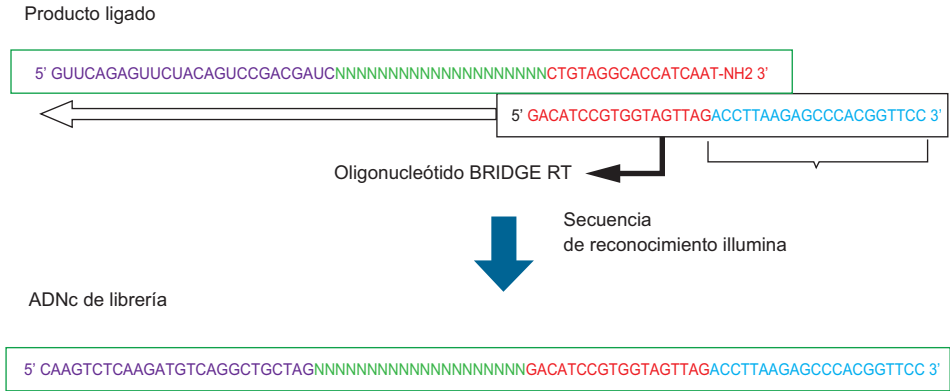


Figura 10.12. Síntesis de ADNc de la librería de miARN. Estructura del oligonucleótido BRIDGE RT y síntesis de ADN complementario (ADNc) de los productos ligados anteriormente.

f) Asignación de índices para las librerías de miARN

Los índices son secuencias específicas de 6 pares de base que se colocan cerca del extremo 3' de la construcción y se utilizan como identificación de cada librería en el momento de la secuenciación. Para este ejemplo, se utilizaron los índices de reconocimiento Illumina, del kit Illumina Adapter Sequences, TruSeq Small ARN, de la serie C, se usaron los números 2, 4, 5, 6, 11 y 12 (Tabla 10.1). Los índices, fueron agregados a la construcción mediante PCR, los pasos descritos se mencionan en el siguiente punto.

Tabla 10.1. Secuencias de los índices Illumina utilizados.

Índice	Secuencia
C2	CGATGT
C4	TGACCA
C5	GTGACA
C6	GCCAAT
C11	CTTGTA
C12	TACAAG

Esto concluye la construcción de nuestras librerías de miARN. Sin embargo, el trabajo apenas comienza, ya que después de esto se manda a secuenciar las librerías y posteriormente analizarlas bioinformática y estadísticamente. En esta parte, existen un gran número de programas de libre acceso y de paga que podrán facilitarnos estos pasos, uno de los más recomendados por los autores de este libro es el CLC Genomics Workbench, en cualquiera de sus versiones, debido a la gran cantidad de herramientas y amigable interfaz para utilizarlas.

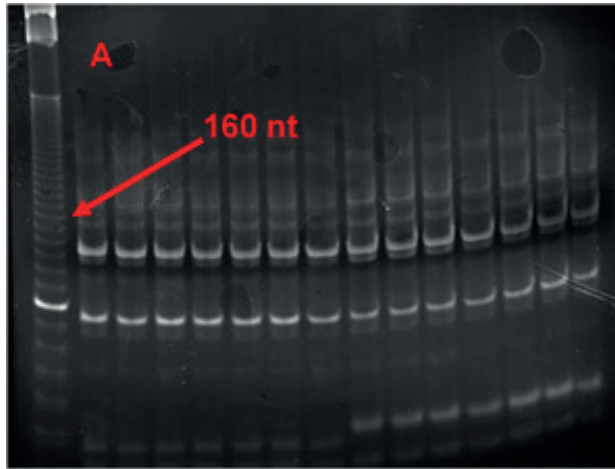


Figura 10.14. Electroforesis de RT-PCR de librerías de miARN. Flecha roja: banda de 160 nt correspondiente a una librería de miARN correcta.

Los miARN en el fruto de guayaba

Estudios actuales han identificado, analizado y perfilado los miARN expresados durante la maduración en el fruto de la guayaba mediante el uso de herramientas bioinformáticas y técnicas de secuenciación masiva. Para este caso, se realizó un análisis de miARN en el fruto de guayaba mexicana “Siglo XXI” variedad media china de la cual, a partir del aislamiento de ARN total, se construyeron 2 bibliotecas de miARN (utilizando el protocolo antes mencionado) una para miARNs encontrados en estadio rayado y otra para el estadio maduro. La secuenciación inicial de las librerías resultó en 16,729,248 secuen-

cias, a las que después de remover el adaptador y pasar por un filtro de tamaño de entre 18 y 22 pb, disminuyeron su número a 244,277. Estas secuencias fueron sometidas a un análisis de similitud con el genoma de guayaba y la base de datos de la página web miRBase obteniendo 3909 secuencias con similitudes, de las cuales solo se tomaron en cuenta las pertenecientes a miARN maduros, resultando en 77 secuencias de miARN. Posteriormente de estas secuencias, se identificaron 29 familias diferentes de miARN. En el estadio maduro se observó la expresión de 27 de estas familias, mientras que en rayado sólo 17. De las 29 familias la MIR166 fue la que expresó un mayor número de miembros con 14 en rayado y 9 en maduro, seguida de la familia MIR482 con 8 en maduro y 7 en rayado, y en tercer lugar la MIR 395 con 7 en maduro y 6 en rayado.

El tamaño de los miARN está entre 18 y 25 nt, siendo el de 21 nt (84 secuencias) el más abundante, seguido de 22 nt (24 secuencias), 20 nt (12 secuencias), del resto se encontró una secuencia de 25 nt, una de 23 nt, una de 19 nt y una de 18 nt.

Las familias 159, 160, 166, 171, 319 y 535 mostraron estar directamente relacionados al proceso de maduración (biosíntesis de etileno y modificación de pared celular), mientras que las familias 169, 395, 398, 528 y 2120 mostraron una relación indirecta (factores de crecimiento y enzimas secundarias).

Protocolo

Protocolo 10.1 Extracción de ARN

Se extrajo ARN total del tejido expuesto a condiciones de estrés utilizando el kit PureZol de BioRad. Se pesaron 100 mg de tejido fresco pulverizado y se le agregó 1 mL de PureZol, se homogenizó y se dejó incubar por 24 h a 4 °C, al término de ese tiempo se le agregaron 0.2 mL de cloroformo mezclándolo vigorosamente por 15 min, se dejó incubar a temperatura ambiente por 24 h, se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.5 mL de alcohol isopropílico, se incubó por 5 min a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet adicionando 1 mL de etanol al 70 %, se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 7500 rpm.

por 5 min a 4 °C, se adicionaron 50 µL de agua libre de ARNs (agua tratada con DEPC) y se almacenó a -80 °C.

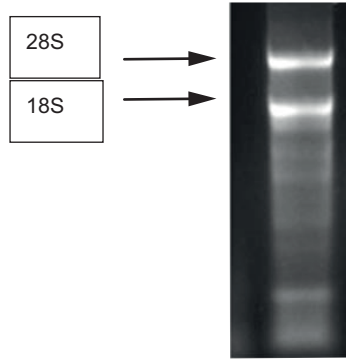


Figura 10.15. ARN total de *Suaeda edulis*. Se observa la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARNr de *Suaeda edulis*.

Extracción de ARN de guayaba mediante un método CTAB modificado.

Todas las muestras utilizadas (hoja, tallo, raíz y fruto en estadios de maduración verde, rayado, maduro y sobre maduro) siguieron la misma metodología para la extracción de ácidos nucleicos. La extracción fue con el método de CTAB de Doyle y Doyle (1987), con modificaciones. El buffer de lisis contuvo lo siguiente, CTAB 3 %, PVP 2 %, EDTA pH 8.0 al 25 mM, Tris-HCl pH 8.0 al 100 mM, NaCl 2 M y agua destilada hasta alcanzar un volumen de 10 mL. El material vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido en mortero y se le adicionó inmediatamente 700 µL buffer de lisis precalentado a 65 °C, la solución se mezcló vigorosamente en vórtex y se incubó a 65 °C durante 5 min (agitando constantemente). Posteriormente se añadió 1 volumen de cloroformo–alcohol isoamílico 49:1, agitando vigorosamente durante 20 s y centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min. Seguido se recuperó la parte acuosa y pasó a un microtubo nuevo, añadiendo 1 volumen de fenol–cloroformo 1:1, seguido de una centrifugación a 13,000 rpm durante 10 min, al finalizar se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.3 volúmenes de acetato de sodio 3 M, la mezcla se incubó a -20 °C durante toda la noche. Se continuó centrifugando por 15 min a 13,000 rpm, se decantó todo

el sobrenadante teniendo cuidado de no despegar la pastilla del fondo. Para los lavados de la pastilla se añadió 1 mL de etanol al 80 %, agitando vigorosamente, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, se decantó el etanol y la pastilla se dejó secar parcialmente, finalmente se resuspendió en 30 μ L de agua tratada con DPEC y se guardó a -20 °C hasta su uso. Se comprobó la integridad y calidad del ARN mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1 % a 90 volts durante 40 min utilizando TAE como buffer de carga.

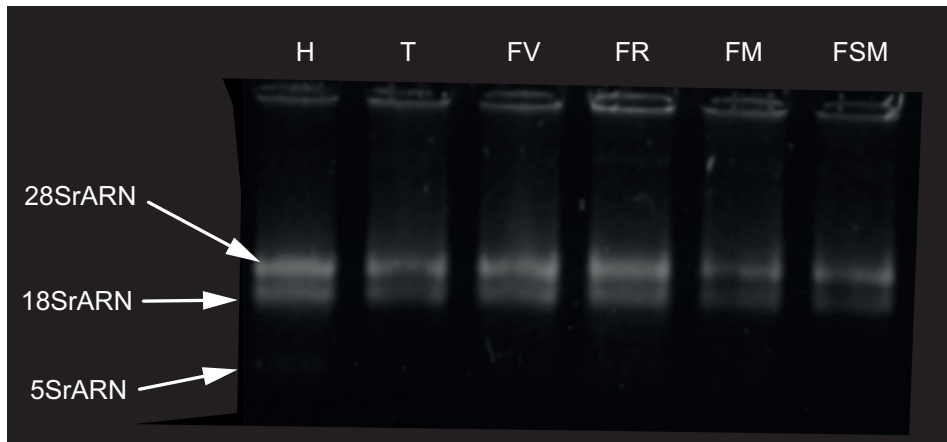


Figura 10.16. Muestras de ARN de diferentes tejidos de la guayaba. H) Hoja, T) Tallo, FV) Fruto verde, FR) Fruto rayado, FM) Fruto maduro, FSM) Fruto sobre maduro.

Glosario

Codón: grupo de 3 nucleótidos que codifican para un aminoácido específico.
ARNm: tipo de ARN de cadena única que participa en la síntesis de proteínas.
ARN Polimerasa II: Enzima encargada de “leer” la cadena de ADN y formar ARNm en el proceso de transcripción.

De novo: Que se origina

Cromatina: ADN enrollado en proteínas que conforma a los cromosomas

Promotor: Secuencia de ADN que da inicio al proceso de transcripción.

Terminador: Secuencia de ADN que finaliza el proceso de transcripción.

Polipéptido: Cadena de aminoácidos

Splicing: Proceso de remoción de intrones de un ARNm

Bucle: Que da una vuelta, tiene forma de broche de pelo.

Adaptador: Secuencia nucleotídica específica de reconocimiento para sistemas de secuenciación Illumina.

Adenilación: Proceso mediante el cual se agrega un grupo adenilo del adenosintrifosfato a una molécula aceptora.

Dideoxicitidina: Nucleósido obtenido a partir de la remoción de los grupos OH⁻ de una citosina.

Abreviaturas

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNp: ácido ribonucleico pequeño

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

ARNip: ácido ribonucleico de interferencia pequeño

miARN: ácido ribonucleico micro

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Pol II: ARN Polimerasa II

tARN: ácido ribonucleico de transferencia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Retro transcripción de la Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

AGO1: proteína argonauta 1

RISC: ARN-induced silencing complex

DEPC: dietil pirocarbonato

ATP: Adenosín trifosfato

RPM: revoluciones por minuto

ARNasa: ácido ribonucleico endonucleasa

CTAB: bromuro de cetrimonio

EDTA: ácido tetraacético etildiamina

HCl: ácido clorhídrico

NaCl: Cloruro de sodio

TAE: Tris-base-ácido acético-EDTA

Bibliografía

- Achkar, P., Natalia, Damián, A., Cambiagno, Pablo, A., Manavella. (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1034-1044.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Posttranscriptional controls. *Molecular Biology of the Cell* (4ta ed.). Nueva York, NY: Garland Science.
- Bai, Selinge, Yunyun, Tian, Chao, Tan, Shunbuer, Bai, Jinfeng, Hao, & Agula, Hasi. (2020). Genome-Wide Identification of MicroRNAs Involved in the Regulation of Fruit Ripening and Climacteric Stages in Melon (*Cucumis Melo*). *Horticulture Research*, 7(1).
- Berg, J., M., Tymoczko, J., L. & Stryer, L. (2002). Eukaryotic protein synthesis differs from prokaryotic protein synthesis primarily in translation initiation. In *Biochemistry*. (5th ed.). New York, NY: W. H. Freeman.
- Bi, Fangcheng, Xiangchun, Meng, Chao, Ma, & Ganjun, Yi. (2015). Identification of MiRNAs Involved in Fruit Ripening in Cavendish Bananas by Deep Sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15.
- Carbone, Fabrizio, Leonardo, Bruno, Gaetano, Perrotta, Maria, B., Bitonti, Innocenzo, Muzzalupo, & Adriana, Chiappetta. (2019). Identification of MiRNAs Involved in Fruit Ripening by Deep Sequencing of *Olea europaea* L. Transcriptome. *PLOS ONE*, 14(8), 1–22.
- Cris, Kuhlemeier. (1992). Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Molecular Biology*, 19, 1-14.
- Egan, A., J., Schlueter & D., Spooner. (2012). Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany*, 99(2), 175-185.
- Felipe, F., Nick, M., Seung, Y. & Rodrigo, G., (2008). The rules of gene expression in plants: Organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 438.
- Guo, Da Long, Qiong, Li, Wen, Q., L, Guo, H., Zhang, & Yi, He, Yu. (2018). MicroRNA Profiling Analysis of Developing Berries for ‘Kyoho’ and Its Early-Ripening Mutant during Berry Ripening. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–16.
- Han, Yuanfang, Guosong, Chen, Heying, Zhou, Qing, Zhang, Ling, Qin, & Yu, Xing. (2019). Identification of Novel and Conserved MicroRNAs Invol-

- ved in Fruit Development and Ripening in *Fragaria vesca*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 88(2), 1–13.
- Hou, Yanming, Lulu, Zhai, Xuyan, Li, Yu, Xue, Jingjing, Wang, Pengjie, Yang, Chunmei, Cao, Hongxue, Li, Yuhai, Cui, & Shaomin, Bian. (2017). Comparative Analysis of Fruit Ripening-Related MiRNAs and Their Targets in Blueberry Using Small RNA and Degradome Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).
- Jannatul, F., Syed, S., Hussian & Bu-Jun, Shi. (2015). Role of microARN in plant drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 293-305.
- Johana, C., Soto, S. & Camilo, E., López, C. (2012). ARN-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.
- Kim, V., Narry, & Jin, Wu, Nam. (2006). Genomics of MicroRNA. *Trends in Genetics*, 22(3), 165–73.
- Li, Fangfang, Weidi, Wang, Nan, Zhao, Bingguang, Xiao, Peijian, Cao, Xingfu, Wu, Chuyu, Ye, *et al.* (2015). Regulation of Nicotine Biosynthesis by an Endogenous Target Mimicry of MicroRNA in Tobacco. *Plant Physiology*, 169(2), 1062–71.
- Marguerat, S. & J., Bahler. (2010). ARN-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 569-579.
- Metzker, M. (2010). Sequencing technologies the next generation *Nature Reviews Genetics*, 11, 31-46.
- Millar, A., Allan, Lohe, & Gigi, Wong. (2019). Biology and Function of MiR159 in Plants. *Plants*, 8(8).
- Onik, Jakaria, Chowdhury, Xiaoja, Hu, Qiong, Lin, & Zhidong, Wang. (2018). Comparative Transcriptomic Profiling to Understand Pre- and Post-Ripening Hormonal Regulations and Anthocyanin Biosynthesis in Early Ripening Apple Fruit. *Molecules*, 23(8), 1–19.
- Park, Y., S., Kim, S., K., *et al.* (2019). The transcriptome analysis of the *Arabidopsis thaliana* in response to the *Vibrio vulnificus* by RNA-sequencing. *PLOS ONE*, 14(12), e0225976.
- Proudfoot, N., A., Furger & M., Dye. (2002). Integrating ARNm Processing with Transcription. *Cell*, 108, 501-512.
- S., Gharat & P., Shaw. (2016). Computational prediction and experimental validation of a novel miARN in *Suaeda maritima*, a halophyte. *Genetics and Molecular Research*, 15.

- Sarwar, M., B., Ahmad, Z., & Rashid, B. (2019). *De novo* assembly of *Agave sisalana* transcriptome in response to drought stress provides insight into the tolerance mechanisms. *Sci Rep*, 9, 396.
- Schwab, Rebecca, Javier, F., Palatnik, Markus, Riester, Carla, Schommer, Markus, Schmid, & Detlef, Weigel. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517–27.
- Sun, L., Wang, J., Song, K., *et al.* (2019). Transcriptome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) shoots responsive to cadmium stress. *Sci Rep*, 9, 10177.
- Tsuzuki, Masayuki, Ryuichi, Nishihama, Kimitsune, Ishizaki, Yukio, Kurihara, Minami, Matsui, John, L., Bowman, Takayuki, Kohchi, Takahiro, Hamada, & Yuichiro, Watanabe. (2016). Profiling and Characterization of Small RNAs in the Liverwort, *Marchantia Polymorpha*, Belonging to the First Diverged Land Plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 359–72.
- Voinnet, Olivier. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), 669–87.
- Wang, Z., M., Gerstein & M., Snyder. (2009). ARN-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews, Genetics*, 10, 57–63.
- Wu, Juxun, Saisai, Zheng, Guizhi, Feng, & Hualin, Yi. (2016). Comparative Analysis of MiRNAs and Their Target Transcripts between a Spontaneous Late-Ripening Sweet Orange Mutant and Its Wild-Type Using Small RNA and Degradome Sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–17.
- Xin, Chengqi, Wanfei, Liu, Qiang, Lin, Xiaowei, Zhang, Peng, Cui, Fusen, Li, Guangyu, Zhang, *et al.* (2015). Profiling MicroRNA Expression during Multi-Staged Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) Fruit Development. *Genomics*, 105(4), 242–51.
- Zeng, Shaohua, Yongliang, Liu, Lizhu, Pan, Alice, Hayward, & Ying, Wang. (2015). Identification and Characterization of MiRNAs in Ripening Fruit of *Lycium Barbarum* L. Using High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–15.

Capítulo 11

Estudio del estrés abiótico en plantas

Sandra Hernández Camacho (q.e.p.d.)
Gloria Viviana Cerrillo Rojas
Universidad Autónoma de Durango Campus Zacatecas

José Francisco Morales Domínguez
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas, Universidad
Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Los factores ambientales desfavorables como la deshidratación, salinidad, elevadas o muy bajas temperaturas, entre otros, limitan el crecimiento y desarrollo de muchas especies vegetales alrededor del mundo, causando incluso la muerte. Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que les permiten restablecerse y tolerar condiciones de diferentes tipos de estrés. Estas especies tolerantes al estrés son de gran interés como modelos de estudio para conocer los mecanismos genéticos que les confieren esa resistencia y se han realizado diversas investigaciones encaminadas a este propósito. Por ejemplo, el análisis e identificación de genes responsables en la tolerancia al frío, sequía, calor, metales pesados entre otros y posteriormente su aislamiento e introducción

y expresión en plantas de interés agrícola. El establecimiento *in vitro* de plantas tolerantes al estrés abiótico ha permitido identificar mejor los genes asociados a este tipo de estrés, no obstante, aún falta camino por recorrer y es necesario continuar identificando los genes codificantes para enzimas clave en las rutas metabólicas asociadas con la resistencia a distintos factores ambientales adversos. En este capítulo se aborda algunos tipos de estrés abiótico en plantas y sus genes asociados, así como su identificación y estudios de expresión.

Antecedentes

Los diferentes tipos de estreses como la sequía, la salinidad, el frío, las altas temperaturas y los metales pesados, causan cerca del 50% la reducción en la producción de cultivos en todo el mundo. Las plantas al ser organismos sésiles están continuamente expuestas a diversos cambios en las condiciones ambientales. De esta manera, las variaciones en el medio ambiente que involucran tanto el estrés biótico como abiótico tienen efectos negativos en la mayoría de los cultivos económicamente importantes.

En especial el estrés abiótico puede resultar en múltiples pérdidas para las plantas y los cultivos agrícolas, ya que están expuestas a un rango de diferentes tipos de estreses en forma individual o de manera simultánea; como son la alta salinidad y calor, deshidratación y calor, metales pesados y calor, que han demostrado dañar más a la planta que un solo tipo de estrés a la vez (Fig. 11.1). Por lo tanto, a través del tiempo, las plantas han desarrollado procesos adaptativos, tanto a nivel molecular, como celular y sistémico, los cuales contribuyen a incrementar la tolerancia del estrés (Fig. 11.2).

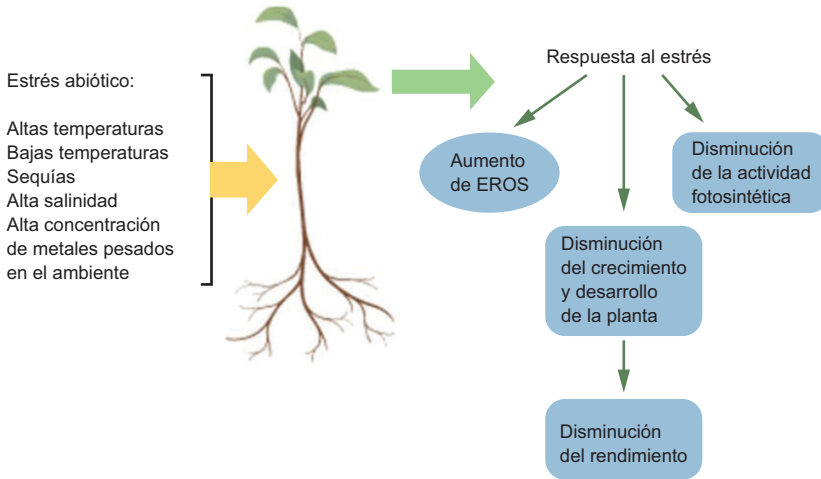


Figura 11.1. Efectos del estrés abiótico en plantas. Las altas y bajas temperaturas, la sequía, salinidad y alta concentración de metales en el medio ambiente, inducen una respuesta en la planta tales como la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), disminución de la fotosíntesis, crecimiento y desarrollo y rendimiento en las plantas. Elaboración propia.

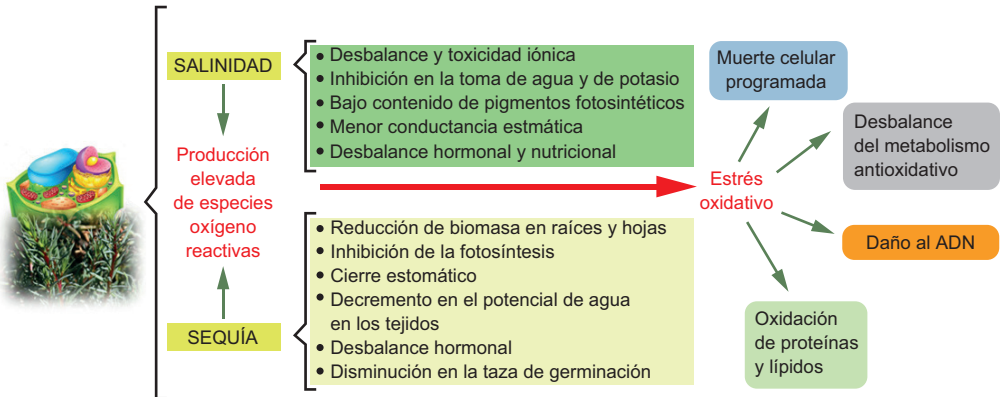


Figura 11.2. Esquema ilustrativo del estrés en plantas causado por salinidad y por sequía. Elaboración propia.

El conocimiento acerca de la respuesta de las plantas ante el estrés abiótico ha avanzado mucho en los últimos años gracias a la secuenciación del genoma de algunas plantas y de varias herramientas de genómica y proteó-

mica. Sin embargo, los mecanismos de señalización del estrés abiótico han probado ser muy complejos y hay mucho que aprender todavía. A la fecha, solamente unos cuantos genes que juegan un rol crítico en la adaptación de la planta al estrés han sido plenamente identificados. Pocas rutas mediadoras de respuesta a estrés han sido descritas por completo. En este capítulo se verán algunos de los principales genes y metabolitos que intervienen en los diferentes tipos de estrés abiótico permitiendo que las plantas puedan resistir las condiciones adversas y sobrevivir.

Compuestos bioquímicos y moleculares como respuesta

Metabolitos primarios y secundarios

Los principales metabolitos primarios y secundarios que se sintetizan y se acumulan en respuesta al estrés por calor en plantas son: la prolina (Pro), la glicina betaína (GB), carbohidratos tales como azúcares solubles o alcoholes de azúcar (polioles) o compuestos de amonio terciario y cuaternario. Estos compuestos también conocidos como osmolitos aumentan la estabilidad de las proteínas y estabilizan la estructura de la bicapa de membrana cuando las plantas están bajo estrés térmico, por lo tanto, su acumulación es un mecanismo adaptativo importante de las plantas sometidas a este tipo de estrés (Fig.11.3).

Por ejemplo, se ha observado que en varias plantas la acumulación de Pro, GB y azúcares solubles es necesaria para regular las actividades osmóticas y proteger las estructuras celulares del aumento de las temperaturas y mantener el equilibrio hídrico celular, la estabilidad de la membrana y amortiguar el potencial redox.

Para verificar la protección que brindan los osmoprotectores contra el calor en las plantas, se han realizado varios estudios moleculares, por ejemplo; se desarrollaron plantas transgénicas de tabaco con el gen Δ^2 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) que está involucrado en la ruta biosintética de la prolina. Estas plantas mostraron una mayor acumulación de prolina con un potencial osmótico foliar más negativo y una mayor producción de pigmentos protectores involucrados en el ciclo de la xantofila.

Otro tipo de osmoprotector relacionado con el estrés por calor es la GB. En muchas plantas, se ha visto que la producción de GB en cloroplastos mantiene la activación de la Rubisco y prevé su inactivación térmica. Como ejemplo, en plantas de maíz y caña de azúcar sometidas a altas temperaturas se observó altos niveles de acumulación de GB, mientras que otras plantas como arroz, *Arabidopsis* y tabaco no la producen bajo esas condiciones.

Los metabolitos secundarios como los flavonoides, las antocianinas y los esteroides vegetales, también están involucrados en la respuesta bajo estrés por calor. Existen evidencias en varias plantas como tomate y sandía que demuestran que los compuestos fenólicos se inducen y se acumulan protegiendo a la planta contra compuestos tóxicos. Las antocianinas tienen un papel importante en la disminución del potencial osmótico de las hojas; lo que significa mayor absorción y una menor pérdida de agua por transpiración. Estas propiedades de las antocianinas permiten que las hojas respondan rápidamente ante el estrés por calor o a los cambios bruscos ambientales. Los carotenoides protegen a las plantas de varias tensiones; por ejemplo, las xantofilas, terpenoides como el isopreno o el tocoferol estabilizan y protegen la membrana lipídica. En estudios moleculares, se ha visto que en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *chyB* que codifica para la β -caroteno hidroxilasa (una enzima activa en la vía biosintética de la zeaxantina) muestra una mayor tolerancia al aumento de la temperatura, ya que se sugiere que la zeaxantina está involucrada en la prevención del daño oxidativo en las membranas.

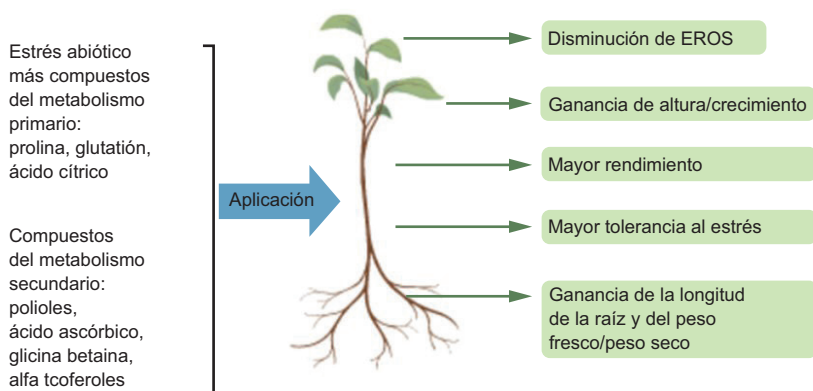


Figura 11.3. Efectos de los metabolitos aplicados a las plantas. Elaboración propia.

Estrés por calor

En las últimas décadas el cambio climático ha sido un gran problema para la seguridad alimentaria ya que afecta directamente a todas las plantas y en especial a las de cultivo. Se prevé que para la próxima década aumente la temperatura global en un 0.3% lo que provocaría que el estrés por calor sea un importante factor de estrés abiótico global para muchos cultivos. El estrés por calor causa severos daños en el desarrollo, morfología, fisiología, y en las rutas bioquímicas y moleculares de las plantas en todas las etapas vegetativas y reproductivas. Ante esta situación, las plantas responden de manera inmediata e inducen mecanismos de aclimatación evitando el estrés a corto plazo, ya que reorientan sus hojas para crear espacio, aceleran la transpiración para el enfriamiento y alteran la composición lipídica de la membrana. No solo es esta respuesta lo que las plantas hacen sino también exhiben un conjunto característico de respuestas celulares y metabólicas tales como cambios en la organización de las estructuras celulares, disminución en la síntesis de proteínas constitutivas y la transcripción y traducción acelerada de proteínas de choque térmico o Heat Shock Proteins (HSP, por sus siglas en inglés), la producción de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y antioxidantes y otras moléculas protectoras.

Uno de los síntomas típicos del estrés por calor es la senescencia tisular, que se caracteriza por daño a la membrana asociado con el aumento de la fluidez de los lípidos de membrana, la peroxidación lipídica y la degradación de proteínas en diversos procesos metabólicos. Para mantener la fluidez de la membrana, las plantas aumentan el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, modulando su metabolismo en respuesta al aumento de las temperaturas. En estos procesos no solo se ve afectada la membrana, sino también la actividad de enzimas involucradas en la acumulación de almidón y la síntesis de sacarosa, mediante la regulación de sus genes específicos.

Genes relacionados con el estrés por calor

La característica más importante contra el estrés por calor o la termotolerancia es la producción masiva de las proteínas HSP. Sin embargo, como la tolerancia al calor es un carácter multigénico, numerosos rasgos bioquímicos y metabólicos también están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la

termotolerancia: actividad antioxidante, insaturación de lípidos de membrana, expresión y traducción génica, estabilidad de proteínas y acumulación de solutos compatibles. También hay que tener en cuenta que las respuestas de las plantas a las altas temperaturas dependen de los parámetros genotípicos, ya que ciertos genotipos son más tolerantes.

Varios estudios han revelado que también son importantes los factores de transcripción como el factor de transcripción heat shock (transcription factor HSF). Existen varios genes que desempeñan un papel menos crítico ya que su expresión disminuye; entre estos están los HSP101, HSA32, HSFA1, HSFA3, que han demostrado tener poco impacto en la tolerancia al calor. Esto indica que existe una red reguladora compleja que ofrece una protección diferencial contra el estrés por calor. Por ejemplo, en mutantes de *Arabidopsis* se ha visto que en ausencia del factor de transcripción HSFA1, éstas muestran un nivel mínimo pero significativo de termotolerancia adquirida, probablemente debido a la inducción de un pequeño número de genes regulados por otros factores de transcripción como bZIP28. Sin embargo, los HSP son de particular importancia en las reacciones de termotolerancia y actúan como chaperonas moleculares para prevenir la desnaturalización o la agregación de proteínas diana, así como para facilitar el repliegue de proteínas.

También se ha visto que varios tipos de proteasas desempeñan un papel importante para regular las respuestas de las plantas al estrés por calor. Por ejemplo, se ha encontrado que la proteasa FtsH11 de *Arabidopsis* está involucrada en la tolerancia general a las altas temperaturas ya que actúa a través de la degradación de proteínas de la membrana tilacoide no ensambladas. Otro ejemplo es la proteasa HOT5, que codifica un alcohol deshidrogenasa que funciona como nitrosoglutamil reductasa, también es necesario para la supervivencia bajo calor, revelando un posible papel del óxido nítrico (NO) en la termotolerancia y el desarrollo de las plantas.

Otro tipo de proteínas involucradas en la protección contra calor en plantas y en varios tipos de estrés son las proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA por las siglas en inglés Late Embryogenesis Abundant), la ubiquitina y las dehidrinas que desempeñan un papel importante en la protección contra el calor y el estrés por sequía. Por ejemplo, las proteínas LEA pueden prevenir la agregación y proteger a la enzima citrato sintasa (involucrada en la producción de ATP) de condiciones de deshidratación como el calor y el estrés por sequía. Del mismo modo, la síntesis de ubiqui-

tina y ubiquitina conjugada durante los primeros 30 minutos de exposición confiere un mecanismo importante de tolerancia al calor en el mezquite y la soja que experimentan estrés por calor.

La familia AP2/ERF son factores de transcripción (FTs) específicos de plantas, que incluye a las DREBs (por sus siglas en inglés, dehydration-responsive element-binding protein), que son activadores de la expresión de los genes de respuesta ante estrés abiótico. Por ejemplo, el DREB2 funciona durante la respuesta ante estrés por calor, estrés osmótico y deshidratación mientras que DREB2A y DREB2B son inducidos a temperaturas altas. En *Arabidopsis* DREB2A juega un papel importante: una delección de esta región transforma DREB2A en una forma constitutivamente activa (DREB2A CA), la sobreexpresión de DREB2A CA en *Arabidopsis* transgénica potencia la tolerancia a altas temperaturas.

OsDREB2B codifica FTs tipo DREB2A para mejorar la tolerancia al estrés por calor en arroz. La expresión de OsDREB2B es regulada a través de un splicing alternativo y genera dos tipos de transcritos, nombrados, en su forma funcional, proteínas de longitud completa, y en su forma no funcional, proteínas con codones de paro prematuros.

Estrés por frío

Se ha observado que un bajo flujo de fotones fotosintéticos puede repercutir en una baja concentración local de azúcares, lo cual puede hacer que ciertos tejidos sean más susceptibles a daño por bajas temperaturas. El daño por congelamiento es debido generalmente a una deshidratación celular acompañada de formación de hielo extracelularmente, en ambos casos el metabolismo celular se ve interrumpido. El gen *OpsDHN1* codifica para una dehidrina que se sobre expresa ante la presencia de frío y su expresión va en aumento cuando hay un proceso de aclimatación. Un ejemplo de la excelente adaptación que pueden tener las plantas ante un estrés por temperaturas extremas son el cactus arborescente sin espinas *Nopalea cochenillifera*, nativo del sur de México y *Opuntia robusta* que es otro cactus arborescente, nativo del centro de México, ambos son importantes para la cosecha de la tuna (fruto comestible); estas especies pueden producir biomasa sustancial en regiones semiáridas sin irrigación. En las especies antes mencionadas, se analizó la tolerancia a distintas

temperaturas en tallos y raíces y el efecto que tiene la aclimatación a la sequía; y se observó la muerte de la mitad de las células de tallos y raíces cuando se expusieron 60 minutos a temperaturas de 7 °C y a 57 °C; sin embargo, cuando se aclimataron paulatinamente a altas y bajas temperaturas, la muerte se dio a los 4 °C y a los 65 °C.

La aclimatación envuelve muchos factores, por ejemplo, se ha observado que la aclimatación de los tallos de *Ferocactus viridescens* y *Opuntia ficus* es similar a la de *N. cochenillifera* y *O. robusta*, pero el rango de tolerancia alcanzado es mucho más amplio en especies como *Opuntia fragilis* que se extiende por norte América hasta Alberta, Canadá, y que cuando es aclimatada puede tolerar 60 minutos a -40°C, que es aparentemente la más alta tolerancia a bajas temperaturas que se ha demostrado que existe en las cactáceas.

También se ha demostrado que la acumulación endógena de ABA se ve modificada con los cambios de temperatura, esto es, la concentración de ABA va aumentando conforme la temperatura va disminuyendo, de tal modo que, a temperaturas de 30 a 20 °C se obtienen cantidades de 0.4 pmol/g de peso fresco de ABA, pero al disminuir la temperatura de 10 a 0 °C, el peso fresco de ABA en *O. ficus-indica* se ha logrado incrementar a 84 pmol/g y a 49 pmol/g en *O. fragilis*. La aplicación exógena por aspersión de ABA, ha logrado que algunas plantas potencien su tolerancia al frío incrementando su resistencia 0.5 °C en *F. viridescens*, 4.1 °C en *O. ficus-indica*, pero en *O. fragilis* el aumento en la tolerancia fue de hasta 23.4 °C.

Estrés por sequía

En las últimas décadas y como consecuencia del cambio climático en muchas partes del mundo, la escasez de las lluvias ha sido uno de los problemas graves para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Sin embargo, bajo condiciones naturales y a lo largo del tiempo, las plantas han sufrido algún tipo de estrés por déficit hídrico lo que ha provocado que algunas adquieran resistencia o tolerancia ante estas situaciones.

Por ejemplo, en el estrés por sequía el decremento de agua ocurre debido a su escasez en el suelo y/o en la atmosfera. A diferencia del estrés por frío, en el que la disminución en el contenido celular de agua ocurre debido a la llamada sequía fisiológica causada por la inhabilidad para transportar el

agua disponible del suelo a las células vivas, principalmente a las de las hojas mesófilas. Mientras que en el estrés causado por salinidad la falta de agua en la célula es consecuencia del decremento del potencial de agua externo que se genera durante el aumento en la concentración de iones (principalmente Na⁺ y Cl⁻) y que causa dificultad en la toma de agua por las raíces y su translocación a las actividades metabólicas de las células activas.

De acuerdo a los requerimientos de agua, las plantas se pueden clasificar en tres grupos: 1) las hidrófitas, son las plantas que están adaptadas vivir total o parcialmente sumergidas en agua; con un potencial hídrico negativo entre -5 a -10 bares. 2) las plantas mesófitas son aquellas que están adaptadas a un aporte moderado de agua tolerando potenciales hídricos no más negativos de -20 bares, y 3) si están adaptadas a ambientes áridos tolerando potenciales hídricos no más negativos de -40 bares, entonces son llamadas xerófitas.

Ante la carencia de agua, y a través del tiempo algunas plantas han desarrollado evolutivamente adaptaciones tanto a nivel morfológico como anatómico, celular y molecular, que les permiten sobrevivir en condiciones de constante estrés hídrico. De esta forma, se ha visto que algunas plantas que son capaces de adquirir más agua o retenerla y hacer un uso más eficiente, podrán tener resistencia al estrés por sequía. La aplicación de nuevas tecnologías en biotecnología ha permitido demostrar que durante el estrés por sequía la expresión de genes y la proteómica se ven alterados. Por ejemplo, una de las principales respuestas por parte de la planta es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico.

En las plantas bajo estrés por sequía, hasta 10 % de los genes de su genoma codifican para FTs y se clasifican en diferentes familias de genes como AREB, DREB, MYB, WRKY, NAC y bZIP de acuerdo a las estructuras de sus dominios de unión al ADN. Se ha reportado que varios genes de FT responden al estrés por sequía vía dependiente/independiente de ácido abscísico (ABA). Los genes que son activados por la hormona ABA codifican para proteínas envueltas en la regulación de la transducción de señales y la expresión de genes inducidos por estrés, incluyendo los FT. Estos FT interactúan específicamente con elementos-Cis ubicados en la región promotora de los genes que regulan. Las modificaciones genéticas de la expresión de estos genes regulatorios pueden influenciar grandemente la tolerancia de la planta al estrés,

porque ellos a futuro regularán muchos genes de respuesta a estrés en determinado tiempo.

Por ejemplo, el factor AREB/ABF (AREB: elemento de respuesta y unión a proteínas ácidas; ABFs: factor de unión a AREB) es conocido como el mayor activador transcripcional que modula la expresión de genes durante la señalización dada por ABA cuando está presente un estrés por deshidratación; y proteínas tipo quinasas que son receptores de superficie celular que median la transducción de señales de célula a célula. Un ejemplo de estas proteínas en plantas es el receptor tipo quinasa (RLK receptor like kinase, por sus siglas en inglés) rico en leucinas repetidas (LRR-RLK) la cual contiene tres dominios funcionales: un dominio extracelular que percibe señales, un dominio transmembranal que ancla la proteína con la membrana y un dominio quinasa intracelular que transduce la señal hacia el extremo 3' vía autofosforilación, seguida de la subsecuente fosforilación de un sustrato específico.

Como se mencionó anteriormente, el ABA está relacionado con la expresión diferencial de genes en plantas que están bajo ciertos tipos de estrés. Un tipo de genes que es inducido por el ABA son los que codifican para proteínas intrínsecamente desordenadas (PINEs por sus siglas en inglés). Estas proteínas son importantes para la célula de la planta ya que participan en la respuesta de los organismos a distintos estímulos o condiciones desfavorables para la célula. Entre las proteínas PINEs, se encuentran las hidrofílicas que son proteínas no estructuradas o flexibles que participan en la respuesta a condiciones adversas. La alta producción y acumulación de estas proteínas está asociada notablemente con la exposición de las células o de los organismos a condiciones de limitación de agua, y también en las células que transitan por etapas de desarrollo que involucran un déficit hídrico y en estructuras u órganos bajo deshidratación severa.

Las hidrofílicas, también conocidas como proteínas LEA, fueron primeramente aisladas de semillas de algodón acumuladas en la embriogénesis tardía. Subsecuentemente fueron encontradas en semillas de muchas plantas, así como también en órganos vegetativos, especialmente bajo condiciones de frío, sequía o elevada salinidad. Entre estas proteínas están las LEA D-11 y D-13 y la expresión de sus genes está mediada por el ABA.

Estudios moleculares de los genes LEA

Se han realizado varios análisis moleculares donde se evidencia directamente el papel en la tolerancia a la sequía de algunas proteínas LEA. Por ejemplo, el gen que codifica para la proteína Em de trigo (LEA 1) que tiene la característica de ser altamente hidrofílica, fue sobre expresado en levadura y confirió resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico. Otro ejemplo es el gen que codifica a la proteína HVA1 de cebada (LEA 3), que fue introducidos mediante ingeniería genética a plantas de arroz y se observó que le confiere resistencia a estrés hídrico y salino. Las levaduras son organismos modelo para analizar la expresión de diferentes genes bajo varios tipos de estrés, por ejemplo, el mismo gen HVA1 fue expresado en levadura, y se observó que le confiere resistencia a estrés salino y a congelamiento. Otros genes como el LE25 de tomate y el LE4, también confirieron a las levaduras resistencia a estrés salino y a congelamiento. Los datos obtenidos a partir de la sobre expresión de éstas y otras proteínas LEA apoyan la hipótesis de que diferentes proteínas LEA desempeñan un papel importante en la protección contra la deshidratación celular. Otro elemento de respuesta a sequía es el CE3 (elemento de acoplamiento) encontrado en varios genes LEA como *BcDh2* y *HVA1* que actúa también como un elemento coactivador de los elementos de respuesta ABRE.

Estrés por salinidad

La salinización del suelo, es uno de los principales factores abióticos ambientales que causan grandes pérdidas económicas y disminución de crecimiento en la mayoría de los cultivos. Sin embargo, las plantas a través de millones de años de evolución han adquirido diversidad genética y se han adaptado a las perturbaciones ambientales como la elevada salinidad del suelo. La salinidad, puede causar en las plantas importantes desequilibrios (Fig.11.2), y se agrava más este problema cuando se acoplan con otros factores medioambientales que alteran la composición y estructura de la membrana, la alteración de la fotosíntesis el desbalance osmótico y la citotoxicidad iónica del Na^+ , Cl^- y SO_4^- . Particularmente, la citotoxicidad iónica es causada por el remplazo de Na^+ por K^+ en reacciones bioquímicas ocasionando cambios conformacionales con

pérdida de función en proteínas, ya que los iones Na^+ y Cl^- interfieren con las interacciones no covalentes entre los aminoácidos.

La alteración del balance metabólico causada por toxicidad iónica, estrés osmótico y deficiencias nutricionales bajo salinidad pueden favorecer también al estrés oxidativo, mientras que la entrada de Na^+ a través de canales iónicos no específicos puede causar la despolarización de la membrana que activa los canales de Ca^{2+} y esto genera oscilaciones de Ca^{2+} y señales de estrés salino.

Aunque todas las plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés, sólo las plantas halófitas pueden sobrevivir y crecer en extrema salinidad, ya que poseen proteínas específicas que ayudan a disminuir los efectos de la salinidad. Para superar los efectos dañinos del estrés osmótico, las halófitas realizan modificaciones en su fisiología y anatomía siguiendo una serie de mecanismos que les permiten mantener o restablecer una actividad metabólica adecuada tales como: la regulación de agentes oxidantes, la sobreexpresión de factores de transcripción, la regulación en el transporte de agua a través de la membrana, modificaciones en la pared celular, la biosíntesis de osmoprotectores y la compartimentalización del sodio.

La salinidad tiene varios efectos sobre las plantas, por ejemplo, en la fotosíntesis existe una reducción del área foliar, en el contenido de clorofila, en la conductancia estomática, y una disminución de la eficiencia del fotosistema II. También influye en el ciclo y la diferenciación celular ya que los detiene temporalmente reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínas quinasa, lo que trae como resultado menos células en los meristemos, y un crecimiento limitado. Todo esto genera un desequilibrio nutritivo debido a la reducción del potencial hídrico del suelo, causado por la elevada concentración de Na^+ y Cl^- y la disminución en la disponibilidad de agua.

Respuesta de las plantas ante salinidad

De acuerdo con su tolerancia a la salinidad, las plantas se pueden clasificar en dos grupos: 1) las halófitas, que toleran altas concentraciones de sales, y 2) las glicófitas que no toleran la presencia excesiva de sales. Existen categorías intermedias entre ambos grupos como son las pseudohalófitas que son plantas que, sin ser halófitas, requieren sodio como elemento esencial. La sensibilidad de las plantas a las sales varía durante el desarrollo fenológico, dependiendo de la especie, el cultivar y factores ambientales.

Para superar los daños del estrés por salinidad, algunas plantas tienen que hacer cambios en su fisiología y anatomía que les permitan restablecer la actividad metabólica adecuada. Entre estos procesos está la compartimentalización del sodio en las vacuolas, la sobreexpresión de FTs, la regulación en el transporte de agua a través de la membrana, las modificaciones en la pared celular y la biosíntesis de osmoprotectores. Los osmoprotectores son compuestos de bajo peso molecular también llamados solutos compatibles, debido a que no interfieren con las reacciones bioquímicas normales, y se acumulan en el citoplasma para mantener y/o restaurar el balance iónico. Los solutos compatibles incluyen principalmente Prolina (Pro) y glicina betaína (GB). La GB actúa estabilizando la estructura cuaternaria de las proteínas y en su biosíntesis participan los genes codificantes de la S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS), fosfoetanolamina metil transferasa (PEAMT), colina monooxigenasa (CMO) y betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (Fig.11.4)

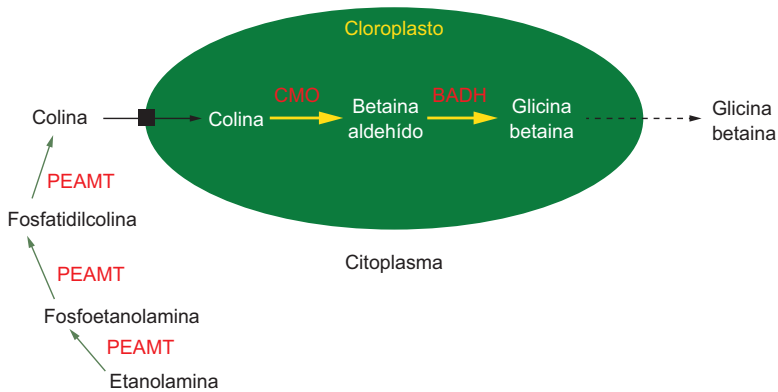


Figura 11.4. Ruta metabólica de la GB. Elaboración propia

A nivel fisiológico, la respuesta adaptativa al NaCl en algunas plantas es altamente visible en términos de sobreexpresión de los genes relacionados con la síntesis de GB. Por ejemplo, en *Suaeda marítima*, se demostró que la expresión a nivel de transcripción de los genes *BADH*, *PEAMT* y *CMO* fue alta a los dos días de tratamiento salino; donde *CMO* fue el gen de mayor regulación

durante la síntesis de GB. Con respecto a PEAMT, el análisis de transcriptoma de *Hordeum vulgare* mostró aumento en su actividad como una respuesta de tolerancia a NaCl. Además de la GB, la Pro es otro de los osmoprotectores que se acumulan en las plantas como respuesta al estrés salino. En su biosíntesis la enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) es la que limita la velocidad de la reacción y es inhibida por Pro (Fig. 11.5).



Figura 11.5. Ruta biosintética de la Pro en plantas. Elaboración propia.

Diversos estudios relacionados con la salinidad en plantas como *Oryza australiensis* y *Triticum aestivum* han demostrado la síntesis rápida y la acumulación de Pro libre como estrategia para hacer frente al estrés por salinidad. En otro estudio con *Opuntia streptacantha* bajo estrés por NaCl durante 6, 9 y 11 días, se detectó una disminución del grosor y longitud de la raíz, y una significativa y gradual acumulación de Pro en cladodios jóvenes, dependiente del tiempo y la concentración.

Otros genes que se han encontrado asociados a la tolerancia a salinidad, así como a altas temperaturas y sequía, son los que codifican para varios grupos de proteínas LEA. Por ejemplo, el gen completo Rab16A de arroz que codifica para una proteína LEA tipo 2 fue introducido en plantas de tabaco; estas plantas transgénicas sometidas a altas concentraciones de salinidad, mostraron una acumulación excesiva de la proteína en las hojas respecto a su control. Además, se observó que las líneas transgénicas mostraron un crecimiento y morfología normal, y la germinación de sus semillas mostraron mayor tolerancia a la salinidad con un aumento en la producción de azúcares reductores, prolina y poliaminas. También mostraron una mejor maquinaria antioxidante y un balance mineral más favorable, lo que se reflejó en los reducidos niveles de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica, menor pérdida de clorofila, así como menor acumulación de sodio y mayor acumulación de potasio.

Este tipo de adaptación a suelo salino, es también mediado por transporte activo de iones, mediante proteínas selectivas de membrana, para mantener la homeostasis iónica (Na^+ , K^+ y Ca^{+2}). El transporte del Na^+ desde el citoplasma

hasta la vacuola, realizado por la bomba Na^+/K^+ es dependiente de la actividad V-ATPasa y V-PPasa, estas enzimas establecen un gradiente electroquímico de H^+ en el tonoplasto que energiza el transporte de Na^+ contra el gradiente de concentración, y se ha demostrado que el exceso de sodio que queda almacenado en las vacuolas evita los daños en el citoplasma. Esta compartimentación de Na^+ en las vacuolas es realizada por proteínas selectivas de membrana como la pirofosfatasa inorgánica vacuolar (H⁺-V-PPasa) y el gen codificante de estas proteínas ha mostrado mayor expresión en las plantas que realizan estos procesos, confiriéndoles mayor tolerancia al estrés salino. Por ejemplo, se ha demostrado que el gen de la pirofosfatasa vacuolar (*VppA*), incrementa significativamente su expresión en plantas de *Suaeda aralocaspica* bajo tratamientos de alta salinidad (500 mM de NaCl). Este tipo de genes actualmente están siendo ya utilizados para generar plantas resistentes a salinidad.

También los TFs y las DREB, relacionados con otros tipos de estrés abiótico, han sido aislados de diferentes especies de plantas y se han utilizado para estudiar la tolerancia al estrés. Recientemente en plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen *DREB* de *Suaeda salsa* (*SsDREB*) mostraron una tolerancia a salinidad; mostrando mejor crecimiento, mayor contenido de clorofila, una tasa neta de fotosíntesis, mayor concentración de prolina y una expresión de genes de respuesta a estrés elevada.

La exposición a salinidad cambia también el estado de agua en las plantas y enciende estrategias de ajuste osmótico y control en la toma y pérdida de agua. En este proceso también participan las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP por sus siglas en inglés), las cuales forman parte de las llamadas acuaporinas (AQPs), que son proteínas que facilitan el transporte de moléculas de agua a través de la pared celular. Al respecto se ha demostrado que el gen *TIP1* proveniente de la planta halófito *Panax ginseng* y al utilizarse como transgén en otras plantas aumenta la tolerancia a salinidad.

Otra respuesta al estrés osmótico que causa la salinidad en las plantas es la modificación en la pared celular, esta le permite a la célula extenderse gracias a un grupo importante de proteínas llamadas expansinas. Las expansinas hidrolizan los enlaces entre las microfibras de celulosa de la pared celular para incrementar la movilidad de los polímeros que forman la matriz; la sobreexpresión de los genes que las codifican ha sido demostrada en correlación directa con el crecimiento saludable de halófitos como *Suaeda maritima* y *Suaeda glauca* desarrollándose en medio salino.

En los procesos de tolerancia a estrés salino, las plantas halófitas representan un excelente modelo de estudio, ya que son capaces de sobrevivir y reproducirse en sitios con concentraciones superiores a 200 mM de NaCl, lo que las hace fuentes potenciales de genes de resistencia a salinidad. Sin embargo, el número de halófitas se reduce aproximadamente al 1 % de la flora mundial.

Identificación de genes al estrés abiótico en *Suaeda edulis*: un caso de estudio

La familia de las Amarantáceas, integra halófitos suculentos que son “altamente tolerantes” a la sal, destacando las especies de los géneros *Suaeda* y *Salicornia*, ya que algunas de sus especies diluyen la sal en sus raíces y hojas y han sido utilizadas como modelo para análisis de genes de respuesta a estrés salino.

El género *Suaeda* Forssk. ex Scop., pertenece a la subfamilia Suaedoidae Ulbr. de la familia Chenopodiaceae y alberga alrededor de 110 especies, casi todas, halófitas. Particularmente, *Suaeda edulis* es una planta halófitas que se encuentra en lagos salinos del centro de México. En el municipio Valle de Santiago, Gto., se encuentra el Cráter de la Hoya en Rincón de Parangueo (Fig. 11.7a-b). Las características del cráter son afloramientos rocosos, ígneos y vegetación de bosque tropical caducifolio y con regiones de suelo sódico-salino, formado por la acumulación de NaCl y carbonato de sodio (Na_2CO_3)/ bicarbonato de sodio (NaHCO_3) con un pH que se eleva a más de 9.0. En este tipo de suelos el porcentaje de sodio intercambiable es mayor a 15 y su estructura, permeabilidad y aireación se ven afectadas limitando e impidiendo el crecimiento de los cultivos por su alto contenido de sodio intercambiable y sales solubles.

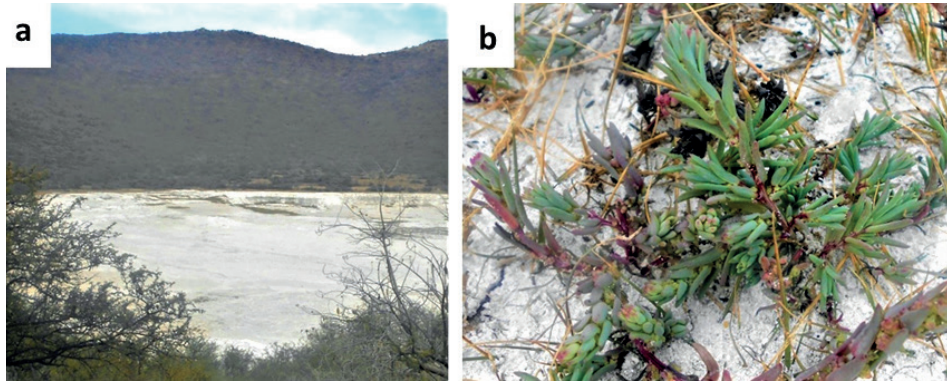


Figura 11.6. Hoya Rincón de Parangueo en Valle de Santiago, Guanajuato, Mex. a) Vista panorámica del cráter, b) *S. edulis* en su hábitat natural.

Por lo que se realizó un estudio en *S. edulis* para su propagación *in vitro* y analizar la presencia y expresión de algunos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad.

Para llevar a cabo esta investigación, se colectaron muestras de *S. edulis* y se establecieron protocolos para la propagación de cultivos *in vitro* y de extracción de ácidos nucleicos y de estudios de expresión de los genes. También se realizó un estudio para determinar los minerales presentes raíz, follaje de la planta, y de muestras de suelo del cráter, mediante cromatografía de gases en el Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Nutrientes Vegetales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La cantidad de sodio detectada en la parte aérea fue casi cuatro veces mayor que la que se detectó en la raíz, lo que refleja la resistencia de la planta a la salinidad más que a sequía. Esto es interesante por el hecho de que el lago-cráter que habita *S. edulis* ha sido ya catalogado como un lago sódico por su composición iónica, predominando en él los carbonatos y bicarbonatos de sodio tal como lo reflejan los resultados del análisis de suelo en este trabajo, en los que se indican valores de pH y conductividad eléctrica elevados que lo clasifican como suelo salino y altamente alcalino.

Los protocolos de propagación *in vitro*, fue con el propósito de mantener a *S. edulis* como modelo de estudio sin provocar disturbios de su hábitat natural, y de allí tomar el material vegetal para análisis de expresión génica entre

las plantas desarrolladas *in vitro* bajo distintas condiciones, y las tomadas directamente del cráter.

Unos de los problemas que se obtuvieron durante la propagación fue la excreción de compuestos fenólicos que oscurecían por completo el medio de cultivo e impedían el desarrollo del explante (Fig. 11.7), sin embargo, se logró implementar un protocolo de propagación *in vitro* a partir de yemas axilares

Respecto al estudio genético, la extracción de ácidos nucleicos fue probando distintos protocolos, hasta obtener ADN puro (Fig.11.8). A partir del ADN y ARN de *S. edulis* se llevó a cabo el análisis de identificación y expresión de los genes SAMS, CMO, BADH y P5CS, que participan en la biosíntesis de los osmoprotectores Pro y GB.

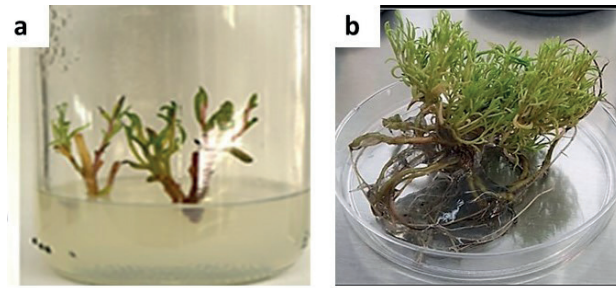


Figura 11.7. Establecimiento *in vitro* y micropropagación de *S. edulis*. a) Plántulas dentro del medio de cultivo Murashige & Skoog. b) Plántulas tomas del cultivo *in vitro*.

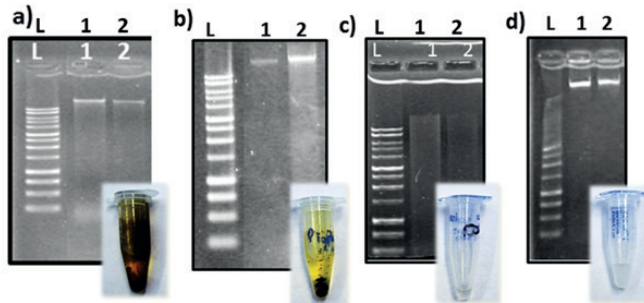


Figura 11.8. ADN genómico de *S. edulis*. a-d) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del ADN extraído mediante distintos métodos hasta obtener ADN puro. Carril L= 1 kb ADN Ladder. 1 y 2 = réplicas del ADN genómico de *S. edulis*.

Protocolos

Extracción de ADN en *S. edulis*

1. Colocar 100 mg de tejido en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL pulverizado en nitrógeno líquido, 25 mg de Polivinil polipirrolidona (PVPP) y 500 μ L del buffer de extracción (100 mM de Tris Cl, 20 mM de EDTA, 1.4 M de NaCl, 2 % de CTAB y 0.2 % de β -mercaptoetanol) recién preparado y precalentado a 65 °C.
2. Homogenizar por inversión y colocar a 65 °C por 30 min mezclando paulatinamente durante el tiempo de incubación.
3. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
4. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 30 min, agitando paulatinamente durante el tiempo de incubación.
5. Centrifugar durante 15 min a 12 000 rpm y transferir la fase superior a un tubo nuevo con un volumen de isopropanol frío.
6. Incubar a 20 °C por 30 min y luego centrifugar durante 15 min a 12 000 rpm.
7. Lavar la pastilla de ADN con etanol al 70 %
8. Disolver el ADN en 30 μ L de buffer TE y 1 μ L de RNasa.
9. Incubar la mezcla a 37 °C toda la noche.
10. Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
11. Centrifugar a 8 000 rpm por 15 min y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
12. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar a 12 000 rpm durante 15 min.
13. Colocar la fase superior en un tubo nuevo y agregar un volumen de etanol absoluto.
14. Agregar un décimo de acetato de amonio 7.5 N considerando el volumen total final.
15. Colocar los tubos a -20 °C por 30 min y luego centrifugarlos por 15 min a 12 000 rpm.
16. Dejar secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente y posteriormente resuspender en 30 mL de agua estéril.

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico
ABF: factor de unión a AREB
AQP: acuaporina
AREB: elemento de respuesta y unión a proteínas ácidas
BADH: betaína aldehído deshidrogenasa
CMO: colina monooxigenasa
CTAB: bromuro de cetrimonio
DREB: elementos sensibles a deshidratación
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EROS: especies reactivas de oxígeno
FT: factor de transcripción
GB: glicina betaina
HSF: factores de transcripción de choque térmico
HSP: proteínas de choque térmico
H⁺-V-PPasa: pirofosfatasa inorgánica vacuolar
LEA: proteínas abundantes en embriogénesis tardía
PEAMT: fosfoetanolamina metil transferasa
PINE: proteína intrínsecamente desordenada
Pro: prolina
PVPP: Polivinil polipirrolidona
P5CS: Δ^2 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa
SAMS: S-adenosilmetionina sintetasa
TIP: proteínas intrínsecas del tonoplasto
Vppa: pirofosfatasa vacuolar

Glosario

Abiótico: componentes de un ecosistema que no tienen vida, pero influyen en los seres vivos que forman parte de él.
Afloramiento: surgimiento de rocas del interior de la tierra hacia la superficie.
Arborescente: que por su forma o aspecto recuerda a un árbol.
Aspersión: modalidad de riego mediante la cual el agua llega a las plantas en forma de “lluvia” localizada.

Biótico: de los organismos vivos o relacionado con ellos.

Caducifolio: que pierde sus hojas cada año.

Fitohormona: compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control.

Flavonoides: pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes.

Fotosistema: complejos proteicos situados en membranas de organismos autótrofos donde se agrupan los pigmentos fotosintéticos.

Ígneo: proceso que se producen por enfriamiento sobre la superficie terrestre.

Meristemos: grupos de células indiferenciadas responsables del crecimiento permanente de las plantas debido a que tienen una alta capacidad de división celular y posteriormente pueden diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares.

Peroxidación: serie compleja de reacciones químicas que causan la descomposición de las grasas y los aceites (peroxidación lipídica).

Splicing: corte de intrones y unión de exones para producir ARN mensajero maduro capaz de salir del núcleo hacia el citoplasma y ocurra la síntesis de proteínas.

Tonoplasto: membrana que delimita la vacuola central en las células vegetales.

Transgénico: generado artificialmente mediante ingeniería genética con mezcla de DNA de otros organismos en sus genes.

Xantofila: pigmento fotosintético secundario que pertenece al grupo de los carotenoides.

Bibliografía

Agarwal, P. K., & Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54(2), 201-212.

Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., & Singh, T. P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant science*, 171(3), 382-388.

- Arriaga, L., Espinoza, J. M., Aguilar, C., Martínez, E., Gómez, L., & Loa, E. (2000). Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *Ciudad de México, México*. Última actualización 26 de junio de 2017. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/Tlistado.html>
- Binzel, M., & Ratajczak, R. (2002). Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast. In *Salinity: Environment-Plants-Molecules* (pp. 423-449). Springer, Dordrecht.
- Boudsocq, M., & Lauriere, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant physiology*, 138(3), 1185-1194.
- Cao, J., Lv, X. Y., Chen, L., Xing, J. J., & Lan, H. Y. (2015). Effects of salinity on the growth, physiology and relevant gene expression of an annual halophyte grown from heteromorphic seeds. *AoB Plants*, 7.
- Cao, Y., Xiang, X., Geng, M., You, Q., & Huang, X. (2017). Effect of *HbDHN1* and *HbDHN2* genes on abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 8, 470.
- Casierra-Posada, F., Pérez, W. A., & Portilla, F. (2006). Relaciones hídricas y distribución de materia seca en especies de fique (*Furcraea* sp. Vent.) cultivadas bajo estrés por NaCl. *Agronomía Colombiana*, 24(2), 280-289.
- Chamoli, S., & Verma, A. K. (2014). Targeting of metabolic pathways for genetic engineering to combat abiotic stress tolerance in crop plants. In *Approaches to Plant Stress and Their Management* (pp. 23-37). Springer, New Delhi.
- Chaves-Barrantes, N. F., & Gutiérrez-Soto, M. V. (2017). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 237-253.
- Chen, T. H., & Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 250-257.
- Da Silva, G. J., & Costa de Oliveira, A. (2014). Genes acting on transcriptional control during abiotic stress responses. *Advances in Agriculture*, 2014.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.

- Etesami, H., & Jeong, B. R. (2018). Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 881-896.
- Fricke, W., & Peters, W. S. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, 129(1), 374-388.
- Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2017). Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant growth regulation*, 83(2), 175-198.
- Ghorbani, R., Mohammadi, S. A., Toorchi, M., & Ghafarian, S. (2018). Transcriptional changes of BFRUCT3, NHX1, OMT and PEAMT genes in root of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salinity stress. *Pak. J. Bot.*, 50(2), 735-740.
- Glenn, E. P., Anday, T., Chaturvedi, R., Martinez-Garcia, R., Pearlstein, S., Soliz, D., & Felger, R. S. (2013). Three halophytes for saline-water agriculture: An oilseed, a forage and a grain crop. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 110-121.
- Goharrizi, K. J., Baghizadeh, A., Afroushteh, M., Amirmahani, F., & Kermani, S. G. (2020). Effects of salinity stress on proline content and expression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase and vacuolar-type H⁺ subunit E genes in wheat. *Plant Genetic Resources*, 18(5), 334-342.
- Golestan Hashemi, F. S., Ismail, M. R., Rafii, M. Y., Aslani, F., Miah, G., & Muharam, F. M. (2018). Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(4), 815-829.
- Guo, S., Yin, H., Zhang, X., Zhao, F., Li, P., Chen, S. & Zhang, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, SsVP, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 60(1), 41-50.
- Gupta, K., Jha, B., & Agarwal, P. K. (2014). A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Marine biotechnology*, 16(6), 657-673.
- Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K., & Dhinesh, T. (2011). Standardization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of *Suaeda* sp. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(5), 486-492.

- Hernández Camacho, S., Pérez Molphe Balch, E. M., Alpuche Solís, Á. G., & Morales Domínguez, J. F. (2017). Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 86: 151–162.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology*, 122(4), 1129-1136.
- Jin, H., Dong, D., Yang, Q., & Zhu, D. (2016). Salt-responsive transcriptome profiling of *Suaeda glauca* via RNA sequencing. *PLoS one*, 11(3), e0150504.
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029.
- Khan, W. U. D., Tanveer, M., Shaukat, R., Ali, M., & Pirdad, F. (2020). An overview of salinity tolerance mechanism in plants. *Salt and Drought Stress Tolerance in Plants*, 1-16.
- Kobayashi, F., Ishibashi, M., & Takumi, S. (2008). Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Research*, 17(5), 755-767.
- Kuluev, B. R., Berezhneva, Z. A., Mikhaylova, E. V., & Chemeris, A. V. (2018). Growth of transgenic tobacco plants with changed expression of genes encoding expansins under the action of stress factors. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(2).
- Kuttan, S., Sankararamasubramanian, H. M., & Parida, A. K. (2018). Choline monooxygenase transcript expression triggers glycine betaine accumulation in *Suaeda maritima* when subjected to a salt concentration optimal for its growth. *bioRxiv*, 314419.
- Kurowska, M. M. (2020). TIP Aquaporins in Plants: Role in Abiotic Stress Tolerance. In *Abiotic Stress in Plants*. IntechOpen.
- Krishnamurthi, S. S., Kuttan, S., Meenakshisundram, S., Nooruddin, T., & Parida, A. (2019). The role of the overexpression of *Suaeda maritima* choline monooxygenase and betaine aldehyde dehydrogenase cDNAs in the enhancement of salinity tolerance in different strains of *E. coli*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(1).

- Li, X., Wang, F., Sun, D., Wang, N., Dong, Y., Liu, W., & Li, H. (2018). Cloning and characterization of SucNHX1, a novel vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from the halophyte *Suaeda corniculata* that enhances the saline-alkali tolerance in *Arabidopsis* by its overexpression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(3), 395-407.
- Liu, P. L., Du, L., Huang, Y., Gao, S. M., & Yu, M. (2017). Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1-16.
- Loik, M. E., & Nobel, P. S. (1993). Exogenous abscisic acid mimics cold acclimation for cacti differing in freezing tolerance. *Plant Physiology*, 103(3), 871-876.
- Mohammadi, S. A., Hamian, S., Vahed, M. M., Bandehagh, A., Gohari, G., & Janda, T. (2021). Transcriptional analysis of salt-responsive genes to salinity stress in three salt-tolerant and salt-sensitive Barely cultivars. *South African Journal of Botany*, 141, 457-465.
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía colombiana*, 27(2), 179-191.
- Nguyen, H. T. T., Das Bhowmik, S., Long, H., Cheng, Y., Mundree, S., & Hoang, L. T. M. (2021). Rapid accumulation of proline enhances salinity tolerance in australian wild rice *Oryza australiensis* domin. *Plants*, 10(10), 2044.
- Nobel, P. S., & Zutta, B. R. (2008). Temperature tolerances for stems and roots of two cultivated cacti, *Nopalea cochenillifera* and *Opuntia robusta*: Acclimation, light, and drought. *Journal of Arid Environments*, 72(5), 633-642.
- Noguez-Hernández, R., Carballo-Carballo, A., & Flores-Olvera, H. (2013). *Suaeda Edulis* (Chenopodiaceae), a new species from saline lakes of central México. *Botanical Sciences*, 91(1), 19-25.
- Ochoa-Alfaro, A. E., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M. B., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velázquez, C. L., Gómez-Anduro, G., & Jiménez-Bremont, J. F. (2012). Functional characterization of an acidic SK 3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*, 235(3), 565-578.
- Peng, Y., Lin, W., Cai, W., & Arora, R. (2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 226(3), 729-740.
- Qu, A. L., Ding, Y. F., Jiang, Q., & Zhu, C. (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(2), 203-207.

- Rai, A. K., & Takabe, T. (2006). *Abiotic stress tolerance in plants* (pp. 1-267). Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- Reyes, J. L., Rodrigo, M. J., Colmenero-Flores, J. M., Gil, J. V., Garay-Arroyo, A. D. R. I. A. N. A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment*, 28(6), 709-718.
- Rhodes, D., & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 357-384.
- Sahu, B. B., & Shaw, B. P. (2009). Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology*, 9(1), 69.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M., & Fotopoulos, V. (2016). Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible?. *Trends in Plant Science*, 21(4), 329-340.
- Shen, Q., Zhang, P., & Ho, T. H. (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *The Plant Cell*, 8(7), 1107-1119.
- Shen, Y., Tang, M. J., Hu, Y. L., & Lin, Z. P. (2004). Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Science*, 166(5), 1167-1175.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant physiology and biochemistry*, 46(1), 82-92.
- SEMARNAT Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002. México, D. F. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>

- Sunkar, R. (2010). MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. In *Seminars in Cell & Developmental biology* (Vol. 21, No. 8, pp. 805-811). Academic Press.
- Tavares, L. S. C., dos Reis, S. P., Marques, D. N., Tavares, E. J. M., da Cunha Ferreira, S., Coelho, F. M., & de Souza, C. R. B. (2019). Abscisic Acid in Abiotic Stress-responsive Gene Expression. *Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology*, 145-184.
- Ventura, Y., & Sagi, M. (2013). Halophyte crop cultivation: the case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 144-153.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.
- Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Guddimalli, R., Parveda, M., Solymosi, K., & Kishor, P. K. (2020). Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. *Planta*, 251(4), 1-29.
- Yu, Z., Wang, X., & Zhang, L. (2018). Structural and functional dynamics of dehydrins: a plant protector protein under abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3420.
- Zan, Y., Ji, Y., Zhang, Y., Yang, S., Song, Y., & Wang, J. (2013). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC Genomics*, 14(1), 1-14.
- Zhang, C. S., Lu, Q., & Verma, D. P. S. (1995). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20491-20496.
- Xu Zhang, Xiaoxue Liu, Lei Wu, Guihong Yu, Xiue Wang, Hongxiang Ma. (2015) The SsDREB Transcription Factor from the Succulent Halophyte Suaeda salsa Enhances Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco, *International Journal of Genomics*, vol. 2015, 13 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/875497>
- Zhang Y, Yin H, Li D, Zhu W, Li Q. (2008). Functional analysis of BADH gene promoter from Suaeda liaotungensis K. *Plant Cell Rep.* 27(3):585-92. doi: 10.1007/s00299-007-0459-8.

Capítulo 12

Transformación genética de plantas

Juan Pablo Martínez Vázquez
Eugenio Pérez Molphe Balch

*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

La posibilidad de modificar la información genética que posee y expresa una planta es una de las herramientas más importantes de la biotecnología vegetal. Estas técnicas permiten tanto introducir nueva información, como eliminar o editar la existente. En este capítulo se describe qué es y para qué se aplica la transformación genética de plantas. Se describen las técnicas más utilizadas para llevar a cabo este proceso, con énfasis en los métodos biológicos basados en el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. En este último caso se menciona tanto la obtención y usos de las raíces transformadas, como la posibilidad de regenerar plantas transgénicas completas a partir de estas. Se describen además algunos métodos físicos para la transformación genética de plantas. Por otro lado, una parte

fundamental de esta tecnología es la posibilidad de reconocer en una etapa temprana aquellos tejidos vegetales en los que se haya llevado a cabo la transformación genética, por lo que se habla del uso de genes marcadores de selección y reporteros. Finalmente, se presentan protocolos detallados para llevar a cabo la transformación genética de plantas de la familia Gesneriaceae mediante *A. tumefaciens*, así como para el ensayo histoquímico para detectar la actividad del gen reportero que codifica para la β -glucuronidasa (GUS).

Introducción

La transformación genética de plantas es la introducción en su genoma de nueva información por medio de la transferencia directa de las moléculas de ADN que la codifican. Esta información puede provenir de la misma especie vegetal, de una especie, género o grupo taxonómico diferente, e incluso de un organismo perteneciente a otro reino. En la actualidad esta técnica incluye además la posibilidad de bloquear o editar la información existente en el genoma alterando así el fenotipo. Esta modificación genética de plantas está dirigida a la mejora de sus cualidades agronómicas produciendo genotipos que expresen características de interés, también a la mejora de las propiedades nutricionales de los productos obtenidos de plantas, y más recientemente a la producción en plantas de moléculas valiosas que no son parte normal de su bioquímica. A la fecha se han demostrado ya los varios efectos benéficos de la transformación genética de plantas. Estos efectos no tienen que ver sólo con ventajas agronómicas que se reflejan en una mayor producción, también se han visto efectos positivos en el ambiente, y en la salud humana y animal, por la reducción en el uso de pesticidas relacionado con las plantas resistentes a plagas y enfermedades. La generación de alimentos de origen vegetal con un mayor valor nutricional también ha sido un logro notable de esta tecnología. Por otro lado, la gran mayoría de los numerosos estudios realizados a la fecha demuestran la ausencia de daños asociados a las plantas transgénicas. Por el contrario, muestran ventajas en comparación con las estrategias actuales que pretenden el incremento de la producción agrícola sustentado en el uso de pesticidas, fertilizantes y otras tecnologías nocivas para la salud y el medio ambiente. Asimismo, la situación actual en la que una gran cantidad de ecosistemas naturales han sido dañados de forma muy severa, hace inviable el

pensar en un incremento en la producción agrícola basada en la apertura de nuevas zonas al cultivo.

Se ha reportado ya la transformación genética en gran cantidad de especies de interés, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Esto se ha logrado mediante el uso de diversos protocolos de transformación. Las plantas modificadas genéticamente, o transgénicas, ya se usan de manera extensiva en la agricultura mundial. En 2018, se sembraron 191.7 millones de hectáreas de cultivos modificados genéticamente a nivel mundial, los principales son maíz, soja, colza y algodón, pero también hay superficies importantes cultivadas con alfalfa, remolacha azucarera, papaya, calabaza, berenjena, papa y manzana, productos transgénicos que ya están presentes en los mercados.

En lo que respecta a las características que se han mejorado o alterado en las plantas transgénicas generadas, estas han evolucionado a lo largo del tiempo atendiendo a diferentes visiones u objetivos. Las primeras plantas transgénicas generadas llevaban genes destinados a mejorar las propiedades agronómicas y por lo tanto la productividad de los cultivos. Ejemplos de esto son genes de resistencia a patógenos (virus, bacterias y hongos), resistencia a plagas, resistencia a herbicidas y resistencia al estrés ambiental (sequía, temperaturas extremas, salinidad, etc.). Todas estas estrategias benefician de manera directa al productor, incrementando las cosechas y reduciendo los costos. En una segunda generación, los esfuerzos se dirigieron en su mayoría a la mejora en las propiedades nutricionales de los productos derivados de las plantas transgénicas o en sus características de interés para el consumidor. De esta manera surgieron alimentos con mayor contenido de vitaminas, de aminoácidos esenciales, antioxidantes, o una mayor vida de anaquel. Finalmente, una tercera generación de plantas transgénicas ha sido modificadas con el objetivo de convertirlas en fábricas vivas de moléculas de utilidad, pero que normalmente no son producidas por las plantas, por ejemplo, vacunas, proteínas terapéuticas de origen humano, fármacos o biopolímeros.

De acuerdo con los avances alcanzados en el conocimiento y desarrollo de sistemas que permiten la modificación del genoma de un organismo se vislumbra que en las siguientes generaciones de plantas modificadas genéticamente se prescindirá cada vez más de la introducción de genes foráneos, y se privilegiará la edición o alteración del genoma natural con el fin de mejorar sus características. Un ejemplo de este nuevo enfoque es la generación de plantas resistentes a geminivirus a través del sistema CRISPR-Cas.

La generación de una planta transgénica es un proceso que consta de varias etapas. Una etapa previa que determina en gran medida el éxito final, es la preparación de la secuencia de ADN que será introducida al genoma vegetal. Para esto se usan las técnicas de ingeniería genética, con apoyo de otras como la bioinformática, con el fin de obtener y adecuar para su expresión en la planta, la molécula de ADN que será responsable de la incorporación de la nueva información, o de la modificación de la existente. Esto incluye la incorporación de esta información al vector, usualmente un plásmido, que servirá de vehículo para su introducción al genoma vegetal. Una vez realizada esta etapa previa, el proceso de transformación genética consta normalmente de tres pasos:

- I. Introducción de la molécula de ADN a las células vegetales, normalmente de forma tal que esta pueda integrarse y se convierta en parte del genoma de la célula. Con este fin se han desarrollado diversos métodos de transformación genética que se describirán más adelante.
- II. Regeneración de plantas completas a partir de células transformadas. Para esto se hace uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales que permiten la obtención de individuos completos a partir de células individuales. Esto se logra mediante vías como la organogénesis y la embriogénesis somática (Ver Capítulo 1 de esta obra). En el caso particular de los sistemas de transformación en planta, esta etapa del proceso se omite.
- III. Selección de los tejidos o plantas que contienen y expresan la nueva información. En general, la eficiencia de los métodos de transformación desarrollados hasta la fecha es baja. Esto quiere decir que sólo una fracción de las células tratadas recibe efectivamente la nueva información genética. Por esto es de suma importancia poder seleccionar de una forma temprana a las células, tejidos o plantas que fueron transformadas, eliminando a las que no recibieron la nueva información genética.

A continuación, se presenta información más detallada de la primera y tercera etapas del proceso mencionado.

Métodos para la transformación genética de células vegetales

Los métodos desarrollados hasta hoy para la transformación genética en plantas se pueden clasificar en tres grupos o categorías. A continuación, se presenta un esquema con la clasificación general (Fig. 12.1), y posteriormente se describen los métodos más utilizados.

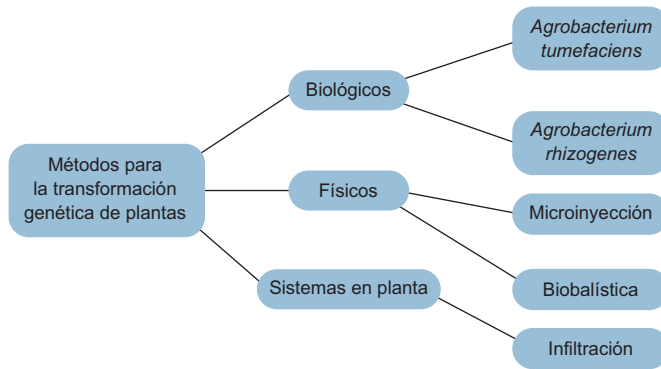


Figura 12.1. Clasificación de los métodos más utilizados para la transformación genética de plantas.

Métodos biológicos

Éstos hacen uso de bacterias fitopatógenas cuyo mecanismo natural de infección es precisamente la introducción al genoma vegetal de genes propios que alteran los patrones de desarrollo y la capacidad biosintética del tejido vegetal infectado. Estos organismos son *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. El primero es el agente causal de la enfermedad conocida como “agalla de la corona”, mientras que el segundo causa la aparición de las “raíces pilosas”. Además de estas bacterias, se ha postulado e intentado el uso de virus como vehículos de introducción de secuencias de ADN al genoma de células vegetales, sin embargo éstos han resultado poco eficientes y no se usan de manera rutinaria. Estos métodos de transformación genética también son llamados indirectos, ya que el ADN modificado es introducido en primer término a una bacteria, y posteriormente a través de ésta al genoma vegetal.

Agrobacterium tumefaciens

Se trata de una bacteria del suelo, de la familia Rhizobiaceae, Gram negativa, que tiene la capacidad natural de infectar una amplia variedad de gimnospermas y angiospermas dicotiledóneas mediante su inoculación en sitios con heridas. Esta bacteria transfiere e integra un segmento de su ADN, de aproximadamente 23 kpb, al genoma de la planta y como consecuencia induce la aparición de tumores a través de la sobreproducción de auxinas y citocininas. Además, les confiere a las células vegetales infectadas la propiedad de sintetizar opinas, única fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias. Este segmento de ADN, llamado ADN-T (ADN transferible), se encuentra en el plásmido Ti, inductor de tumores. Las cepas *A. tumefaciens* se diferencian entre sí por el tipo de opina que pueden catabolizar. Debido a esta capacidad natural de transferir ADN al genoma vegetal, surgió la idea de utilizar este organismo como vector para la introducción de genes de interés en plantas.

Los plásmidos Ti silvestres no son usados directamente como vectores de transformación genética, antes, se deben modificar para eliminar el ADN-T (a esto se le llama desarmar). Esto debido a que los genes silvestres causan un desbalance hormonal severo en el tejido vegetal, impidiendo así la regeneración de plantas completas con morfología y funciones normales. Por esto se eliminan los oncogenes, responsables de la sobreproducción de auxinas y citocininas, y los genes responsables de la síntesis de opinas, y en su lugar pueden colocarse las secuencias de ADN de interés para introducir al genoma vegetal. Sin embargo, es importante mantener las secuencias bordes, que delimitan al ADN-T, así como la llamada región *vir* (virulencia) del plásmido Ti. En esta última están codificadas las proteínas que se encargan de reconocer el ADN-T, hacer una copia del mismo de cadena sencilla, cubrirlo para protegerlo de las nucleasas, transferirlo a la célula vegetal, introducirlo al núcleo e integrarlo al genoma de la célula vegetal. Para que este sistema funcione, no es indispensable que la región *vir* y el ADN-T se encuentren físicamente en la misma molécula de ADN (plásmido). Debido a esto se han generado dos tipos de vectores, los vectores cointegrados y los binarios. Los primeros resultan de la integración de un plásmido foráneo pequeño (genes de interés flanqueados por el borde derecho y una región homóloga al borde izquierdo) al plásmido Ti desarmado (borde derecho e izquierdo y la región *vir*) mediante un proceso de recombinación de regiones homólogas, dando como resultado un solo

plásmido que contiene tanto la región *vir* como el ADN-T de interés. Por su parte, los vectores binarios son plásmidos más pequeños que contienen sólo el ADN-T con sus bordes y las secuencias a transferir al genoma vegetal. Éstos se insertan a una cepa de *A. tumefaciens* que contenga un plásmido Ti desarmado. De esta forma, el ADN-T y la región *vir* quedan físicamente separados en plásmidos diferentes, pero esto no afecta el proceso de transferencia del ADN al genoma vegetal, ya que las proteínas codificadas en esta última región pueden actuar sobre cualquier ADN-T presente en la célula bacteriana. Estos vectores binarios resultan más fáciles de manejar ya que los plásmidos con el ADN-T son mucho más pequeños que el Ti por lo que se manipulan de una forma más sencilla en el laboratorio.

En cuanto al proceso de transformación con *A. tumefaciens*, este es relativamente sencillo y sólo requiere del equipo necesario para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Los pasos del proceso son (Ver Protocolo 12.1):

1. Se introduce el plásmido con las secuencias a transferir a la planta, y las secuencias borde, a una cepa curada de *A. tumefaciens*. El plásmido introducido funcionará como vector binario. Es fundamental incluir genes adicionales, marcadores de selección y/o reporteros, que permitan seleccionar y/o reconocer fácilmente a los tejidos transformados.
2. Se obtiene un cultivo líquido de la cepa modificada de *A. tumefaciens* y se pone en contacto con explantes de la especie de planta a transformar. El tipo de explante dependerá del método de regeneración *in vitro* previamente desarrollado para la especie en particular. Es importante que el explante presente superficies heridas, ya que éstas últimas son el sitio donde ocurre la unión de la bacteria y la subsecuente transferencia de los genes y secuencias de interés al genoma vegetal. Al período en que están en contacto el explante y la suspensión bacteriana se le denomina cocultivo y normalmente abarca de 24 a 72 horas. En este paso se puede incorporar acetosiringona al medio de cultivo. Éste es un compuesto fenólico que induce la virulencia de la bacteria, activando los genes *vir* y otros necesarios para la unión de ésta a la célula vegetal. La adición de esta molécula puede incrementar de manera significativa la eficiencia de transformación.
3. Al finalizar el período de cocultivo, la bacteria debe ser eliminada, ya que su presencia por un tiempo más prolongado provocará la necrosis

del tejido vegetal. Para esto debe emplearse un agente que sea específico, es decir que elimine a la bacteria sin dañar al explante. Por este motivo se recomienda el uso de antibióticos. Lo más recomendable en este punto es realizar un lavado de los explantes con medio de cultivo líquido, adicionado con el antibiótico, y luego transferirlos a medio de cultivo semisólido, también con antibiótico.

4. A partir de la eliminación de la bacteria, debe seguirse el protocolo de regeneración a partir de los explantes cocultivados. Esto se hace por la vía y en los medios previamente definidos para la especie. La única diferencia con respecto a la regeneración *in vitro* normal sería la adición del antibiótico o agente selectivo de acuerdo a las secuencias de ADN introducidas al genoma vegetal.

La eficiencia de transformación mediante *A. tumefaciens* varía de acuerdo a la especie vegetal y a la cepa bacteriana utilizada, pero en general depende de los siguientes factores:

- Habilidad de la cepa bacteriana para transformar a las células vegetales puestas en cocultivo. Ya se han caracterizado varias cepas de *A. tumefaciens* que difieren en cuanto a su habilidad para introducir información genética en diferentes grupos vegetales. La selección de la cepa más adecuada para una especie en particular suele ser un paso importante en la optimización de los protocolos de transformación.
- Eficiencia del sistema de selección para las células transformadas. Éste debe ser capaz de discriminar de manera precisa entre las células transformadas y las no transformadas. Si es demasiado agresivo puede detener el desarrollo de las células transformadas, mientras que un sistema muy poco agresivo permitirá el desarrollo de células, tejidos e incluso plantas no transformadas (escapes), haciendo más difícil detectar a las que llevan los genes foráneos.
- Eficiencia del sistema de cultivo *in vitro* que permita la regeneración de plantas a partir de las células transformadas. Previo al desarrollo de sistemas de transformación genética es indispensable desarrollar un sistema eficiente de regeneración *in vitro* a través de organogénesis o embriogénesis somática. Este sistema deberá iniciar del mismo tipo de explante que será usado para la transformación.

- Estabilidad del nuevo ADN incorporado al genoma vegetal. Esto depende en gran medida del tamaño del segmento de ADN a introducir. En varios grupos de plantas, la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es poco eficiente, aun cuando se tomen en cuenta los factores antes citados. Por este motivo, se han propuesto varias modificaciones a los protocolos basados en esta bacteria, o bien su combinación con otras técnicas de transformación. Algunas de ellas son: a) Agrolística, que combina el uso de *Agrobacterium* como vector y la biobalística para facilitar su penetración al tejido, b) Agroinfiltración, que es el uso de vacío para facilitar la entrada de la bacteria al tejido; c) Método SAAT, que es la penetración de la bacteria facilitada por sonicación, y; d) La utilización de otros géneros bacterianos que también poseen la capacidad de transferir información genética al genoma vegetal, como *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*.

Como se ha mencionado antes, *A. tumefaciens* es un vehículo ampliamente usado para la introducción al genoma vegetal de nueva información genética. Además de esto, este sistema puede ser utilizado para la edición o alteración de la información genética ya existente en el genoma vegetal, esto a través de la tecnología CRISPR/Cas9.

Agrobacterium rhizogenes

Es una bacteria del suelo muy relacionada a *A. tumefaciens* identificada desde los años 30 del siglo XX como el agente causal de la enfermedad conocida como “raíces pilosas”, la cual afecta a un gran número de especies de plantas, principalmente del grupo de las Dicotiledóneas, aunque también son susceptibles algunas Monocotiledóneas e incluso Gimnospermas. Las “raíces pilosas” se caracterizan por una alta tasa de crecimiento, desarrollo plagiotrópico, un alto grado de ramificación y gran abundancia de pelos radicales, de ahí su nombre de pilosas. Este fenotipo se debe a la inserción en el genoma vegetal de los genes *rol* contenidos en el ADN-T de *A. rhizogenes*. Además, estas raíces producen metabolitos específicos denominados opinas (manopina, cucumopina y agropina), los cuales son secretados al suelo, en donde son utilizados como fuente de nitrógeno y carbono por la bacteria. *A. rhizogenes* es una especie que también puede ser usada como vehículo para la introducción de

genes foráneos al genoma vegetal. Sin embargo, en este caso lo que se genera de manera directa son raíces transformadas, que es un tejido vegetal que lleva y expresa los genes foráneos, pero también los genes silvestres de la bacteria. En este caso las cepas utilizadas no son desarmadas.

El proceso de transformación genética con *A. rhizogenes* es muy similar al mencionado para *A. tumefaciens*, y hasta donde se sabe, el mecanismo molecular a través del cual se da la transferencia e integración de los genes al genoma vegetal es casi idéntico. En el caso de *A. rhizogenes*, después del cocultivo y eliminación de la bacteria, los explantes son transferidos a medio sin reguladores del crecimiento en donde aparecerán las raíces transformadas. En muchos casos es posible mantenerlas y propagarlas por tiempo indefinido subcultivando a medio fresco. El cultivo puede hacerse en medio semisólido, o bien en medio líquido (Fig. 12.2). Esto último permite escalar los cultivos, desde pequeños matraces hasta biorreactores de gran capacidad.

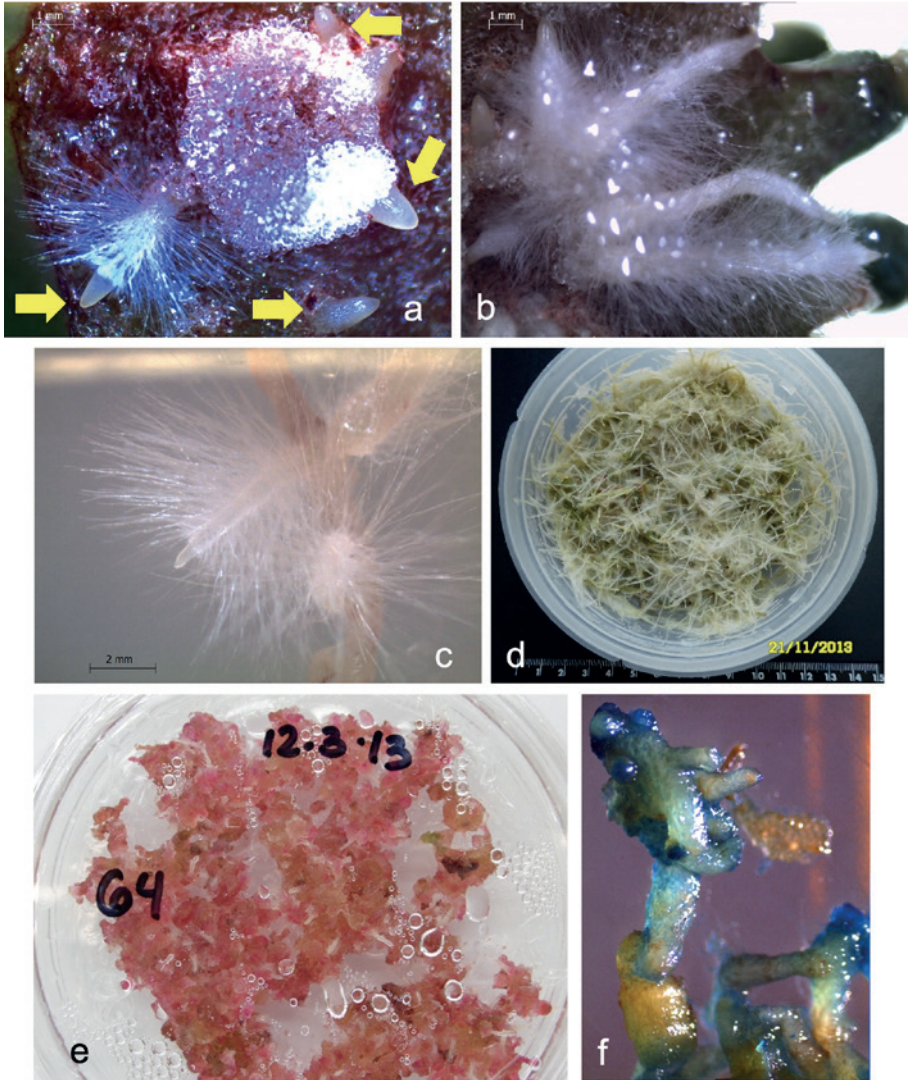


Figura 12. 2. Generación y cultivo de raíces transformadas con *A. rhizogenes* en Cactáceas. a) Aparición de raíces transformadas (flechas) sobre un corte transversal de cactáceas inoculado con *A. rhizogenes*; b) Desarrollo de las raíces transformadas sobre el explante inoculado; c) Detalle de las raíces transformadas; d) Cultivo masivo de raíces transformadas; e) Raíces transformas productoras de betalainas, y; f) Actividad de GUS en raíces transformadas.

Las raíces transformadas generadas a través del sistema *A. rhizogenes* tienen tres áreas de aplicación dentro de la biotecnología vegetales, éstas son:

I. *Producción de metabolitos secundarios*: Las raíces transformadas muestran normalmente una alta tasa de crecimiento *in vitro*. Además, al tratarse de un tejido diferenciado es estable genéticamente y conserva su capacidad biosintética. Esto hace de éstas un sistema ideal para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios. Estos tejidos son capaces de producir los mismos compuestos químicos que las raíces de la misma especie vegetal en condiciones naturales, y no suelen presentarse las notables reducciones en la concentración de los metabolitos que se han reportado para otros tipos de cultivo, como el tejido calloso o las células en suspensión. Ya se ha reportado la obtención de cultivos de raíces transformadas productores de metabolitos secundarios en una gran cantidad de especies, incluyendo varias plantas medicinales raras o amenazadas. Se han producido con éxito compuestos de interés médico como antihipertensivos, antimaláricos, analgésicos, antibióticos, antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios, antidiabéticos, antifúngicos y antivirales, así como de interés industrial como colorantes y saborizantes. También se han desarrollado varias estrategias dirigidas a incrementar la producción de los compuestos de interés. Entre estas destacan el cultivo a gran escala en biorreactores y las mejoras en el diseño de los mismos para adecuarlos a las peculiaridades de este tipo de cultivo. Otras estrategias son la selección de líneas altamente productoras, la adición de compuestos que inciten la producción del metabolito y la propia modificación genética de la ruta metabólica, esto sobreexpresando o bloqueando a los genes involucrados. Esto se puede lograr introduciendo secuencias adicionales de ADN al momento de la transformación para la generación de las raíces transformadas.

II. *Generación de plantas transgénicas*: Las raíces transformadas son tejido transgénico que puede ser obtenido y cultivado de una forma relativamente sencilla, tal como antes se describió. Estas raíces no requieren de reguladores del crecimiento para crecer, sin embargo, cuando son expuestas a los mismos pueden mostrar diversas respuestas morfogénicas. Una de estas es la formación de brotes adventicios que pueden llevar a la

obtención de plantas completas. Al originarse a partir de tejido transgénico, los brotes y plantas generadas conservarán esta característica. Esto permite usar a las raíces transformadas como un paso intermedio para la obtención de plantas transgénicas, brindando así una alternativa al uso de la transformación con cepas desarmadas (sin capacidad de inducir tumores) de *A. tumefaciens* (Figura 12.3). En el caso de *A. rhizogenes*, las cepas silvestres pueden ser usadas directamente para la generación de plantas transgénicas. Esto debido a que las raíces pilosas son capaces de regenerar plantas fértiles sin que sea necesaria ninguna modificación en el ADN-T, lo cual es prácticamente imposible partiendo de tumores producidos por cepas silvestres de *A. tumefaciens*. Las plantas transgénicas generadas a partir de raíces transformadas en ocasiones muestran un fenotipo peculiar, llamado síndrome de la raíz pilosa o fenotipo Ri, que afecta la forma, crecimiento, capacidad de enraizamiento, floración y fertilidad de la planta. Algunas de las plantas regeneradas que llevan los genes *rol* de *A. rhizogenes* se caracterizan por presentar entrenudos cortos, dominancia apical reducida y hojas arrugadas; sin embargo, otras plantas regeneradas a partir de raíces transformadas tienen un genotipo completamente normal. Las alteraciones fenotípicas causadas por los genes *rol* de las cepas silvestres de *A. rhizogenes* no son necesariamente negativas desde el punto de vista agronómico o de productividad vegetal. De hecho, se considera actualmente que los genes *rol* podrían tener un papel importante en el mejoramiento de varias especies vegetales. Por ejemplo, estos genes podrían incrementar notablemente la capacidad de enraizamiento de muchas especies recalcitrantes, o bien producir plantas con sistemas radicales más fuertes y abundantes. Por otro lado, en la parte aérea de estas plantas se puede lograr una menor dominancia apical con entrenudos más cortos.

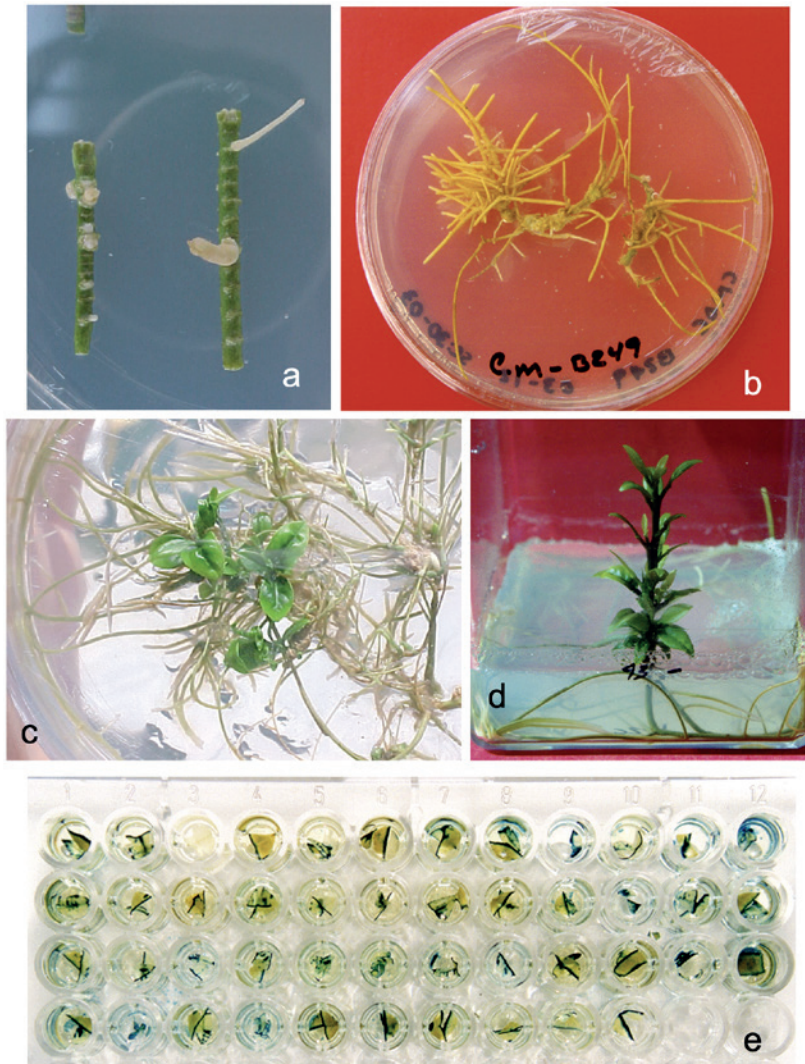


Figura 12.3. Generación de plantas transgénicas de cítricos a partir de raíces transformadas con *A. rhizogenes*. a) Generación de raíces transformadas en un segmento de tallo inoculado con *A. rhizogenes*; b) Cultivo de raíces transformadas en medio semisólido; c) Generación de brotes vía organogénesis en raíces transformadas; d) Plántula transformada generada a partir de raíces transformadas, y; e) Actividad de GUS en hojas de plantas transgénicas de cítricos generadas a partir de raíces transformadas.

III. *Generación de plantas compuestas*: Éstas se obtienen al inducir raíces transformadas inoculando con *A. rhizogenes* la parte basal de un brote vegetativo. Lo que se obtiene es una planta conformada por un sistema radical transformado y una parte área silvestre. Para esto no es esencial trabajar bajo condiciones *in vitro* ya que el proceso se puede realizar por completo *ex vitro*. Esta tecnología resulta muy útil para estudiar la expresión *in vivo* de genes de interés y también es posible insertar genes que confieran ventajas agronómicas, siempre y cuando éstos funcionen cuando se expresan sólo en el sistema radical. En este caso la parte aérea, flores y frutos incluidos, no contendrán los transgenes, pero se beneficiará de su presencia y expresión en la raíz.

Métodos físicos

Biobalística

El método de biobalística, también llamado bombardeo con microproyectiles o biolística, permite la transferencia de información genética a las células vegetales mediante microproyectiles esféricos (0.5 a 5 μm) recubiertos de ARN o ADN, y disparados a una alta velocidad (más de 400 m/s) hacia el tejido vegetal. Los microproyectiles deben cumplir varias características importantes; estar hechos de un metal inerte (oro, tungsteno o platino); tener afinidad por ARN/ADN para que este se adhiera a su superficie, y poder liberar el material genético una vez dentro de la célula. La aceleración de las partículas se logra usualmente mediante gases a presión por medio de dispositivos que permiten dirigirlos hacia el tejido vegetal. Los ácidos nucleicos se adhieren a los microproyectiles mediante tratamientos con cloruro de calcio y espermidina.

Optimizando parámetros como su velocidad y la distancia del disparo, los microproyectiles son capaces de penetrar la pared y la membrana celular sin dañar demasiado a las células vegetales, y el ADN adherido a las partículas se libera después debido a las modificaciones del entorno iónico. Una vez solubilizado en la célula, el ADN foráneo puede integrarse aleatoriamente en el genoma vegetal, aunque esto suele ser un evento poco frecuente, lo cual es el principal inconveniente de esta técnica. Una consideración importante para la biobalística es que los tejidos vegetales a bombardear deben ser sometidos a

un tratamiento osmótico pre y post bombardeo, para minimizar el daño por el procedimiento.

La transferencia de ADN a través de la biobalística ha sido ampliamente utilizada en plantas superiores, algunos éxitos importantes incluyen algodón, papaya, maíz y tabaco, arroz, trigo, avena, caña de azúcar y cebada. Cabe mencionar que esta tecnología se ha usado extensivamente con monocotiledóneas, especialmente gramíneas. Esto debido a que la transformación con *A. tumefaciens* suele ser muy poco eficiente en estos grupos. También han logrado la transformación genética de organelos celulares como los cloroplastos, bacterias, protozoos, hongos, algas, insectos, tejidos animales y plantas *in vivo*.

La biobalística presenta algunas ventajas importantes con respecto a la transformación por métodos biológicos: Es fácil, no necesita vectores especializados, por lo tanto, utiliza construcciones genéticas simples, plásmidos o moléculas lineales, y se pueden producir múltiples integraciones. Asimismo, es capaz de transformar establemente y generar líneas de plantas transgénicas. Entre sus principales desventajas, se encuentran un porcentaje de éxito normalmente muy bajo, sobre todo en lo referente a la integración estable al genoma de los genes introducidos. En algunas ocasiones, la integración al genoma si es eficiente, pero la inserción de varias copias puede causar silenciamiento génico. Además, se ha detectado la presencia de rearrreglos en el ADN transferido. Finalmente, esta tecnología es costosa por el equipo y consumibles requeridos, esto en comparación por ejemplo con la transformación vía *A. tumefaciens* que es un proceso que no requiere equipamiento especial. Además, los parámetros físicos (tipo de partícula, velocidad, distancia) deben optimizarse para cada especie y tipo de explante.

Sistemas de transformación en planta

Esta tecnología consiste en la introducción de información genética, normalmente vía *A. tumefaciens*, en células generativas o meristemáticas de una planta, para luego buscar transformantes en las generaciones posteriores derivadas de las estructuras inoculadas. Esto se hace en condiciones *ex vitro*, no requiere de sistemas de cultivo ni regeneración *in vitro*. Los tejidos a partir de los cuales se ha logrado la transformación en planta son:

- I. Yemas florales: Inmersión de inflorescencias en una suspensión de *A. tumefaciens* o colocación de gotas o aspersión de ésta sobre las yemas florales.
- II. Flores maduras: La suspensión de *A. tumefaciens* se coloca junto con el polen en el pistilo maduro.
- III. Meristemos: Inoculación de la bacteria por punción en yemas axilares.
- IV. Semillas: Inoculación por punción, vacío o sonicación.

Otros sistemas de transformación genética

Los sistemas de transformación genética antes descritos son sin duda los que mejores resultados han dado. La gran mayoría de las plantas transgénicas que se han desarrollado, analizado e incluso liberado para la producción, han sido generadas mediante alguno de ellos. Sin embargo, en la literatura se han reportado varios sistemas diferentes a los mencionados, mismos que han tenido éxito en casos específicos. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de estos sistemas.

Tabla 12.1. Resumen de algunos de los métodos para la transformación genética de plantas reportados en la literatura.

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Agroinfección (Agroinoculación)	Introducción a la célula vegetal de genomas virales a través de <i>A. tumefaciens</i> .	Método muy eficiente para sobreexpresar proteínas de interés en plantas. No requiere de cultivo <i>in vitro</i> .	Sólo eficiente para expresión transitoria de genes, no hay integración al genoma.	Grimsley <i>et al.</i> , 1986
Electroforesis	Uso de la electroforesis para movilizar segmentos de ADN hacia un tejido vegetal.	Método sencillo, rápido y poco costoso.	Baja frecuencia de transformación, baja regeneración de plantas transgénicas, generación de quimeras.	Griesbach <i>et al.</i> , 1994

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Electroporación	Introducción de fragmentos de ADN a protoplastos vegetales a través de descargas eléctricas de alta intensidad y corta duración.	Fácil, rápido y de simple operación. Técnica común para transformar microorganismos por lo que hay equipos disponibles.	Necesidad de protoplastos, baja tasa de transformación y de integración del ADN al genoma, difícil regenerar plantas completas.	Sorokin <i>et al.</i> , 2000
Fibras de carburo de silicio	Las células vegetales se agitan en presencia de fibras de carburo de silicio y ADN. Las fibras penetran las células facilitando la entrada del ADN.	Método fácil, rápido y poco costoso.	Baja regeneración de plantas ya que se requieren suspensiones celulares embriogénicas, baja eficiencia de transformación. Toxicidad de las fibras de carburo de silicio.	Petolino y Arnold, 2009
Liposomas	Fusión de liposomas que contienen el ADN a transferir con protoplastos.	Capacidad de portar grandes fragmentos de ADN sin un vector.	Frecuencia muy baja de transformación, inserción del ADN en tándem, problemas en la preparación de los liposomas, requiere de protoplastos y de un método de regeneración a partir de éstos.	Zhu <i>et al.</i> , 1993
Microinyección	Inyección directa de ADN al núcleo de la célula vegetal (Protoplasto).	Proceso bajo control visual, cantidades controlables de ADN a introducir, alta tasa de transformación.	Se requiere personal y equipo altamente especializados, proceso caro y lento. Requiere de protoplastos y de un método de regeneración a partir de éstos.	Holm <i>et al.</i> , 2000
Microláser	Se hacen perforaciones momentáneas en la pared y membrana celular enfocando un microláser sobre microcallos. El ADN penetra a través de estos orificios.	No requiere de vectores, inyección óptica automatizada, alta velocidad, eficiente y preciso.	Se requiere de equipo óptico especializado de gran precisión, baja frecuencia de transformación y de integración del ADN al genoma.	Badr <i>et al.</i> , 2005

Método de transformación	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Nanotubos de carbono	Introducción de ADN o ARN mediada por nanotubos de carbono capaces de atravesar la pared y membrana celular.	Facilidad, bajo costo, alta eficiencia y capacidad de introducir grandes cantidades de ácidos nucleicos a la célula.	Baja dispersabilidad de los nanotubos en medios acuosos, por lo que se requieren de pretratamientos. Baja eficiencia de integración al genoma.	Burlaka <i>et al.</i> , 2015
Transferencia hidrodinámica	Uso de una alta presión hidrostática para desestabilizar la membrana y facilitar la penetración de ADN a la célula.	No requiere de vectores. Método rápido.	Baja eficiencia de integración al genoma. Requiere de equipo especializado.	Jinturkar <i>et al.</i> , 2011
Transferencia mediada por compuestos químicos	Uso de compuestos como polietilenglicol (PEG) combinados con choques térmicos con el fin de facilitar la entrada de ADN a protoplastos.	Método fácil, rápido, no se requiere de equipo sofisticado.	Regeneración de plantas con eficiencia reducida, baja eficiencia de transformación, poca reproducibilidad, necesidad de protoplastos y toxicidad celular de los compuestos empleados.	Kohler <i>et al.</i> , 1987
Vectores virales	Uso de virus como vehículo para introducir ADN a las células vegetales.	Infecciones rápidas, fáciles y sistémicas. Producción de grandes cantidades de proteínas heterólogas, rango de hospedadores amplio, no se requiere de cultivo <i>in vitro</i> .	No se generan líneas transgénicas ya que no hay integración al genoma, tamaño del transgen limitado, síntomas específicos de enfermedad, alta frecuencia de errores durante la síntesis del ARN.	Yusibov <i>et al.</i> , 2000

Selección de los tejidos o plantas transformados

En general, la eficiencia de los métodos de transformación desarrollados hasta la fecha, y descritos antes, es baja. Esto quiere decir que sólo una fracción de las células tratadas recibe efectivamente la nueva información genética. Por esto es de suma importancia poder seleccionar de una forma temprana a las células, tejidos o plantas que fueron transformadas, eliminando a las que no

recibieron la nueva información genética. Hasta la fecha, la manera más eficiente para poder llevar a cabo esta selección es incorporar secuencias de ADN adicionales a la empleada para mejorar o alterar las características de la planta. Estos genes pueden codificar para características que faciliten la selección y/o identificación temprana de las células, tejidos o plantas transformadas. Además, existen diversas técnicas que permiten detectar la presencia, número e incluso arreglo de las secuencias introducidas al genoma vegetal.

A continuación, se mencionan los métodos más empleados para la identificación y caracterización de células, tejidos y plantas transformadas.

- A. *Identificación a través del genotipo*: En este caso se introducen, junto con los genes de interés, otros que causen cambios fácilmente detectables en el fenotipo de los tejidos transformados. Los tipos de genes que se utilizan con este fin son:
 - I. *Marcadores de selección*. Son genes que codifican para enzimas que detoxifican antibióticos o herbicidas, haciendo a los tejidos resistentes a los mismos. De esta manera, la adición de estos compuestos al medio de cultivo, o a la planta misma, permite seleccionar a los tejidos resistentes, y por tanto transformados, al eliminar a los que no lo están. Ejemplo de estos genes marcadores ampliamente usados son *npt-II* que confiere resistencia a kanamicina (antibiótico) y *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina (herbicida).
 - II. *Genes reporteros*. Son genes cuyos productos generan una actividad no presente en los tejidos vegetales no transformados y fácilmente detectable. Ejemplo de esto son el gen *UidA* que genera una reacción enzimática colorida (GUS) o el gen *gfp*, tomado de una medusa bioluminiscente, que hace a los tejidos transformados capaces de emitir luz visible al ser estimulados con otras longitudes de onda.
- B. *Detección del ADN introducido dentro del genoma vegetal*. Para esto se hace uso de técnicas de biología molecular, como el Southern blot o la PCR para verificar la presencia de las secuencias introducidas, tanto en los tejidos directamente transformados, como en las plantas derivadas de los mismos y su progenie. Más recientemente, las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación han facilitado no sólo la detección de las secuencias introducidas en el genoma, sino el conocimiento del número

de copias, integridad y sitio de inserción. Además, permiten descartar la inserción de secuencias propias del vector usado para la transformación.

- C. *Detección de los productos de la transcripción y traducción de las secuencias introducidas.* Además del ADN introducido, es posible la detección del ARN producto de la transcripción del mismo, así como la proteína derivada de su traducción. En el primer caso se pueden usar las técnicas Northern blot o RT-PCR, y en el segundo el Western blot. Estas verificaciones son importantes ya que demuestran la funcionalidad de las secuencias introducidas.
- D. *Bioensayos.* Cuando la transformación genética tiene como finalidad mejorar o alterar alguna característica agronómica, la prueba más importante es la verificación mediante bioensayos, de que el cambio esperado ha sucedido. Estos bioensayos pueden hacerse sobre las plantas transformadas o su progenie.

Protocolos

Protocolo 12.1

Transformación genética de violeta africana o gloxinia mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) y la gloxínea (*Sinningia speciosa*) son plantas de ornato muy apreciadas pertenecientes a la familia Gesneriaceae. Son especies que responden muy bien al cultivo *in vitro* y se regeneran de manera rápida y muy eficiente a través de la organogénesis (Ver Capítulo 1 de esta obra). Además, son susceptibles a la transformación genética vía *A. tumefaciens*, por lo que pueden considerarse especies modelo en lo que respecta a este proceso.

Material biológico:

- Cultivos *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) o de gloxínea (*Sinningia speciosa*). Ver protocolo en Capítulo 1 de esta obra.
- Cepa bacteriana: *A. tumefaciens* (Cepa desarmada que contenga un vector binario con gen marcador de selección (*npt-II*) y gen reportero (*uid A*)).

Medios de cultivo:

Para la bacteria:

YEB + 50 mgL⁻¹ de Kanamicina + 50 mgL⁻¹ de Rifampicina¹

Medio YEB (Para 1 L).

Extracto de carne	5.0 g	pH 7.0
Peptona	5.0 g	
Sacarosa	5.0 g	
Extracto de levadura	1.0 g	
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0.5 g	
Para medio sólido añadir 12-15 g de agar		

Para el tejido vegetal:

- Medio MS líquido, ph 5.7 con 3% de sacarosa (En frascos pequeños con 45 mL)
- Medio MS pH 5.7 con 3% de sacarosa y 8 gL⁻¹ de agar como gelificante (En cajas petri)
- Medio MS líquido, ph 5.7 con 3% de sacarosa y 500 mgL⁻¹ de Claforán² (Frasco Gerber).
- Medio MS, ph 5.7 con 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar como gelificante, 2 mgL⁻¹ de AIA, 1 mgL⁻¹ de BA, 250 mgL⁻¹ de Claforán y 50 mgL⁻¹ Kanamicina (Frascos Gerber con 30 mL de medio)
- Medio MS, ph 5.7 con 3% de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar como gelificante, 250 mgL⁻¹ de Claforán y 50 mgL⁻¹ Kanamicina (Frascos Gerber con 30 mL de medio)

Para la preparación del medio MS consultar Capítulo 1 de esta obra.

1 O los antibióticos necesarios dependiendo de la cepa seleccionada.

2 Claforán: Antibiótico usado para eliminar a *A. tumefaciens* después del cocultivo.

Procedimiento

1. Para obtener la suspensión bacteriana, inocular una colonia de *A. tumefaciens* en 50 mL de medio YEB líquido e incubar a 28°C con agitación continua, esto debe hacerse 72 horas antes de la transformación.
2. Agregar 50 µL de acetosiringona 100 mM y 5 mL del cultivo bacteriano a un frasco del medio de cultivo (a).
3. Procesar los explantes y depositarlos en el medio (a) con acetosiringona y la bacteria. Para obtener los explantes: Tomar hojas de plantas de violeta africana o gloxínea establecidas *in vitro*. Eliminar los bordes y hacer 2-3 heridas por el envés de la hoja a lo largo de la lámina. Hacer cortes limpios con bisturí evitando aplastar el tejido.
4. Mantener los explantes en el medio (a) con acetosiringona y bacteria 30 minutos a partir de que se introdujo el último.
5. Sacar los explantes de la suspensión bacteriana, secar el exceso de líquido colocándolos suavemente sobre gasa estéril y transferirlos a las cajas con medio sólido sin antibióticos (b).
6. Mantenerlos por 24-72³ horas en la obscuridad a 26 °C (Cocultivo).
7. Transferir los explantes al medio (c) y mantenerlos en el mismo por 2 hrs bajo agitación suave.
8. Transferir los explantes al medio (d), máximo 2 explantes por recipiente. Incubarlos a 26 °C con fotoperiodo. En caso de observarse crecimiento bacteriano repetir los pasos 7 y 8. En caso contrario, subcultivar a medio fresco cada 12 días hasta observar la aparición de brotes, presuntamente transformados.
9. Colectar los brotes, individualizarlos y colocarlos en posición vertical en el medio medio (e) para su enraizamiento.
10. Una vez que los brotes enraícen y alcancen unos 15-20 mm de altura, colectar un segmento de hoja de cada uno de ellos y llevar a cabo un ensayo histoquímico para detectar actividad de GUS.

3 El tiempo de cocultivo dependerá de la cepa y concentración bacteriana utilizada. Se recomienda llevar a cabo un experimento probando 24, 48 y 72 h de cocultivo. Un tiempo corto de cocultivo genera una baja eficiencia de transformación. Un tiempo demasiado largo hace muy difícil eliminar a la bacteria una vez concluido y puede generar necrosis en el tejido.

Protocolo 12.2

Ensayo histoquímico para β -glucoronidasa (gus).

Solución de reacción

Para preparar 1 mL

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Buffer fosfatos 1M	100 μ L	100 mM
EDTA 0.25 M	40 μ L	10 mM
Ferrocianuro de potasio 5 mM	100 μ L	0.5 mM
Ferricianuro de potasio 5 mM	100 μ L	0.5 mM
Triton 10%	10 μ L	0.1 %
X-gluc 40 mM	50 μ L	2.0 mM
Agua desionizada	600 μ L	

Procedimiento

1. Tomar un fragmento de tejido vegetal y colocarlo en el fondo de un tubo para microcentrífuga.
2. Cubrir el tejido con la solución e de reacción e incubar a 37 °C hasta que aparezca un precipitado azul en el tejido transformado. Esto sucede entre las 2 y 12 horas de incubación, dependiendo de la velocidad de penetración del sustrato al tejido, normalmente la coloración comienza a aparecer en las heridas.
3. Detener la reacción eliminando la solución y cubriendo el tejido con etanol al 70%. En el caso de tejidos verdes, cambiar varias veces el etanol para eliminar los pigmentos fotosintéticos que pueden encubrir el color azul producto de la reacción.
4. El tejido se puede conservar por tiempo indefinido en etanol al 70%.

Preparación de las soluciones

Buffer fosfatos 1M.

Fosfato monobásico de Na 12.0 g disueltos en 100 mL de agua desionizada

Fosfato dibásico de Na 14.2 g disueltos en 100 mL de agua desionizada

Añadir el primero al segundo hasta alcanzar un pH de 7

EDTA 0.25 M.

0.465 g/50 ml de buffer fosfatos 100 mM pH 7

Ferrocianuro de potasio 5 mM.

105 mg disueltos en 50 mL de buffer fosfatos 100 mM pH 7

Ferricianuro de potasio 5 mM.

82.5 mg disueltos en 50 mL de buffer fosfatos 100 mM pH 7

X-Gluc 40 mM.

5.2 mg disueltos en 250 μ L de dimetilformamida⁴

Abreviaturas

ADN-T: ADN transferible. Porción del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, del Ri de *A. rhizogenes*, o de un vector binario, que se transfiere al genoma de la célula vegetal.

GUS: Enzima β -glucuronidasa.

Ri: Plásmido inductor de raíces de *Agrobacterium rhizogenes*.

rol: Genes de *Agrobacterium rhizogenes* que al ser transferidos al genoma vegetal confieren el fenotipo de raíz pilosa.

Ti: Plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*.

vir: Genes de virulencia de *Agrobacterium*.

4 Verificar la forma de solubilizar en las instrucciones del producto. Las características de solubilidad varían de acuerdo a la marca comercial del sustrato.

Bibliografía

- Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molec. Breeding*, 15:305-327.
- Badr, Y., Kereim, M., Yehia, M., Fouad, O. and Bahieldin, A. (2005). Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture. *Photochem Photobiol Sci*; 4(10):803–7.
- Beranova, M.; Rakousky, S.; Vavrova, Z.; Skalicky, T. (2008). Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 94(3), 253-259.
- Bolívar-Zapata, F.G. (Coordinador). (2017). *Transgénicos: Grandes beneficios, ausencia de daños y mitos*. Academia Mexicana de Ciencias, A.C. 497 pp.
- Bower, R., Birch, R. (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J*, 2:409–16.
- Brandenberg, O., Dhlamini, Z., Sensi, A., Ghosh, K., Sonnino, A. (2011). *Introduction to molecular biology and genetic engineering*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Broothaerts, W., Mitchell, H., Weir, b., Kaines, S., Smith, l., Yang, W., Mayer, J., Rodriguez, C., Jefferson, R. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433:629-633.
- Burlaka, O.M., Pirko, Y.V., Yemets, A.I., Blume, Y.B. (2015). Application of Carbon Nanotubes for Plant Genetic Transformation. O. Fesenko, L. Yatsenko (eds.), *Nanocomposites, Nanophotonics, 233 Nanobiotechnology, and Applications*, Springer Proceedings in Physics 156, Springer International Publishing Switzerland. pp 233-255.
- Canche-Moo, R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V., Rodríguez-Zapata, L. and Castaño, E. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tiss Org Cult*; 84(3):373–377.
- Chaparro-García, A., Kamoun, S., Nekrasov, V. (2015). Boosting plant immunity with CRISPR/Cas. *Genome Biology*, 16:254.
- Christou P., Ford T.L., Kofron, M. (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica

- varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Biotechnology*, 9:957–962.
- Chumakova, M.I., Moiseeva, E.M. (2012). Technologies of *Agrobacterium* Plant Transformation In planta. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48:657–666.
- Dandekar, A.M. (1992). Transformation. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Hammerschlag, F.A., Litz, R.E. (Eds). CAB International, Cambridge. pp. 141-168.
- Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian J. Plant Physiol.*, 54(5):569-581.
- Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X *et al.* (2015) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 87:99–110.
- Gelvin, S. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene- Jockeying” Tool. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 67(1),16-37.
- Georgiev, M.I., A.I. Pavlov, T. Bley. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1175-1185.
- Gosal, S.S., Wani, S.H. (2018). Plant Genetic Transformation and Transgenic Crops: Methods and Applications. S. S. Gosal, S. H. Wani (eds.), *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2*, Springer International Publishing AG. pp. 1-23.
- Griesbach, R., Hammond, J. (1994). An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Sci.*; 102 (1):81–9.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., Walden, R. (1986). “Agroinfection,” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3282–3286. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3282>
- Hagio T., Hirabayashi T., Machii H. & Tomotsune H. (1995). Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants using the hygromycin resistance marker. *Plant Cell Rep.*, 14:329–34.
- Holm, P., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H. and Knudsen, S. (2000). Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res.*; 9 (1):21–32.

- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2020) Disponible en internet en <http://www.isaaa.org/>. (acceso 31/01/2020).
- Jauhar, P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Sci.*, 46: 1841-1859.
- Jinturkar, K. A., Rathi, M. N., Misra, A. (2011). Gene Delivery Using Physical Methods. In *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, pp. 83-126.
- Kavipriya, C., Yuvaraja, A., Senthil, K., Menaka, C. (2019). Genetic Transformation Methods for Crop Improvement: A Brief Review. *Agricultural Reviews*, 40(4): 281-288.
- Kim, Y.J., B.E. Wyslouzil, P.J. Weathers. (2002). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:1-10.
- Kohler, F., Golz, C., Eapen, S., Kohn, H. and Schieder, O. (1987). Stable transformation of mothbean (*Vigna aconitifolia*) via direct gene transfer. *Plant Cell Rep.* 6: 313-7.
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., Komari, T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol.*, 145:1155-1160.
- Liu, L., Fan, X.D. (2014). CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol. Biol.* 85:209-218.
- Mohan Babu, R., Sajeena, A., Seetharaman, K., Reddy, M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. *Crop Protection*, 22(9):1071-1086.
- Pérez-Molphe-Balch, E. 2017. Capítulo V. Transformación genética: aplicaciones en la agricultura. en: *Fundamentos de Biotecnología Vegetal*. Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo Hernández, G., Castellanos-Hernández, O. (Eds). Universidad de Guadalajara, ISBN: 978-607-742-970-8. pp. 99-122.
- Petolino, J., Nicole, A. (2009). Whiskers-Mediated Maize Transformation. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 526. 59-67. 10.1007/978-1-59745-494-0_5.
- Rao, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A., Husnain, T., Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechn. Adv.*, 27:753-763.

- Rivera, A.L., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., Loske, A.M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Phys. Life Rev.*, 9:308–345.
- Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M. (2014). Genetic transformation of cells using physical methods. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, 5: 237.
- Sanford, J. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 36:303-308.
- Schimpl, S., Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12:1-9.
- Somers, D.A., Rines, H.W., Gu, W., Kaeppler, H.F., ushnell, W.R. (1992). Fertile, transgenic oat plants. *Biotechnology*, 10, 1589–94.
- Sorokin, A., Ke, X., Chen, D., and Elliot, M. (2000). Production of fertile wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci.* 2000; 156 (2):227–33.
- Taylor, N., Fauquet, C. (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, 21:963-977.
- Tempe, J. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: Agrobacterium Ri plasmids. In. [Schell, J., I.K. Vasil] Eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 6. Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*. Academic Press. San Diego. pp. 26-51.
- Twyman, R.M., Christou, P. (2004). Plant transformation technology: particle bombardment. In *Handbook of Plant Biotechnology*, eds. Christou P., Klee H. John Wiley & Sons Inc., NY, pp. 263–89.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genetics*, 20(8):375-383.
- Valentine, L. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiol.*, 33:948-955.
- Van der Salm, T.P.M., C.H. Hanish ten Cate, H.J.M. Dons. (1996). Prospects for application of *rol* genes for crop improvement. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:207-228.
- Vasil, V., Castillo, A., Fromm, M., Vasil, I. (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biotechnology*, 10:667–74.
- Veena, V., C.G. Taylor. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:383-403.

- Yusibov V., Shivprasad S., Turpen T.H., Dawson W., Koprowski H. (2000). Plant Viral Vectors Based on Tobamoviruses. In: Hammond J., McGarvey P., Yusibov V. (eds) *Plant Biotechnology. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 240. Springer, Berlin, Heidelberg
- Zhu, Z., Sun, B., Liu, C., Xiao, G., and Li, X. (1993). Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets. *Chin J Biotechnol.*, 9:257–61.

Capítulo 13

Estudio y bioinformática de Proteínas

José Francisco Morales Domínguez
Cindy Damara Anaya Madrigal
Claudia Samantha Díaz de León Gutiérrez
Nora Lilia Vasco Méndez
*Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

Hasta ahora se sabe que la actividad y función de las células es dictada por la información genética del organismo en cuestión, de esta forma se sintetizan las proteínas de acuerdo con las necesidades del metabolismo celular. Los genes que serán encendidos van a depender específicamente del momento y las necesidades fisiológicas de la célula, así como del tejido al que pertenezca. De esta forma se sintetizan las proteínas que lleven a cabo los procesos metabólicos requeridos, ya que las proteínas, específicamente las enzimas, son los componentes principales de las rutas metabólicas al realizar las reacciones químicas específicas que sostienen el metabolismo y les dan mantenimiento a las estructuras propias de las células. En este capítulo daremos una vista general de las proteínas con la finalidad de entender-

las, es decir conocer la importancia para las plantas y de cualquier ser vivo. También se abordará un apartado donde se muestre una ruta bioinformática para la búsqueda de proteínas y su modelado hipotético.

Aminoácidos: bloques constructores de las proteínas

Los aminoácidos son los compuestos químicos de los cuales se encuentran constituidas las proteínas, su estructura química general se muestra en la figura 13.1. El aminoácido debe su nombre a que contiene un grupo amino y un grupo ácido, ambos unidos a un carbono central denominado carbono alfa, al cual también se le une un átomo de hidrogeno y un grupo R o cadena lateral que es un comodín, ya que puede ser intercambiado por diferentes Radicales o compuestos químicos que le da identidad al aminoácido, dependiendo del grupo R es el nombre que recibe el aminoácido (Fig.13.1).

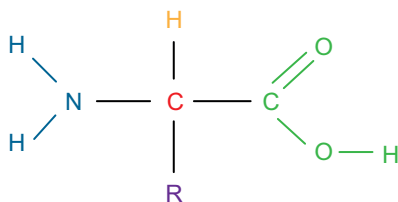


Figura 13.1. Estructura general de un aminoácido. En azul se muestra el grupo amino, en rojo el carbono alfa, en verde el grupo carboxilo y en morado el grupo de cadena lateral (radical R) quien diferencia a los aminoácidos.

Cada aminoácido tiene su propio nombre y su nombre abreviado ya sea por una o por tres letras (Tabla 13.1). Dependiendo de las características químicas del grupo R o radical, los aminoácidos pueden ser clasificados de muy diferentes formas.

Tabla 13.1. Características y código genético de los aminoácidos

Aminoácido	Codón	Características
Arginina Arg R	AGA	Aminoácido esencial para el ser humano, presenta carga positiva debido a sus grupos amino extras en su cadena lateral que le otorgan su carácter básico y es polar. Es glucogénico. Se encuentra en carnes, pescado y lácteos.
	AGG	
	CGA	
	CGC	
	CGG	
	CGU	
Histidina His H	CAC	Aminoácido esencial para el ser humano, presenta carga positiva debido a su grupo imidazol en su cadena lateral que le otorga su carácter básico y es polar. Es glucogénico. Se encuentra en carnes, pescado y lácteos.
	CAU	
Lisina Lys K	AAA	Aminoácido esencial para el ser humano, presenta carga positiva debido a un grupo amino extra en su cadena lateral que le otorga su carácter básico, es polar y cetogénico. Se encuentra en carnes, pescado y lácteos.
	AAG	
Ácido Aspártico Asp D	GAU	Aminoácido no esencial para el ser humano, presenta carga negativa debido a un grupo carboxilo extra en su cadena lateral y es polar. Es glucogénico. Se encuentra en chicharos, lentejas soya y espárragos.
	GAC	
Ácido Glutámico Glu E	GAA	Aminoácido no esencial para el ser humano, presenta carga negativa debido a un grupo carboxilo extra en su cadena lateral y es polar. Es glucogénico. Se encuentra en proteínas vegetales y animales.
	GAG	
Serina Ser S	AGC	Aminoácido no esencial para el ser humano, no presenta carga, pero es polar debido al grupo hidroxilo en su cadena lateral. Es glucogénico. Se obtiene de la hidrólisis de la seda. Se encuentra en proteínas vegetales y animales.
	AGU	
	UCA	
	UCC	
	UCG	
	UCU	
Treonina Thr T	ACA	Aminoácido esencial para el ser humano, no presenta carga, pero es polar debido al grupo hidroxilo en su cadena lateral. Es cetogénico y glucogénico. Se encuentra en proteínas vegetales y animales. Especialmente en el requesón, lentejas y ajonjolí.
	ACC	
	ACG	
	ACU	
Asparagina Asn N	AAC	Aminoácido no esencial, polar sin carga debido a que presenta un grupo carboxamida como cadena lateral. Es glucogénico. Se encuentra en proteínas vegetales y animales.
	AAU	
Glutamina Gln Q	CAA	Aminoácido no esencial con cadena lateral polar sin carga. Es muy importante en la degradación de aminoácidos y síntesis de aminoácidos. Es glucogénico. Se encuentra en vegetales de hoja verde.
	CAG	

Aminoácido	Codón	Características
Alanina Ala A	GCA GCC GCG GCU	Aminoácido no esencial para el ser humano, hidrófobo sin carga, con un grupo metilo como su cadena lateral. Es glucogénico. Se encuentra en proteínas de origen animal como carne, leche y huevo.
Isoleucina Ile I	AUA AUC AUU	Aminoácido esencial para el ser humano, es hidrófobo sin carga debido a que su cadena lateral es alifática. Es cetogénico y glucogénico. Se encuentra en proteína animal, en la soya y amaranto.
Leucina Leu L	CUA CUC CUG CUU UUA UUG	Aminoácido esencial para el ser humano, la cadena lateral es alifática lo que le confiere su carácter hidrófobo, es cetogénico. Se localiza en proteínas animales y en leguminosas.
Metionina Met M	AUG	Aminoácido esencial para el ser humano, es hidrófobo debido a su cadena lateral alifática que presenta azufre, es uno de los dos aminoácidos proteicos azufrados. Es glucogénico. Es uno de los dos únicos aminoácidos con un solo codón que codifica para el aminoácido además del Triptófano, dicho codón indica el inicio de la síntesis de las proteínas. Todas las proteínas “nacen” con la metionina como primer aminoácido.
Fenilalanina Phe F	UUC UUU	Aminoácido esencial para el ser humano, hidrófobo debido a que contiene un anillo bencénico en su cadena lateral por lo que pertenece a los aminoácidos aromáticos, es tanto cetogénico como glucogénico. Se encuentra en proteína animal leche carne y huevo, y en proteína vegetal de leguminosas.
Triptófano Trp W	UGG	Aminoácido esencial para el ser humano, es uno de los dos aminoácidos que es codificado por un solo codón, el otro es la Metionina. Su cadena lateral es un grupo indol aromático lo que le confiere carácter hidrófobo. Es cetogénico y glucogénico. Se encuentra en proteína animal como vegetal.
Tirosina Tyr Y	UAC UAU	Aminoácido no esencial para el ser humano, aromático, su cadena lateral presenta un anillo bencénico hidroxilado lo que le confiere cierta polaridad a la cadena lateral hidrófoba. Es cetogénico y glucogénico. Se encuentra en proteína animal y vegetal.
Valina Val V	GUA GUC GUG GUU	Aminoácido esencial para el ser humano, con cadena alifático lo que le confiere carácter hidrófobo. Es glucogénico. Se encuentra en frutos rojos, chocolate, plátano.

Aminoácido	Codón	Características
Cisteína Cys C	UGC UGU	Aminoácido no esencial para el ser humano, es uno de los dos aminoácidos azufrados, el otro es la metionina, en su cadena lateral se presenta un grupo tiol capaz de formar puentes disulfuro con otra cisteína para formar el residuo Cistina. Es glucogénico. Se encuentra en proteína animal y vegetal.
Prolina Pro P	CCA CCC CCG CCU	Aminoácido no esencial para el ser humano, su cadena lateral alifática se une con el grupo amino formando un anillo, lo que le permite a la cadena polipeptídica dar giros cerrados y cambiar la dirección de los motivos. Es glucogénico.
Glicina Gly G	GGA GGC GGG GGU	Aminoácido no esencial para el ser humano, su cadena lateral es sólo un hidrógeno lo que le hace ser el aminoácido más pequeño, se le considera hidrófobo. Es glucogénico. Se encuentra ampliamente distribuido en proteína vegetal y animal.

Los aminoácidos alifáticos son aminoácidos cuya cadena lateral o grupo R es hidrofóbico constituido exclusivamente por carbono e hidrógeno.

Los aminoácidos aromáticos contienen un anillo de benceno por lo que son hasta cierto punto hidrófobos, son utilizados para sintetizar algunas hormonas en el organismo.

Los aminoácidos ácidos justo tienen la característica de ser ácidos y tienen carga negativa, mientras que los aminoácidos básicos son básicos o alcalinos y tienen carga positiva, en ambos casos por tener carga positiva o negativa son aminoácidos hidrófilos.

Los aminoácidos amidas contienen un segundo grupo amino en su cadena lateral por lo que están cargados positivamente y son hidrófilos.

Los aminoácidos hidroxilados contienen grupos OH en su cadena lateral lo que los hace ser hidrófilos.

Los aminoácidos azufrados contienen azufre en su cadena lateral.

La prolina es el único aminoácido en el que su cadena lateral se une con el grupo amino y forma un anillo.

Enlace Peptídico

Se considera una proteína cuando se han enlazado de forma lineal 100 o más aminoácidos y se considera péptido cuando se han enlazado menos de 100 aminoácidos. El enlace entre aminoácidos se lleva a cabo mediante el denominado enlace peptídico que es un enlace covalente entre el carbono del grupo ácido del primer aminoácido con el nitrógeno del grupo amino del segundo aminoácido, al formarse el enlace peptídico se desprende una molécula de agua como se muestra en la Figura 13.2.

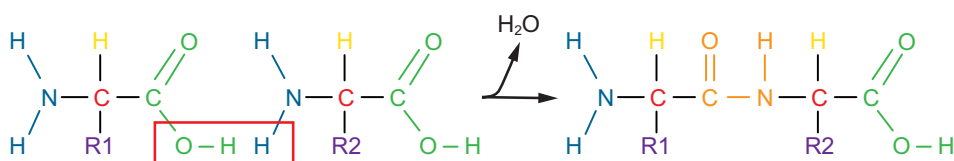


Figura 13.2. Unión peptídica entre dos aminoácidos. El OH del carboxilo del aminoácido uno; se une con el hidrógeno del grupo amino del segundo aminoácido, liberando una molécula de agua durante la reacción de formación del enlace peptídico entre el carbono del grupo ácido del primer aminoácido y el nitrógeno del grupo amino del segundo aminoácido.

El enlace peptídico es un enlace más corto que el enlace covalente simple y también es rígido como un doble enlace covalente, ambas características son debido a que la nube electrónica del doble enlace entre el carbono con el oxígeno del grupo carboxilo también resuena en el enlace peptídico entre el carbono del grupo carboxilo del primer aminoácido y el nitrógeno del grupo amino del siguiente aminoácido, de tal forma que podríamos mencionar que el enlace peptídico es un “semidoble enlace covalente”. Los demás enlaces covalentes simples de los aminoácidos en la cadena de aminoácidos tienen su movilidad normal de 360°.

Imaginemos una proteína como un collar de perlas, en donde cada perla es un aminoácido y el hilo que las une es el enlace peptídico. Recordemos que las cadenas laterales o grupos R de los aminoácidos tienen características químicas que los hacen tener cargas positivas o negativas, ser hidrófilos o hidrófobos, sabemos que las cargas opuestas se atraen, sabemos que cargas iguales se repelen, sabemos que lo hidrófilo atrae a lo hidrófilo, que lo hidrófobo atrae a lo hidrófobo y que lo hidrófobo repele a lo hidrófilo, de esta forma

imaginemos que en ese collar de aminoácidos algunos aminoácidos se atraen entre sí, que otros aminoácidos se repelen uno a otros, y de esta forma sin romperse los enlaces peptídicos, se empiezan a generar formas en la cadena de aminoácidos (proteína) por atracción y repulsión de las cadenas laterales o grupos R de los aminoácidos, un ejemplo sencillo es el que mostramos abajo. Esas diferentes formas van generando estructuras en las proteínas.



Figura 13.3. Ejemplo sencillo de atracciones y repulsiones en la cadena de aminoácidos.

Importancia y funciones de las proteínas.

Aspectos nutricionales de las proteínas

Todos los organismos vivos estamos hechos de proteínas en mayor o menor grado, en general de dos tipos de proteínas, proteínas sin actividad metabólica y proteínas con actividad metabólica (enzimas). Las proteínas sin actividad metabólica, son proteínas estructurales y/o de almacenamiento, es decir forman parte de estructuras como los ribosomas, forman parte del cito esqueleto de las células, y las proteínas de almacenamiento que forman gránulos proteicos en las células del endospermo o cotiledones de las semillas, que le servirán a la semilla para alimentarse y activar el metabolismo para la germinación y establecimiento de la nueva planta en suelo, entre otras muchas funciones de las proteínas.

Las proteínas con actividad metabólica básicamente son enzimas que llevan a cabo las reacciones bioquímicas dentro de nuestras células con lo que se mantienen la homeostasis del organismo.

Por su origen las proteínas pueden clasificarse en proteínas de origen animal o proteínas de origen vegetal. Las proteínas de origen animal son las de alto valor nutricional para el ser humano, estas son las proteínas de la leche, el huevo y todo tipo de carne o pescado.

Las proteínas de intermedio valor nutricional para el hombre, en general son las proteínas de leguminosas y las de cereales. Los vegetarianos mezclan proteínas de leguminosas con proteínas de cereales y de esta forma consumen proteína de mejor calidad nutricional, ya que se complementan en su valor nutricional. Es recomendable que los niños que están en crecimiento consuman proteínas de alta calidad nutricional, mientras que los adultos se encontrarán en buenas condiciones consumiendo la mezcla de proteínas de leguminosas con cereales.

La calidad nutricional de las proteínas depende del número y cantidad de aminoácidos de los cuales se encuentre constituida la proteína. Existen 20 aminoácidos de los cuales están conformadas las proteínas, 10 de ellos son aminoácidos esenciales, lo que significa que deben ser ingeridos de los alimentos ya que nuestro organismo no es capaz de sintetizarlos, de esta forma las proteínas constituidas por esos 10 aminoácidos esenciales y cuyas cantidades en la misma proteína sean las adecuadas para el ser humano, constituyen proteínas de alto valor nutricional (leche, huevo, todo tipo de carne y pescado), mientras que las proteínas de origen vegetal como leguminosas y cereales, presentan de bajo a intermedio valor nutricional, de ahí que deben ser combinadas.

Las proteínas, tanto enzimas como proteínas estructurales y de almacenamiento que se encuentran en las células de animales y vegetales son de las que nos alimentamos. Desde el punto de vista nutricional las proteínas son de gran importancia en la alimentación del ser humano, en general se recomienda 0.99 g de proteína por kilogramo de peso al día. De esta forma, una persona de 60 kg deberá consumir 59.4 g de proteína al día y una persona de 80 kg deberá consumir 79.2 g de proteína al día, para nada son las cantidades exorbitantes que solemos consumir.

Tabla 13.2. Aminoácidos esenciales y no esenciales para el organismo humano

Esenciales	No esenciales
Histidina	Alanina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Ácido aspártico
Lisina	Ácido glutámico
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Glutamina
Treonina	Glicina
Triptófano	Prolina
Valina	Serina
Arginina*	Tirosina

*El aminoácido Arginina es esencial durante la infancia.

Niveles estructurales de las proteínas

Estructura primaria

En este apartado y para fines más didácticos, se analizarán los tres niveles estructurales de la proteína β -expansina de maíz (EXPB1_MAIZE).

La estructura primaria de una proteína se refiere a la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica (proteína), dicha secuencia está dada por la información genética almacenada en el ADN, recordemos que los aminoácidos están codificados por tripletes de nucleótidos denominados codones. En la figura 13.4, se observa los primeros treinta nucleótidos y su complementario de la secuencia de la EXPA1 de maíz. Ha de recordar el lector que, en todas las secuencias de ADN, al inicio de cada cadena lleva el 5' y al final el 3'. Debido a que son treinta nucleótidos, entonces se formarán 10 codones o tripletes de nucleótidos y por lo tanto diez aminoácidos; esto se puede observar en la misma figura en el primer marco de lectura abierta (IMLA), donde el codón atg codifica para M, o metionina y el último gtc para V, o valina.

Sin embargo, existe la posibilidad de que la lectura del gen empiece en el segundo nucleótido y de allí se forme otro diferente codón que sería tgg que

sería el 2 MLA. En la figura 13.4, el nucleótido que no se tomaría en cuenta para la nueva lectura esta de color rojo. A este tipo de lectura se le conoce como marcos de lectura abierta (MLA), lo que quiere decir que en nuestra secuencia se tienen seis diferentes MLA, de esta manera se tendrían seis secuencias de aminoácidos diferentes. Para el cuarto MLA, éste empezaría en la cadena complementaria en la dirección de 5' a 3' por lo que el primer codón sería gac que codifica para D o ácido aspártico.

Por lo que el primer codón sería gac que codifica para D, o ácido aspártico. También se observa que en los MLA tres, y seis existen codones de paro que están representados por un guion (taa, tga, que en el ARN serían uaa y uga).

Secuencia de ADN

5' atg gga tcc ctc gtt aat aac atc atg gtc 3'
3' tac cct agg gag caa tta ttg tag tac cag 5'

Marcos de lectura abierta

1 MLA

atg gga tcc ctc gtt aat aac atc atg gtc
M G S L V N N I M V

2 MLA

atgg gat ccc tog tta ata aca tca tgg
W D P S L I T S W

3 MLA

atggg atc cct cgt taa taa cat cat ggt
G I P R - - H H G

4 MLA

gac cat gat gtt att aac gag gga tcc cat
D H D V I N E G S H

5 MLA

gacc atg atg tta tta acg agg gat ccc
T M M L L T R D P

6 MLA

gacca tga tgt tat taa cga ggg atc cca
P - C Y - R G I P

Figura 13.4. Marcos de lectura abierta (MLA). En la figura se observan los seis MLA de la secuencia de ADN. En rojo se representan las bases nitrogenadas que no se toma en cuenta para la formación del codón y el guion es el codón de paro (<https://web.expasy.org/translate/>).

También con la estructura primaria se puede predecir la estructura secundaria de la proteína. Como ejemplo se tiene la estructura primaria de una expansina nombrada en la base de datos como EXPB1_MAIZE (Fig. 13.5); las expansinas son proteínas que modifican la pared celular de plantas. En la misma figura, se muestra, que la secuencia de aminoácidos lleva un orden, en este ejemplo la proteína comienza con el aminoácido uno el cual es M o Metionina y corresponde al grupo Amino terminal (H_3N^+ -, NH_3^+ -) libre, y así sucesivamente hasta el último aminoácido, que en este caso es el aminoácido Y, o tirosina, que se distingue por el grupo carboxilo ($-COO^-$) libre. Los enlaces peptídicos son la fuerza que mantiene la estructura primaria.

```
>sp|P58738|EXPB1_MAIZE  Expansin-B1  OS=Zea  mays  OX=4577  GN=EXPB1  PE=1  SV=2
MGSLANNIMVVGAVLAALVAGGSCGPPKVPPGPNITTNYNGKWLTARATWYGQPNGAGAPDNGGACGIKNVNLPPY
SGMTACGNVPIFKDGKGCSCYEVRCKEKPECSGNPVTVYITDMNYEPIAPYHFDLSGKAFGSLAKPGLNDKIRHCGI
MDVEFRRVRCKYPAGQKIVFHIEKGCNPNYLAVLVKYVADDGDIVLMEIQDKLSAEWKPMKLSWGAIWRMDTAKLK
GPFSIRLTSESGKKVIAKDVIPANWRPDAVYTSNVQFY
```

Figura 13.5. Secuencia de aminoácidos de una expansina de maíz (EXPB1_MAIZE). Sombreado en verde es donde inicia el modelo de la estructura 3D. Sombreado en gris, el dominio EG45 y sombreado en azul el dominio CBD y en magenta el motivo conservado HFD característico de las expansinas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Estructura secundaria

Existen dos tipos de estructura secundaria en una proteína, la denominada alfa hélice y la denominada beta hoja plegada, ambas estructuras son estables gracias a la gran cantidad de puentes de hidrógeno (atracciones electrostáticas entre cargas negativas y positivas) que se generan entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Ambas estructuras básicamente se generan por la secuencia de aminoácidos, los estudios de estas estructuras muestran aminoácidos con mayor prevalencia en cada una de ellas, como se muestra en la tabla 13.3.

Tabla 13.3. Aminoácidos que muestran mayor presencia en las estructuras secundarias

Aminoácido	Alfa Hélice	Beta Plegada	Vuelta Reversa
Ac. Glutámico	1.58	0.52	1.01
Alanina	1.41	0.72	0.82
Leucina	1.34	1.22	0.57
Metionina	1.30	1.14	0.52
Glutamina	1.27	0.98	0.84
Lisina	1.23	0.69	1.07
Arginina	1.21	0.84	0.90
Histidina	1.05	0.80	0.81
Valina	0.90	1.87	0.41
Isoleucina	1.09	1.67	0.47
Tirosina	0.74	1.45	0.76
Cisteína	0.66	1.40	0.54
Triptófano	1.02	1.35	0.65
Fenilalanina	1.16	1.33	0.59
Treonina	0.76	1.17	0.90
Glicina	0.43	0.58	1.77
Asparagina	0.76	0.48	1.34
Prolina	0.34	0.31	1.32
Serina	0.57	0.96	1.22
Ac. Aspártico	0.99	0.39	1.24

En la figura 13.6, se muestra la estructura secundaria de la EXPB1_MAI-ZE, con número de acceso 2hcz en el PDB. Las letras A mayúsculas en rojo representan la estructura beta, mientras que las letras H mayúsculas en azul son las alfa hélices, los motivos de giro están representados por el símbolo β para las vueltas en beta y γ y vuelta gamma, las uniones entre los números encerrados en círculo amarillo (1, 2 y 3) representa los enlaces de disulfuro (www.ebi.ac.uk)

En resumen, esta proteína tiene tres alfa-hélices y 14 betas con varios giros beta y gamma y tres puentes disulfuro donde participan seis cisteínas (C) conservadas. Otra manera de presentar la estructura secundaria es como se muestra

en la figura 13.7. En la figura 13.7a, las flechas en rosa representan las estructuras betas y los cilindros en rojo las alfa-hélices. La primera estructura en beta empieza con la secuencia de LTARATWY que van de la posición 20-27, seguida de otra beta de la posición 55-59 y dos alfa-hélice de la 60-65 y 66- 68 y así sucesivamente hasta llegar a la posición 131-138 con una beta (Fig. 13.7 a y b).

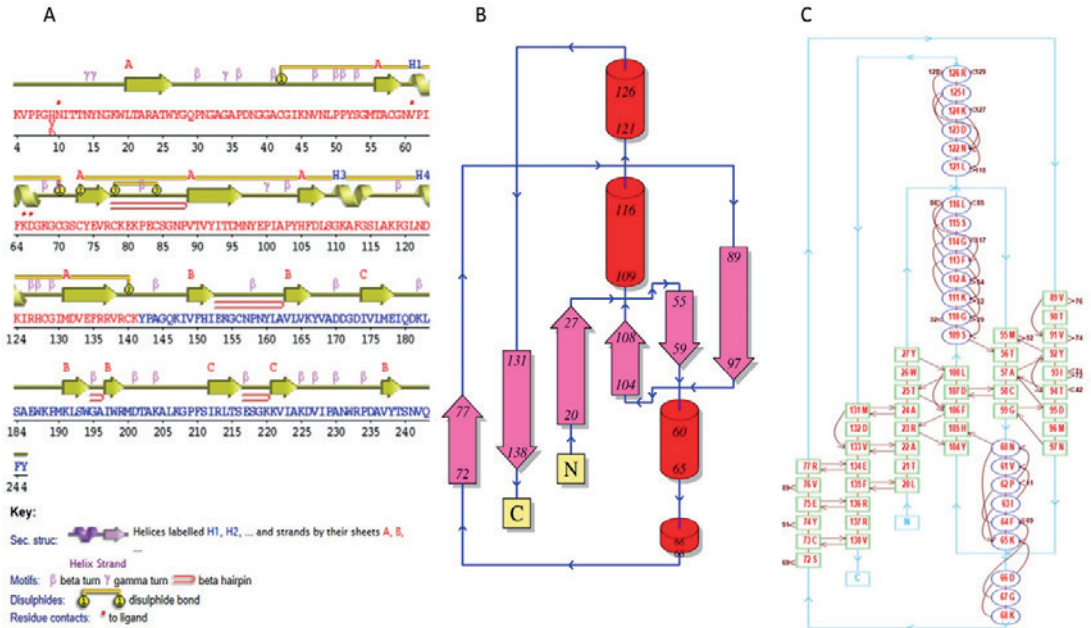


Figura 13.6. Estructura secundaria de la EXPB1_MAIZE. En letras color rojo corresponde al dominio I y en azul al dominio II, la letra A mayúscula en rojo arriba de la flecha indica las estructuras beta, las letras H mayúsculas en azul la estructura alfa-hélice (imagen tomada de PDBSum: www.ebi.ac.uk)

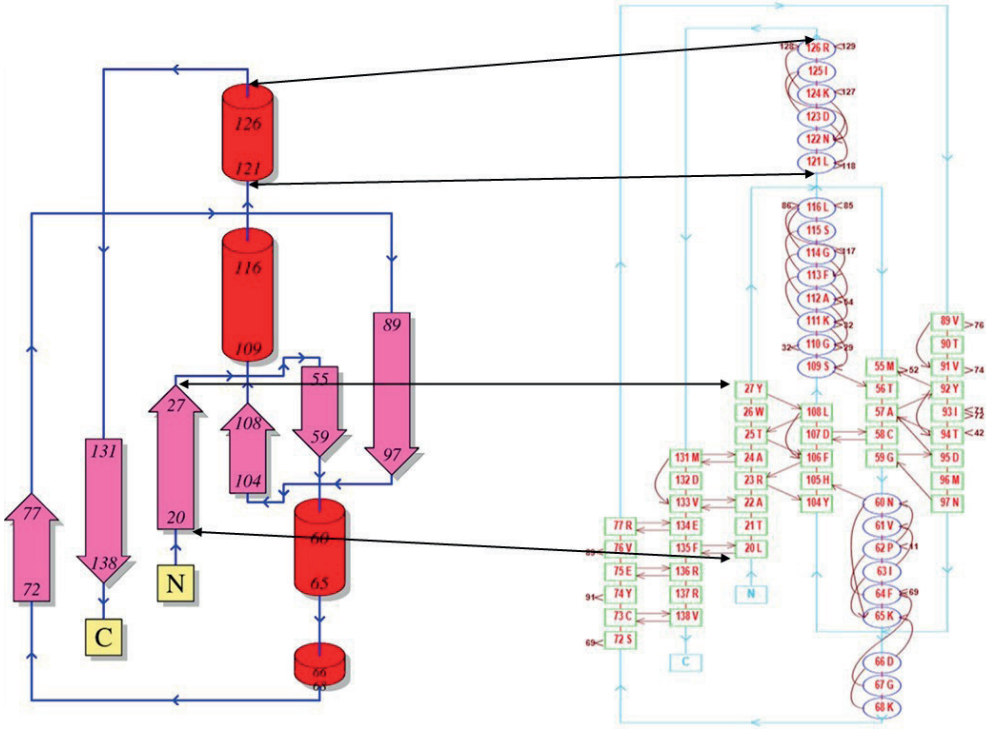


Figura 13.7. Diferentes modelos de la estructura secundaria de la EXPB1_MAIZE. a) Representación de flechas para las estructuras beta y cilindros para las estructura alfa-hélice; cada estructura contiene la posición de los aminoácidos. b) Modelo donde se presenta las estructuras con los aminoácidos correspondientes y su localización. Las flechas negras que unen a las dos figuras muestran la identidad de los dominios (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=2hcz>).

Las alfa hélices son estables con vueltas a la derecha (sentido del reloj) e inestables y poco probables a la izquierda, en cada vuelta completa del alfa hélice hay 3.6 aminoácidos (denominados residuos porque cada aminoácido de la cadena perdió un grupo OH del carboxilo y un H del grupo amino al formarse el enlace peptídico), se generan puentes de hidrógeno entre los aminoácidos n y n+4 lo que le da estabilidad a la estructura. En la figura 13.8a, se observa las secuencias y el orden de aminoácidos que están involucrados para la formación de las cuatro alfa-hélices presentes en la estructura de EXPB1_MAIZE.

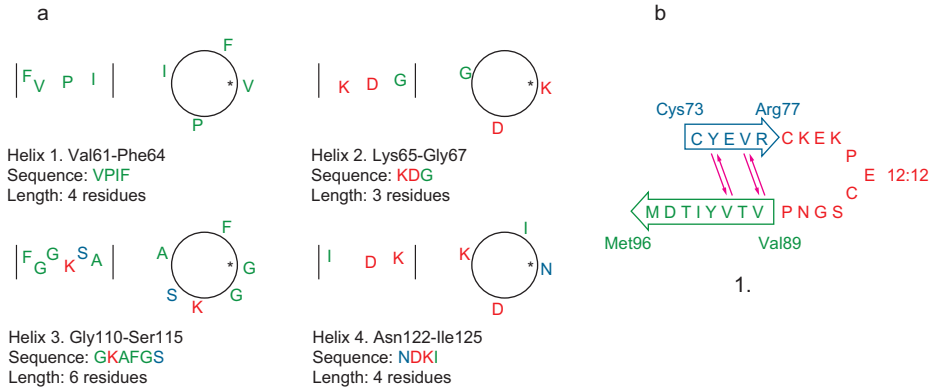


Figura 13.8. Modelos para las estructuras alfa-hélice y beta plegada. a) secuencia y orden de los aminoácidos que forman las alfa-hélices. b) secuencia y orden de los aminoácidos que forman las beta plegada antiparalelas (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=2hcz>)

En las hojas plegadas beta, los residuos de aminoácidos se acomodan en zigzag formando una especie de acordeón, las cadenas laterales de los aminoácidos quedan hacia arriba o hacia abajo del plano en zigzag y los puentes de hidrógeno que le dan estabilidad a la estructura se forman al interactuar diferentes zonas de ambas cadenas de aminoácidos, como se observa en la figura 13.8b. Por ejemplo, en la formación de una de las betas plegadas en antiparalelo de la EXPB1_MAIZE se da entre las posiciones 73-77 con la posición 89-96 (Fig. 13.8b).

Dos o más hojas plegadas beta pueden agruparse de forma paralela cuando el sentido de los aminoácidos en ambas cadenas apunta en una misma dirección o bien de forma antiparalela cuando las cadenas apuntan en direcciones opuestas. Existe mayor estabilidad en la estructura antiparalela, debido a que los puentes de hidrógeno se encuentran alineados y a menor distancia que en la forma paralela.

Las fuerzas que mantienen la estructura secundaria además de los enlaces peptídicos son principalmente la gran cantidad de puentes de hidrógeno que se forman entre los aminoácidos contiguos, lo que les da gran estabilidad a ambas estructuras.

En la estructura secundaria existe un elemento de conexión entre alfas hélices y/o laminas plegadas beta denominado giro beta, vuelta reversa o lazo

alzar, que no es tan al azar ya que se presenta como conexión cuando se observa el cambio a otra estructura secundaria o cambio de dirección en la propia cadena. En estos giros beta existe abundancia de Glicina, Asparagina, Prolina, Ácido aspártico y Serina, además se presentan puentes de hidrógeno para darle estabilidad.

Dominios y motivos

En 1973 Wetlaufer, definió dominios como unidades estables de estructura proteica que podían plegarse de forma autónoma, hoy en día un dominio se refiere a las zonas de la proteína que presenta mayor densidad de plegamientos y en general son zonas con actividades específicas que colaboran en equipo con la función de la proteína o presenta una estructura independiente.

Por ejemplo, las expansinas consisten de dos dominios que juntos forman la funcionalidad de la proteína. En el amino terminal se encuentra el dominio I que es rico en cisteínas y seis de estas son altamente conservadas formando tres puentes disulfuro (Fig.13.9a), este dominio tiene una alta similitud con el dominio EG45-like de las endoglucanasas, pero carece de una actividad catalítica neta. El plegamiento de este dominio, consiste de seis betas plegadas flanqueadas por lazos cortos y alfa-hélices. Hacia el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio II que funciona como de unión a celulosa; dominio CBD (por sus siglas en inglés). El plegamiento está conformado por ocho betas plegadas en antiparalelo, forma estructura de sándwich parecida (Fig. 13.9b) ambas figuras fueron tomadas de Prosite Expasy.

Los motivos dentro de las proteínas son secuencias de aminoácidos entre 2 a 20 aminoácidos que representan zonas conservadas que pueden tener o no alguna actividad. Estos motivos pueden estar presentes dentro de los dominios o en otras zonas de la proteína. Por ejemplo, en las expansinas se encuentra el motivo conservado HFD que está dentro del dominio I y es altamente conservados dentro de todas las expansinas; sin este motivo no se consideran expansinas. En la figura 13.5, se puede observar en la zona sombreada de gris el dominio I y en azul el dominio II, además, del motivo HFD en magenta.

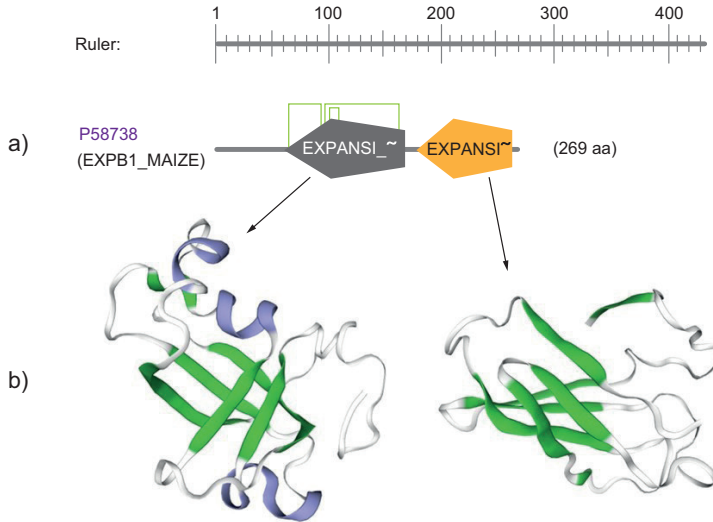


Figura 13.9. Arquitectura y estructura de dominios de la EXPB1_ MAIZE. a) arquitectura de los dominios; el dominio I se muestra en gris con tres puentes disulfuro, el dominio II en naranja. Además, se aprecia la longitud de cada uno mediante la regla milimétrica. b) representa la estructura de ambos dominios; en verde las beta-plagadas y en lila las alfa-hélices (imagen tomada de Prosite y SWISS-MODEL: <https://swissmodel.expasy.org/>).

Estructura terciaria

En la estructura terciaria todas las alfas hélices y todas las hojas beta plegadas formadas con la secuencia de aminoácidos, interactúan en el espacio entre ellas de diferentes formas al parecer buscando la menor energía potencial almacenada que le dé estabilidad a la estructura terciaria formada, algunos ejemplos se observan abajo.

La estructura de una proteína dicta la función para la cual fue sintetizada, en otras palabras, la estructura de una proteína está íntimamente relacionada con su función o actividad que desempeña dentro del organismo. A partir de la estructura terciaria las proteínas ya presentan actividad o la función para la que fue sintetizada, mientras que las estructuras primaria y secundaria no tienen actividad o funcionalidad ya que aún no están del todo formadas.

Además de los enlaces peptídicos y los puentes de hidrógeno, en la estructura terciaria intervienen otras fuerzas que le dan estabilidad a la estructura de

las proteínas, como los puentes disulfuro entre cisteínas, las fuerzas hidrofílicas e hidrofóbicas que se generan con la interacción de las cadenas laterales de aminoácidos cercanos debido al plegamiento de la cadena.

En la figura 13.10, se observa la estructura terciaria de la EXPB1_MAIZE, donde se muestran los dominios estructurales y funcionales de las expansinas.

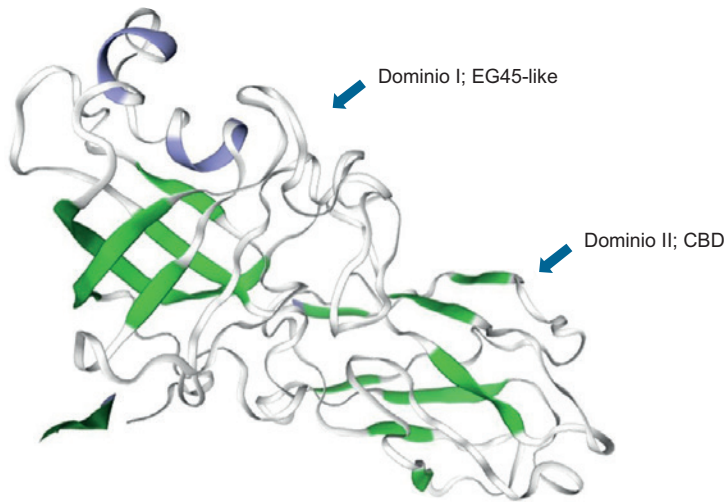


Figura 13.10. Estructura terciaria de la EXPB1_MAIZE. Donde se muestran ambos dominios representes en las expansinas (imagen tomada de SWISS-MODEL).

Estructura cuaternaria

Existen proteínas, por así decirlo, que no trabajan solas, es decir, para que puedan desarrollar la función para la cual fueron sintetizadas, deben trabajar en equipo desde dos hasta varias proteínas unidas, algunas siempre unidas y otras se unen cuando es necesario llevar a cabo su función. En caso de ser separadas no pueden realizar su función. Un ejemplo de estas proteínas es la catalasa formada por cuatro cadenas polipeptídicas. Además de todas las fuerzas antes mencionadas que les dan estabilidad a las proteínas, en la estructura cuaternaria intervienen las fuerzas de Van der Waals, que no son más que momentos dipolares.

Ejemplos funcionales de algunas proteínas

Enzimas

Las proteínas con actividad metabólica básicamente son enzimas que llevan a cabo las reacciones bioquímicas dentro de nuestras células con lo que se mantienen la homeostasis del organismo.

De esta manera las enzimas se clasifican en siete clases dependiendo de la actividad que realicen y en subclases que describen con mayor precisión dicha actividad.

La clasificación enzimática según la EC (Enzyme Classification, siglas en inglés), es de siete clases: EC 1, Oxidorreductasas; EC 2, Transferasas; EC 3, Hidrolasas; EC 4, Liasas; EC 5, Isomerasas; EC 6, Ligasas; EC 7, Translocasas (Enzyme Nomenclature - QM SBCS) Tabla 13.4.

Tabla 13.4 Clasificación de las enzimas según la EC.

Tipo de Enzimas	Función
EC1 Oxidorreductasas	Realizan reacciones de oxidorreducción
EC2 Transferasas	Transfieren grupos funcionales entre moléculas
EC 3 Hidrolasas	Rompen enlaces utilizando la molécula de agua para completar las moléculas resultantes
EC 4 Liasas	Rompen un enlace generando un dobles enlace
EC 5 Isomerasas	Genera isómeros
EC 6 Ligasas	Forman enlaces utilizando ATP
EC 7 Translocasas	Translocan sustancias a través de las membranas

Además, existe la subclasificación que detalla su modo de acción, por ejemplo, en la enzima piruvato deshidrogenasa (quinona) cuya clasificación es EC 1.2.5.1, el primer número indica la clase de enzima, en este caso 1 corresponde a una Oxidorreductasa. El segundo número que es el 2, indica que los donadores de electrones son el grupo aldehído o en el grupo oxo. El tercer número, en este caso el 5 indica que una quinona o un compuesto similar son el aceptor de electrones. El último 1 indica que se trata de Piruvato deshidrogenasa (quinona) (Fig. 13.10a).

Esta información se puede encontrar muy fácilmente en la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/oldstart.php>), además que proporciona la reacción de la enzima (Fig. 13.10b)

a) Information on EC 1.2.5.1 - pyruvate dehydrogenase (quinone)

1.2.5.1

EC Tree

- └ 1 Oxidoreductases
- └ 1.2 Acting on the aldehyde or oxo group of donors
- └ 1.2.5 With a quinone or similar compound as acceptor
- └ 1.2.5.1 pyruvate dehydrogenase (quinone)

b) Reaction Schemes [hide](#)

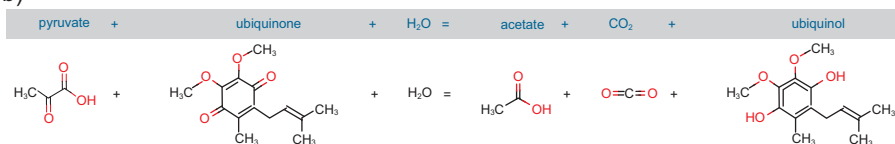


Figura 13.10. Identificación mediante EC de la piruvato-deshidrogenasa. a) clasificación enzimática EC 1.2.3.1, b) reacción que cataliza la 1.2.3.1.

Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana consideradas estructurales, tienen múltiples funciones, por ejemplo, proteínas transportadoras como las que constituyen los canales y bombas que permiten o no el paso de diferentes sustancias a través de la membrana dependiendo de las necesidades de la célula.

Un ejemplo es la Palmitoil-transferasa DHHC (Asp-His-His-Cys), enzima de organismos eucariotas, específicamente enzima integral de membrana que catalizan la palmitoilación de proteínas, que es importante en una variedad de procesos fisiológicos, incluida la señalización de la pequeña guanósina trifosfatasa (GTPasa) y la adhesión celular (Fig. 13. 11a).

Proteínas de defensa contra estrés abiótico

Las proteínas de choque térmico o HSP (Heat shock proteins) son proteínas ubicuas que se encuentran en las células vegetales; descritas originalmente con relación al choque térmico. Sin embargo, se ha visto que estas proteínas son

inducidas por una amplia variedad de estrés como: calor, temperaturas altas, frío, luz ultravioleta, remodelación de tejidos entre otros. También actúan en la estabilización de proteínas y ayudan al replegamiento de proteínas en condiciones de estrés. En la figura 13.11b, se observa la estructura de la proteína HSP *Pinus tabuliformis*.

Las proteínas LEA (Late embryogenesis abundant) son grandes grupos de proteínas hidrofílicas que contribuyen en numerosos procesos de desarrollo y se acumulan en relación con la salinidad, la sequía, la congelación y los tratamientos con fitohormonas y ácido abscísico. Estas proteínas se dividen en 8 grupos de los cuales se conoce que el grupo II o dehidrinas (DHN) preservan las macromoléculas contra las lesiones causadas por la sequía, la salinidad y la congelación (Fig. 13.11c)

Proteínas de defensa contra estrés biótico y oxidativo

La heveína es un péptido de 43 aminoácidos, con actividad sobre la quitina. Esta proteína fue identificada en el látex del árbol del caucho, *Hevea brasiliensis*, siendo uno de sus componentes proteicos más abundantes. El mecanismo de acción de este péptido se basa en la inhibición del crecimiento de las hifas de los hongos al unirse a las quitinas de estos mismos, de igual manera, pueden causar filtración del material encontrado en el citoplasma al entrar en contacto con las hifas (Fig. 13.11d).

Las catalasas son proteínas con actividad enzimática que pertenecen a las oxidorreductasas y catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno molecular (O_2) y H_2O . Las catalasas protegen a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno (ERO) y daña a varias macromoléculas tales como el ADN, proteínas, lípidos. El incremento de ERO en las plantas es cuando están bajo cierto tipo de estrés, en la figura 13.11e, se muestra la estructura de la catalasa de *Arabidopsis thaliana*.

Proteínas involucradas en la germinación de semillas

Las lipasas actúan principalmente en semillas oleaginosas, hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Algunas de estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones

de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas. Específicamente la Fosfolipasa A1 específica de Sn-1 que cataliza el paso inicial de la biosíntesis de oxilipinas y jasmonato (JA) (Fig. 13.11f).

Proteína involucrada en la modificación de la pared celular

Las Expansinas son proteínas que participan en la expansión de la pared celular permitiendo que las células vegetales crezcan, participan en la maduración de frutos, en la elongación de la raíz y en el alargamiento celular.

Proteínas involucradas en la fotosíntesis

Las carboxilasas en plantas se relacionan con la fotosíntesis C4 y CAM, como la fosfoenolpiruvato-carboxilasa (PEPC), enzima citosólica que produce oxalacetato a partir de una reacción, es la primera enzima que fija el carbono en las plantas C4 (Fig.13.11g).

Enzimas generadoras de ATP

Enzimas que catalizan reacciones en las membranas como la cadena de transporte de electrones, realizando reacciones de óxido-reducción para generar un gradiente quimio-osmótico y de esta forma generar el ATP que requiere la célula.

La ATP sintasa es una de las maravillas del mundo molecular. La ATP sintasa es una enzima, un motor molecular, una bomba de iones y otro motor molecular, todo envuelto en una increíble máquina a nanoescala. Desempeña un papel indispensable en nuestras células, construyendo la mayor parte del ATP que alimenta nuestros procesos celulares. El mecanismo por el cual realiza esta tarea es una verdadera sorpresa. La síntesis de ATP se compone de dos motores rotativos, cada uno alimentado por un combustible diferente. El motor en la parte superior, denominado F₀, un motor eléctrico, está incrustado en una membrana y funciona con el flujo de iones de hidrógeno a través de la membrana. A medida que los protones fluyen a través del motor, hacen girar un rotor circular. Este rotor está conectado al segundo motor, denominado F₁. El motor F₁ es un motor químico, alimentado por ATP. Los dos motores están conectados entre sí por un estator, de modo que cuando F₀ gira, F₁ también gira (Fig. 13.11 h).

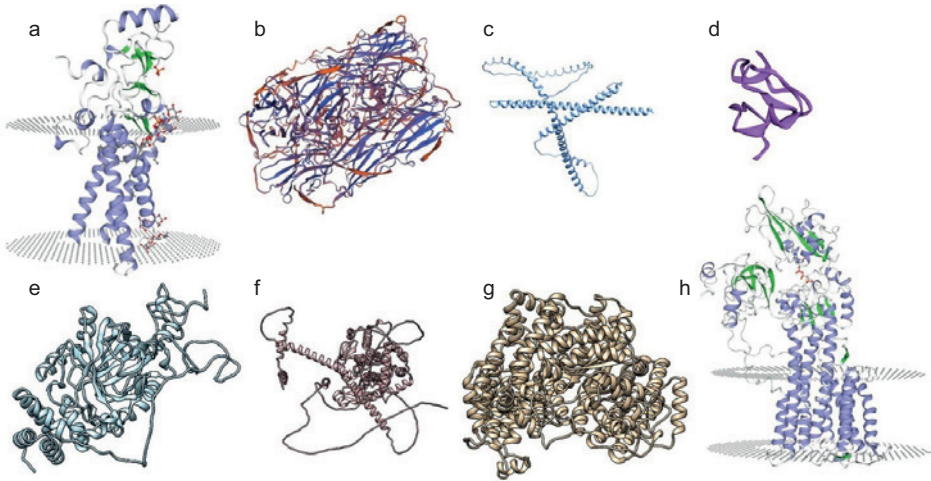


Figura 13.11. Estructuras de diferentes proteínas de plantas. a) Palmitoil transferasa (PDB:6bms.1), b) proteína HSP de *Pinus tabulaeformis* (PDB: 1gme), c) proteína LEA de *Oryza sativa* (Alpha fold: AF-A3AHG5-F1), d) Heveína, *Hevea brasiliensis* (PDB. 1hev), e) Catalasa CAT1 de *Arabidopsis thaliana* (Alpha fold: AF-Q96528-F1), f) Fosfolipasa A1 de *Arabidopsis thaliana* (Alpha fold: AF-F4HXL0-F1), g) Fosfoenolpiruvato carboxilasa de *Arabidopsis thaliana* (Alpha fold: AF-Q5GM68-F1), h) ATPase 10, plasma membrane-type de *Arabidopsis thaliana* (Q43128).

Maduración de proteínas después de la traducción

Las proteínas tienen un periodo de vida que inicia con su síntesis en los ribosomas y hasta su degradación cuando ya no son requeridas o están dañadas, durante este intervalo de vida, las proteínas pueden ser modificadas de diferentes formas para regular su función, su localización, su señalamiento de estabilidad o degradación al final de su periodo de vida.

Al ser sintetizadas en los ribosomas, las proteínas no adquieren su funcionalidad al instante, deben adquirir la estructura específica para realizar su función, es decir deben madurar y ser conducidas al lugar en el cual ejercerán su función y al llegar son activadas, estas modificaciones que se realizan en las proteínas durante y/o después de su traducción se les denomina modificaciones cotraduccionales o postraduccionales de las

proteínas. Las modificaciones que han sido las más estudiadas implican: correcto plegamiento mediante la formación de enlaces disulfuro en las posiciones precisas, fosforilación, hidroxilación, acetilación, glucosilación, adición de lípidos, ubiquitinación y escisión o ruptura proteolítica en posiciones específicas, dichas adiciones o modificaciones pueden ser permanentes o reversibles como una forma de regular su función o actividad.

Las modificaciones co o postraduccionales se pueden observar en las cadenas laterales de los aminoácidos, en los grupos amino terminal o carboxilo terminal de la proteína, con lo que se modifican los grupos funcionales, pudiendo ser como una forma de señalización, bien para modificar las propiedades de los aminoácidos, por ejemplo, haciéndolos más hidrofílicos o más hidrofóbicos y al modificar los grupos funcionales existentes o bien introducir nuevos grupos funcionales, la estructura de la proteína puede variar o modificar su estructura. Las modificaciones co o postraduccionales más estudiadas son las siguientes:

Puentes Disulfuro, denominados también como enlaces disulfuro, se generan entre dos aminoácidos de cisteína, el azufre del grupo Tiol (-SH) de ambos aminoácidos de cisteína se unen covalente (S-S) formando a la Cistina. Los puentes disulfuro tienen la función de generar la estructura adecuada en una misma cadena polipeptídica o bien mantener unidas las dos cadenas polipeptídicas para mantener la estructura y funcionalidad de la o las proteínas.

Fosforilación, es la unión covalente de un grupo fosfato ($-\text{PO}_4$) a la cadena lateral de un aminoácido mediante la acción de una enzima quinasa, tiene la función de modificar la estructura de una proteína para activarla, desactivarla o señalizarla, pudiendo ser la señal para el ensamblaje con otras proteínas. Se fosforilan principalmente los aminoácidos que tienen en su cadena lateral grupos hidroxilo (-OH), grupos amino (NH_3^-) o grupos carboxilo (COO^-).

Glicosilación o glucosilación, se refiere a la unión covalente de un glúcido a una proteína formando una glucoproteína, pudiendo ser desde un monosacárido hasta un oligosacárido, tiene la función de hacer más hidrosoluble a una proteína. Básicamente la glicosilación se realiza en el lumen del retículo endoplásmico rugoso a medida que la proteína va siendo sintetizada, para ser transportada a algún organelo específico, para formar parte de los lisosomas o bien para ser secretada por las vacuolas del retículo endoplásmico.

Hidroxilación, se refiere a la unión de grupos hidroxilo (-OH) a las proteínas por la acción de las enzimas denominadas hidroxilasas, con lo cual zonas de las proteínas aumentan su hidrofiliidad y por ende se pueden generar cambios ligeros en la estructura de la proteína.

Acetilación, es la unión de grupos acetilo ($\text{CH}_3\text{CO}-$) a la proteína por la acción de acetiltransferasas, principalmente a los grupos aminos de las cadenas laterales de la Arginina y Lisina ambos aminoácidos con carga positiva, que al ser acetilados se neutralizan sus cargas positivas y con ello la estructura de la proteína se ve modificada.

Adición de lípidos, se unen lípidos denominados también grupos acilo a las proteínas para generar lipoproteínas, entre otros el ácido palmítico (palmitilo) o el ácido mirístico (miristilo) con ello se les dota a las proteínas de hidrofobicidad, se observa sobre todo en proteínas que conformarán membranas.

Ubiquitinación, la ubiquitina es una proteína pequeña de 76 aminoácidos con peso molecular de 8.5 kDa y cuyo nombre indica que es ubicua, es decir, se encuentra ampliamente localizada en todas partes dentro del organismo, se une a las proteínas de diferentes formas desde la monoubiquitinación hasta la poliubiquitinación, ésta última puede ser lineal o ramificada como forma de señalar a aquellas proteínas que han de ser recicladas por las chaperonas o degradadas en proteosomas. Se han encontrado en eventos celulares como la endocitosis, apoptosis, diferenciación y desarrollo celular, morfogénesis, entre otros eventos celulares, habiendo mucho por esclarecer su participación en dichos eventos.

Relación entre estructura y función (actividad biológica). Estructura nativa y desnaturalización

Se denomina estructura nativa a la conformación estructural de las proteínas en la cual la proteína desempeña su función o actividad para la cual fue sintetizada. Cuando una proteína pierde su estructura funcional se encuentra desnaturalizada, la desnaturalización puede ser provocada por cambios de temperatura, cambios de pH, cambios de la fuerza iónica del disolvente en el cual se encuentra disuelta.

La desnaturalización en algunos casos puede ser reversible, si se elimina la causa que la ocasiona, si la desnaturalización es por alta concentración de sales se puede dializar la proteína para eliminar la alta concentración de sales y la proteína en un alto porcentaje puede regresar a su estado nativo, pero si la desnaturalización fue provocada por altas temperaturas o pH muy ácidos o básicos la proteína no regresa a su estado nativo. Por esta razón al purificar las proteínas se debe tener especial cuidado en no desnaturalizar a la proteína de forma irreversible sobre todo si se trata de una enzima cuya actividad sirve de seguimiento durante su purificación. En general las proteínas desnaturalizadas se precipitan y no pueden ser nuevamente solubilizadas.

Proteómica

Comencemos por entender que el vocablo “proteoma” se refiere al perfil de proteínas expresadas por el genoma de un organismo en estudio bajo condiciones específicas, en un momento dado. Es de entender que el perfil proteico de un organismo cambie de acuerdo con las condiciones bajo las cuales se desarrolla, desde condiciones del medio ambiente que le rodea, de la edad fisiológica en la que se encuentre, si se encuentra o no en estado de estrés, si se encuentra en estado de salud o enfermedad, si se encuentra bajo la presencia o ausencia de medicamentos o tóxicos, entre otros.

Entonces la “proteómica” es el estudio comparativo que permite observar los cambios generados en el proteoma, bajo condiciones específicas que permitan dilucidar los cambios o eventos fisiológicos bajo circunstancias específicas dadas, lo cual permite comprender la forma en la que el organismo responde, por ejemplo, bajo estrés comparado con el mismo organismo no estresado. En otras palabras, conocer que proteínas se expresan por ejemplo en estado sano y compararlas con las proteínas que se expresan en estado de enfermedad, las proteínas diferentes serían las que marcan la diferencia y por lo tanto hay que estudiar la función que desempeñan para comprender el papel que juegan en el estado de enfermedad.

Una gran parte de la investigación en ciencias de la vida se encuentra enfocada al entendimiento de la compleja relación entre el genotipo y el fenotipo. Especialmente la investigación se dirige a preguntas fundamentales del cómo, cuándo y dónde la información codificada en el genoma de un organismo es

expresada y modulada por factores externos (ejemplo, medioambiente) o factores internos (ejemplo, genómica) para generar un fenotipo específico.

Bioinformática de proteínas

El propósito de este tema es dar a conocer y guiar al estudiante o lector con las herramientas bioinformáticas disponibles gratuitamente en internet y que son utilizadas para caracterizar computacionalmente una proteína completa a partir de una secuencia de ADN o de su gen correspondiente. Esta guía implicará buscar en el GenBank la secuencia de interés, el análisis con diferentes herramientas de ExPasy; traducción virtual (proteína), búsqueda de dominios, proteínas homólogas, propiedades fisicoquímicas y un modelo 3D en la base de datos de SWISS-MODEL

La manera o las diferentes herramientas en las bases de datos utilizadas para realizar estos análisis bioinformáticos, depende del estudiante, investigador o persona que lo realiza ya que existe diferentes bases de datos que llevan al mismo resultado. En la figura 13.12, el diagrama de flujo muestra una alternativa de las rutas bioinformáticas que utilizaremos para el análisis de la proteína en estudio. Se inicia con una secuencia de nucleótidos conocida (cuadro en blanco), las figuras en color azul indican que se usó la misma base de datos con diferentes herramientas para obtener los resultados, y en amarillo para el modelado en SWISS-MODEL

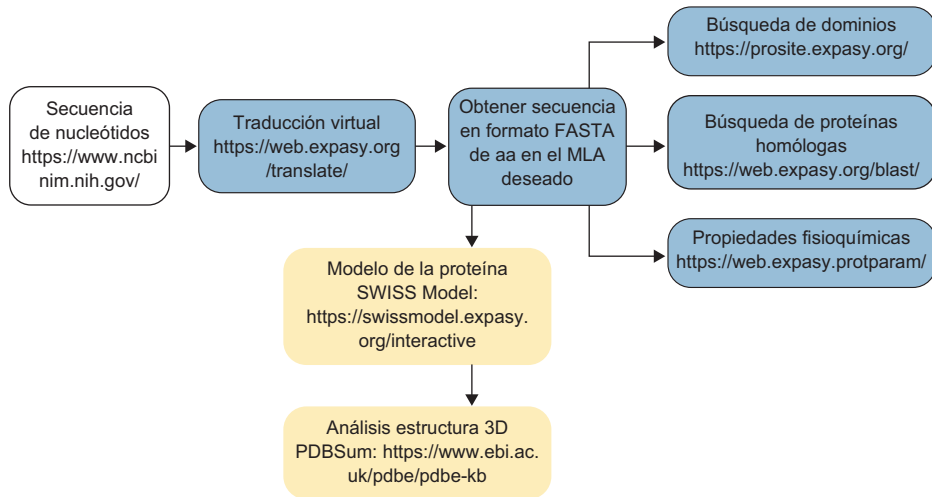


Figura 13.12. Diagrama de flujo de una ruta para el análisis bioinformático de proteínas. La figura en color blanco indica el inicio con la secuencia de nucleótidos, las figuras en azul indican el uso de las herramientas en ExPASy, en amarillo las bases de datos para el modelado.

Análisis bioinformático

Búsqueda del gen de interés

Para este ejercicio, se trabajará con una secuencia de un ARN mensajero que codifica para una alfa expansina de jitomate: *Lycopersicon esculentum* expansin; LeEXP1 (U82123.1). Existen diferentes maneras de obtener la secuencia de nucleótidos en la base de datos de NCBI tal como: nombre del gen, número de acceso, nombre de la proteína y nombre científico del organismo. Hay que mencionar que para obtener cualquier información dentro de NCBI se tiene que escribir en el idioma inglés. Para este caso, utilizaremos la frase “*Lycopersicon esculentum* expansin”.

Paso 1.- Búsqueda del gen en estudio. Ingresar a la base de datos de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y en el cuadro de búsqueda escribir *Lycopersicon esculentum* expansin (Fig. 13.13, círculo rojo) y dejar la opción All Databases posteriormente seleccionar Search.

Al seleccionar All Databases, se obtiene toda la información relacionada con el gen en estudio como: artículos, libros, genes, proteínas, genomas, nucleótidos (Fig.13.14)

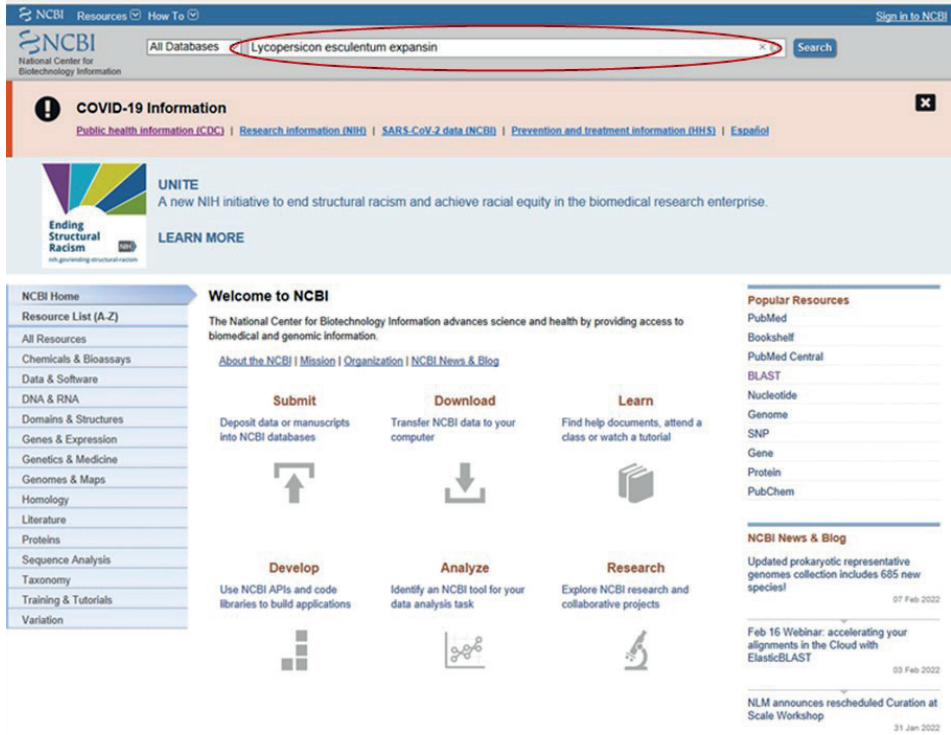


Figura 13.13. Página Principal de NCBI. En el círculo rojo, la frase del gen a buscar.

Paso 2.- Selección del gen. Seleccionar Nucleotide en la sección de genomes (figura 13.14) Nos interesa las secuencias de nucleótidos que pueden ser desde RNAm parciales o completos hasta fragmentos de DNA y este apartado se pueden encontrar 74 secuencias de expansinas relacionadas con jitomate.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Search NCBI: Lycopersicon esculentum expansin

COVID-19 Information
Public health information (CDC) | Research information (NIH) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (HHS) | Español

Did you mean [Lycopersicon esculentum expansin](#)?

Results found in 13 databases

Literature	Genes	Proteins
Bookshelf: 0	Gene: 40	Conserved Domains: 0
MeSH: 3	GEO DataSets: 0	Identical Protein Groups: 15
NLM Catalog: 10	GEO Profiles: 16	Protein: 85
PubMed: 45	HomoloGene: 0	Protein Family Models: 0
PubMed Central: 818	PopSet: 0	Structure: 0

Genomes	Clinical	PubChem
Assembly: 8	ClinicalTrials.gov: 0	BioAssays: 0
BioCollections: 0	ClinVar: 0	Compounds: 0
BioProject: 0	dbGaP: 0	Pathways: 0
BioSample: 16,046	dbSNP: 0	Substances: 0
Genome: 1	dbVar: 0	
Nucleotide: 74	GTR: 0	
SRA: 16,928	MedGen: 0	
Taxonomy: 0	OMIM: 0	

Figura 13.14. Resultados de la búsqueda en all database. La flecha rojo indica la selección de nucleótidos.

En la figura 13.15, se muestra el resultado de esta selección y se desglosa las 74 secuencias en nucleótidos.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search results for the query "Lycopersicon esculentum expansin". The search results are displayed in a list format, with four entries shown. Entry 4 is selected, and its details are visible. The details for entry 4 are:

- [Lycopersicon esculentum expansin \(LeEXP1\) mRNA, complete cds](#)
- 4. 1,070 bp linear mRNA
- Accession: U82123.1 GI: 2062420
- [PubMed](#) [Taxonomy](#)
- [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

The interface also includes a search bar at the top, a "COVID-19 Information" banner, and various filters and options on the right side.

Figura 13.15. Resultados de la selección de nucleótidos. Se selecciona la opción 4 que es del gen de interés.

Paso 3. Selección de la secuencia deseada. Como nos interesa la LeEXP1, seleccionamos la secuencia 4 (Fig. 13.15). En la figura 13.16, se presenta la información completa del gen LeEXPA1 y se muestra tanto la secuencia del RNAm en nucleótidos como de la proteína en aminoácidos. Existen dos maneras de copiar la secuencia; 1) copiando directamente la secuencia de nucleótidos y pegarla en un documento Word o 2) ir a la pestaña de FASTA (círculo rojo) y se obtiene esta secuencia en este formato. Como se dará cuenta en la figura 13.15, también aparece el número de acceso del gen que es U82123, y también la secuencia de su proteína con número de acceso: AAC63088.1. Con este número de acceso el lector puede ingresar directamente a la información del gen

o de la proteína en la base de datos de NCBI. Como ya se tiene la secuencia de aminoácidos, se puede trabajar directamente para realizar el modelo 3D de la proteína, pero en este ejercicio se hará por otra vía.

The image shows a screenshot of the NCBI GenBank database entry for *Lycopersicon esculentum* expansin (LeEXP1) mRNA, complete cds. The entry is identified by accession number U82123.1. The page is divided into several sections: 'FASTA' (circled in red), 'Graphics', 'LOCUS', 'DEFINITION', 'ACCESSION', 'VERSION', 'KEYWORDS', 'SOURCE', 'ORGANISM', 'REFERENCE', 'AUTHORS', 'TITLE', 'JOURNAL', 'PUBMED', 'FEATURES', 'ORIGIN', and a right-hand sidebar with various analysis and information tools. The 'FEATURES' section lists 'source' and 'gene' with their respective coordinates and descriptions. The 'ORIGIN' section displays the full nucleotide sequence in a standard format with line numbers and a double slash at the end. The right sidebar includes options to 'Change region shown', 'Customize view', 'Analyze this sequence' (with sub-options like Run BLAST, Pick Primers, Highlight Sequence Features, Find in this Sequence), 'Articles about the EXP1 gene', 'Reference sequence information', 'More about the gene EXP1', 'Related information', and 'Recent activity'.

Figura 13.16. Información completa del gen LeEXP1 en la base de datos de NCBI.

Paso 5.- Traducción virtual. Se realizará con la herramienta Translate de Expsy (<https://web.expsy.org/translate/>). Esta herramienta es muy sencilla de utilizar

ya que solo se pega la secuencia y se selecciona el formato de salida y el código genético deseado. Para este caso, se insertó la secuencia de nucleótidos de LeEXP1, se seleccionó el formato de salida compacto y el código genético estándar. El resultado es la traducción en seis marcos de lectura abierta (Fig.13.17a). El programa por default marca todas las metioninas (M) en color rojo indicando que es el inicio de la proteína u otro aminoácido después del gap indicando un marco de lectura. El lector debe de seleccionar el marco de lectura correcto que en este caso es el primer marco. Si selecciona la primera metionina del primer marco (flecha amarilla en el primer marco, figura 13.17a) y al dar clic se despliega la secuencia en aminoácidos en formato FASTA y tres herramientas como: BLAST, ScanProsit y Squence analysis tools (Fig.13.17b).



Figura 13.17. Traducción virtual de la secuencia de nucleótidos de LeEXP1 (Expassy-Translate; <https://web.expasy.org/translate/>). a) se presenta los seis marcos de lectura abierta (MLA), en el primero se presenta con una flecha la M que es aminoácido de inicio de la proteína. b) la secuencia en formato fasta y las diferentes herramientas como: BLAST, ScanProsite.

Paso 6.- Búsqueda de proteínas homólogas (<https://web.expasy.org/blast/>). En la figura 13.17b, se observa en la parte superior derecha un recuadro en verde con la palabra BLAST, al posicionar en éste y dar clic se hará una búsqueda de proteínas homólogas y un gráfico con la arquitectura de los dominios (Fig.13.18).

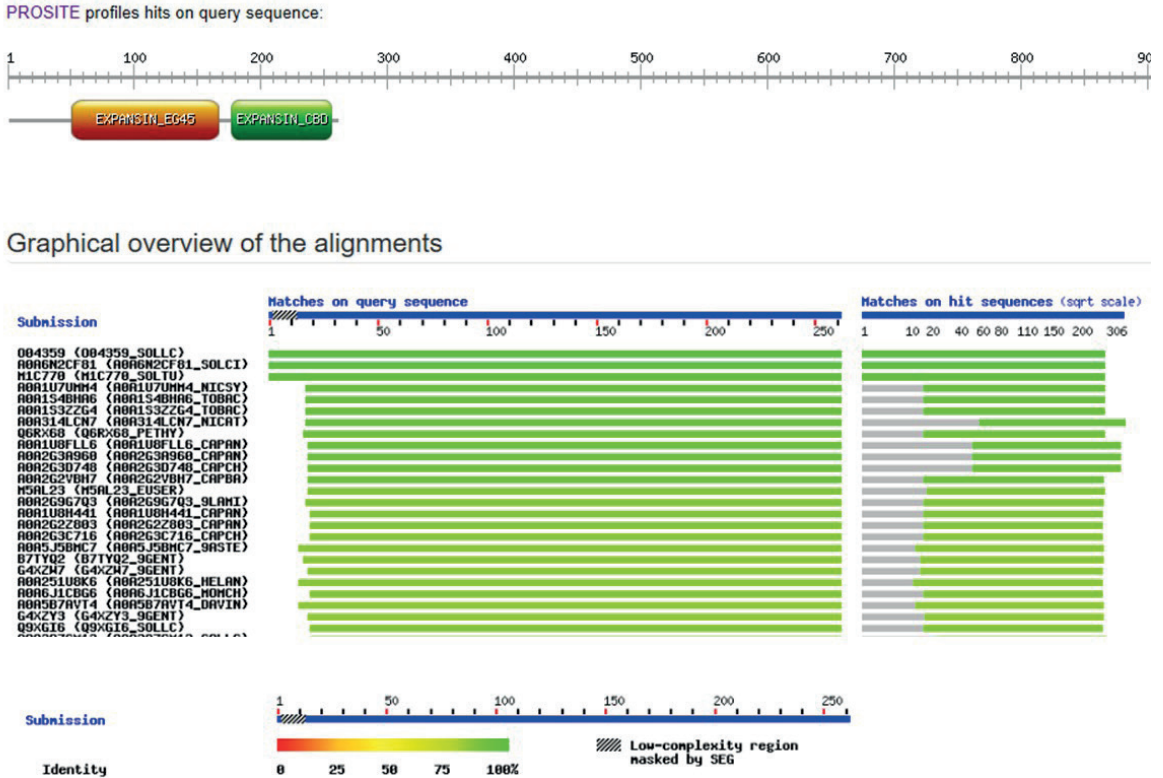


Figura 13.18. Arquitectura de dominios y secuencias homólogas de LeEXP1. de dominios b) secuencias homólogas a LeEXP1.

Paso 7.- Búsqueda de dominios (<https://prosite.expasy.org/>). Con los resultados de la figura 13.17b, en la pestaña de ScanProsite, se realiza la búsqueda de dominios que contiene la proteína. Los resultados es una arquitectura gráfica

de los dominios, así como la secuencia de aminoácidos que los conforman (Fig.13.19). En la secuencia de aminoácido de la figura 13.19a se observa en amarillo el dominio I, y en 13.19b la arquitectura de dominios.

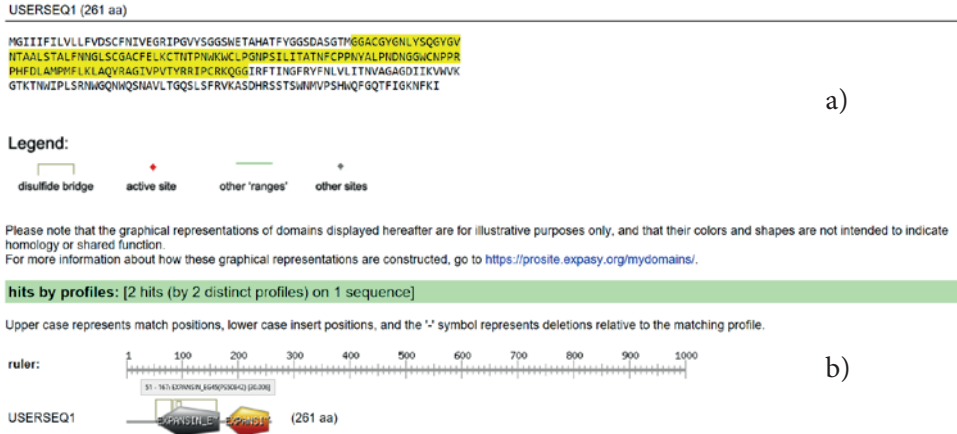


Figura 13.19. Secuencia de dominios y su arquitectura. a) secuencia en aminoácidos de Le-xEXP1, en amarillo el dominio I, b) Arquitectura de dominios.

Paso 8.- Propiedades fisicoquímicas de la proteína (<https://web.expasy.org/protparam/>). Este tipo de análisis es de gran importancia para las características de las proteínas, entre estos están el peso molecular, el punto isoelectrico, GRAVY, índice alifático En la misma herramienta de Translate (Fig.13.17b) se puede observar la pestaña Sequence analysis tools, esta contiene las herramientas ProtParam, ProtScale, Compute pI/Mw, PeptideMass, y PeptideCutter. En la tabla 13.5, se muestra los valores obtenidos en ProtParam

Tabla 13.5 Parámetros fisicoquímicos de la proteína LeEXPA1

Numero de aminoácidos	261
Peso Molecular	28686.94 Daltons
pI teórico	9.46
Total, de aa negativos	(Asp + Glu): 9
Total, de aa positivos	(Arg + Lys): 21
Formula	$C_{1304}H_{1966}N_{352}O_{354}S_{14}$
Índice de inestabilidad	26.23
Índice alifático	77.36
Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY)	-0.005

Paso 9.- Modelado de la proteína. Ingresar a la base de dato del SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) y pegar la secuencia de aminoácidos en el recuadro donde dice: “paste your target sequence” (Fig.13.20). Se tienen dos opciones para el modelado: 1) que se realice a partir de moldes o templates existentes en la base de datos de PDB o 2) construir el modelo. Para este caso, se tomó la primera opción y el resultado es con 41 moldes para la proteína que estamos analizando (Fig.13.21). Se seleccionó la primera opción que es con el molde 1n10.1 que es el número en el PDB y es de la proteína alergeno del polen Phl p1. Como resultado, se observa la estructura 3D, así como la secuencia en aa y las zonas que forman las beta plegadas y alfa-hélices.

Esto es un ejemplo para la expansina, pero el lector lo puede hacer para la proteína de interés.



Figura 13.20. Página principal de SWISS-MODEL para el análisis del modelo.

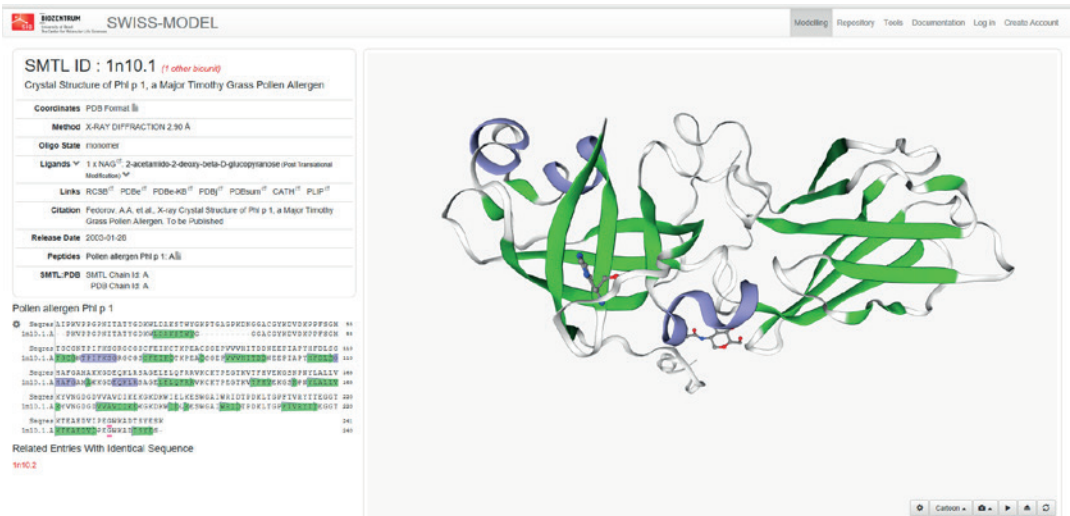


Figura 13.21. Modelado 3d de la proteína LeEXPA1 en SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Protocolos

Protocolo de extracción de proteínas de Leguminosas

Las proteínas presentes en las semillas pueden ser divididas en dos grandes grupos, dependiendo de la función biológica de la misma: a) proteínas con actividad biológica como las enzimas y b) proteínas de reserva. Estas últimas llegan a conformar más del 80 % de la proteína total de la semilla.

La metodología que se muestra a continuación es para extraer la proteína total de las semillas o granos. Se recomienda trabajar muestras de leguminosas, tales como frijol, soya, garbanzo, lenteja, chícharo, etc.,

Buffer de extracción

Tris-HCl 0.0625 M a pH 6.8
 SDS 0.1%

Procedimiento

1. Moler algunas semillas en mortero o molino eléctrico hasta formar una harina fina.
2. Pesar 150 mg de harina y transferir a un tubo para microcentrífuga.
3. Agregar 1 ml de buffer de extracción.
4. Homogenizar con vortex. Agitar con vortex cada 5 min durante media hora y dejar en hielo.
5. Centrifugar por 10 min a 10,000 rpm
6. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.
7. Centrifugar nuevamente el sobrenadante por 10 min a 10,000 rpm
8. Recuperar el sobrenadante en tubo limpio.

Protocolo de Cuantificación de la proteína.

La absorbancia a 280 nm, lee la absorbancia de los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano presentes en las proteínas. Obviamente las proteínas que tengan mayor cantidad de los aminoácidos mencionados tendrán mayor absorbancia que las proteínas que contienen menor cantidad de dichos aminoácidos.

Por la ley de Beer y Lambert, se tiene: $A = KCl$

Donde, A= absorbancia

C= concentración

K= coeficiente de extinción

l= longitud en centímetros de la celda utilizada, las celdas que se utilizan tienen un tamaño estándar de 1 cm

Procedimiento

Medir absorbancia a 280 nm de las muestras, calcular su concentración con un coeficiente de extinción de 1.15.

Cuantificación de proteínas por método DC-Protein assay (Bio-Rad)

Leer el manual del kit, resolver dudas con la profesora, elaborar la curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA) y cuantificar la concentración de proteína de sus muestras.

Comparar las dos metodologías para cuantificar proteína, describir las ventajas y desventajas de ambos métodos y sacar sus propias conclusiones.

Protocolo para Electroforesis SDS PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, por sus siglas en inglés)

Soluciones a preparar

Solución de acrilamida /bis-acrilamida 30% (29.2% / 0.8%) Tóxico usar guantes y tapaboca, no inhalar.

Tris-HCl 1M, pH 8.8, 100 ml

Tris-HCl 1M, pH 6.8, 100 ml

SDS 10 %, 10 ml

Persulfato de amonio 10% (prepararlo en el momento de utilizarlo), 1 ml

Solución de agarosa al 1%, 100 ml, calentar para solubilizar

Azul de bromofenol al 1 %, 10 ml

Buffer para muestra

0.5 M Tris HCl a pH de 6.8	1 ml
----------------------------	------

Glicerol	0.8 ml
----------	--------

SDS al 10 %	1.6 ml
-------------	--------

β -mercaptoetanol	0.4 ml
-------------------------	--------

Azul de bromofenol al 1 %	0.4 ml
---------------------------	--------

Mezclar todo y aforar a 8 ml con agua desionizada

Buffer de corrida 5X

Tris-HCl	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
Aforar a 1 L	

Solución de teñido

40 % de Metanol
10 % de Ácido acético
0.1 % Azul de Coomassie R-250
50 % de Agua
Preparar 250 ml

Solución de desteñido

40 % de Metanol
10 % de Ácido acético
50 % de Agua
Preparar 1 L

Preparación del gel:

1. Limpiar las superficies del vidrio con alcohol y montar la cámara de electroforesis.
2. Preparar el gel separador de poliacrilamida al 12 %

Tris pH 8.8	1.88 ml
Poliacrilamida	1.67 ml
SDS al 10 %	0.025 ml
Agua desionizada	1.39 ml
Mezclar perfectamente y desgasificar	
Persulfato de amonio al 10 %	50 μ l
TEMED	5 μ l

- Mezclar perfectamente sin ingresar burbujas
3. Vaciar el gel separador en la cámara de electroforesis dejando 2 cm antes del borde.
 4. Cubrir la superficie con 1 ml de alcohol y retirarlo cuando polimerice el gel.
 5. Preparar el gel concentrador.

Tris pH 6.8	312.5 μ l
Poliacrilamida	312.5 μ l
SDS al 10 %	25 μ l
Agua desionizada	1.84 ml
Mezclar perfectamente y desgasificar	
Persulfato de Amonio al 10 %	7.5 μ l
TEMED	2 μ l
Mezclar perfectamente sin ingresar burbujas	

6. Vaciar el gel en la cámara sobre el gel separador y colocar el peine. Esperar a que polimerice.

Preparación de las muestras y del estándar de peso molecular.

7. Tomar 20 μ l de su muestra y mezclarlos con 20 μ l de buffer de muestra en un tubo eppendorf, agitar con vortex.
8. Preparar el estándar de peso molecular como se indica en las instrucciones del proveedor.
9. Incubar las muestras bien tapadas y en su caso el estándar por 3 min en agua hirviendo, sacar y dejar enfriar.

Preparación de la cámara de electroforesis para la corrida:

10. Agregar el buffer de corrida en la cámara.
11. Cargar el gel con las muestras y el estándar de peso molecular.
12. Correr el gel a 20 mili Amperes hasta que el frente entre al gel separador.
13. Correr el gel a 40 mili Amperes en el gel separador y dejar correr hasta 0.5 mm antes de llegar al final.
14. Apagar y desconectar la fuente de poder. Desmontar el gel.
15. Teñir el gel durante 2 h, lavarlo con agua corriente.

16. Desteñir hasta que las bandas sean visibles.

A reportar:

1. Número de bandas y abundancia relativa de cada una de ellas.
2. Similitudes y diferencias entre los patrones electroforéticos de sus proteínas y de las proteínas de otros equipos.
3. Peso molecular calculado de cada una de las 5 principales bandas de cada muestra. Graficar en Excel el log 10 del peso molecular de los estándares en el eje de las "Y" y el Rf en el eje de las "X", obtener la ecuación de la curva y calcular los pesos moleculares de las 5 principales bandas de sus dos muestras.

PM de cada proteína del estándar

Eje Y $\log_{10}(\text{PM})$

Eje X Rf de esa proteína estándar

94,000 $\log_{10}(94,000) = 4.973$

El siguiente estándar

36,000 $\log_{10}(36,000) = 4.55$

Se deben ingresar todos los estándares de peso molecular del estándar utilizado en el gel.

Con esto elabora una gráfica como esta, en el eje de las X pones el Rf

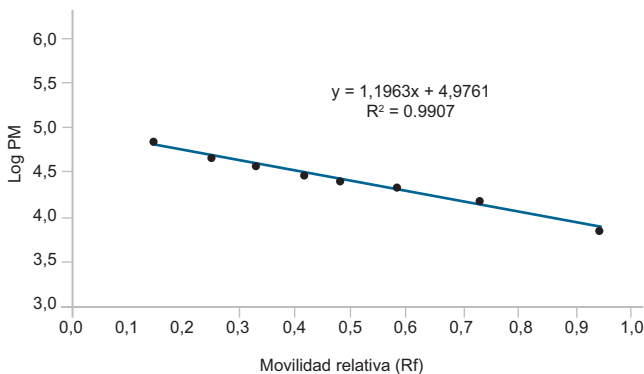


Figura 13.22. Curva de calibración para la determinación de pesos moleculares.

Si lo haces en Excel, puedes obtener la ecuación de la recta y la R cuadrada mientras más cercana a 1 significa que hay menos error.

$Y = mX + b$ en donde Y es el Rf de las bandas que se quiere calcular el peso molecular y la X el Rf obtenido para la banda que se quiere conocer su peso molecular.

Como ya conoces el valor de “m” que es la pendiente y conoces el valor de “b” que es la ordenada al origen, sólo haces la operación y obtienes el peso molecular de la banda de la cual no se conoce su peso molecular.

Ejemplo de la electroforesis realizada con proteínas totales de leguminosas

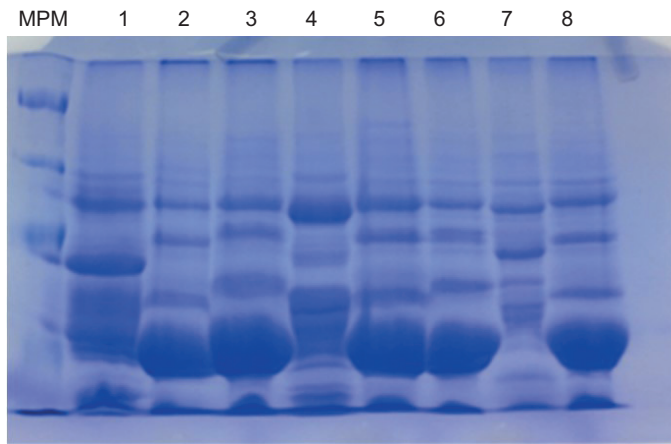


Figura 13.23. Electroforesis de proteínas totales de leguminosas. MPM, Marcado de peso molecular. 1) *Lens culinaris* (Lenteja), 2) *Cicer arietinum* (Garbanzo), 3) *Phaseolus vulgaris* (Frijol bayo), 4) *Phaseolus vulgaris* (Frijol pinto), 5) *Vicia faba* (Haba), 6) *Phaseolus vulgaris* (Alubia), 7) *Phaseolus vulgaris* (Frijol peruano 1), 8) *Phaseolus vulgaris* (Frijol peruano 2).

Bibliografía

- Bensimon, A. Heck, A. A. J. R. and Ruedi Aebersold, R. (2012). Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 81:379-405. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Universidad Autónoma de Aguascalientes on 02/18/20. For personal use only.
- Chaperoninas: su papel en el plegamiento de proteínas y su relación con enfermedades. <http://webquestcreator2.com/majwq/ver/ver/7919> (28 enero 2022).
- Cothia, C. and Finkelstein, A. V. (1990). The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:1007-1039.
- Enzyme Nomenclature - QM SBCS. www.sbcqs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme (18 febrero 2020).
- Estructura de proteínas. <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2018/BioProt/1527182496.pdf> (17 enero 2022).
- FAO,OMS,UNU. (1985). Necesidades de energía y de proteínas, Informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos, Serie de Informes Técnicos, No.724, 56-68, OMS, Ginebra.
- Herráez, A. Biomodel. UAH. es · LicenciaCC-by-nc-sa. <http://biomodel.uah.es/model1j/prot/aa-props.htm> (12 enero 2022).
- <https://israelmasa.files.wordpress.com/2013/10/tema-4a-proteinas-estructura-2a-farmacia.pdf> (17 enero 2022).
- Las Proteínas. Características generales. <https://docplayer.es/111245317-Caracteristicas-generales.html> (13 enero 2022).
- Leser, S. (2013). The 2013 FAO report on dietary protein quality evaluation in human nutrition: Recommendations and implications. *Nutrition Bulletin*, 38(4), 421–428. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1111/nbu.12063>
- Luque Gillen, M. V. (Sin fecha) Estructura y propiedades de las proteínas. Master Ingeniería Biomédica. https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf
- Marioni, P. (sin fecha). Tema: Proteínas. Materia: Química aplicada. Escuela Nro. 537. Material producido en el Laboratorio Pedagógico. Localidad: Coronda.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L.,Giglione, C., Holdsworth, M. J., Bachmair, A. Waltraud X. & Schulze, W. X. (2019). The Scope, Functions, and Dynamics

- of Posttranslational Protein Modifications. *Annual Review of Plant Biology*. 70:119-151. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100211>
- Ponting, C. P. and Robert R. Russell, R. R. (2002). The Natural History of Protein Domains. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. Vol. 31:45-71 (Volume publication date June 2002). <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1146/annurev.biophys.31.082901.134314>
- RTECH-El enlace peptídico. <https://scottxrt.wordpress.com/2018/12/09/el-enlace-peptidico/> (12 enero 2022).
- Tandang-Silvas, M. R. G., Tecson-Mendoza, E. M., Mikami, B., Utsumi, S., and Maruyama, N. (2011). Molecular Design of Seed Storage Proteins for Enhanced Food Physicochemical Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. Vol. 2:59-73 (Volume publication date April 2011). First published online as a Review in Advance on October 4, 2010. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1146/annurev-food-022510-133718>
- Zhang, Y. *et al.* Vista estructural tridimensional de la red metabólica central de *Thermatoga maritima*. *Ciencia* 325, 1544-1549 (2009). (PDB).
<https://web.expasy.org/translate/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://www.rcsb.org/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://prosite.expasy.org/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://www.brenda-enzymes.org/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgibin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=2hcz>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://www.brenda-enzymes.org/oldstart.php>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://alphafold.com/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.
<https://swissmodel.expasy.org/>, visitada por última vez el 15 de marzo de 2022.



Capítulo 14

Estudio de metagenomas en plantas

Abraham Loera Muro
María Goretty Caamal Chan
Aarón Barraza

*Programa de Agricultura en Zonas Áridas
CONACYT-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.*

Resumen

Las plantas, como todos los seres vivos de este planeta, se encuentran en íntima relación con una gran cantidad de microorganismos que habitan en ella y alrededor de ella. Estas comunidades microbianas poseen una función primordial sobre la planta. Estas funciones pueden ser desde promover su crecimiento, ayudar en la absorción de nutrientes y en la protección contra patógenos. Los estados de salud de la planta dependen en gran medida de la cantidad de interacciones que establezca con los diferentes microorganismos que forman el microbioma. Sin embargo, debido a su gran complejidad, estas comunidades y las interacciones que ocurren dentro de ellas y con la planta apenas están siendo comprendidas en estas últimas décadas. Por lo que, además de la importancia ecológica que significa el

estudio del microbioma de las plantas, este también radica en que puede ser aprovechado y explotado para desarrollar nuevos enfoques para la promoción del crecimiento de cultivos y el desarrollo de nuevos mecanismos de biocontrol y biofertilizantes que permitan un mejor aprovechamiento de una manera amigable con el ambiente. Para su estudio, actualmente existen, además de las tecnologías tradicionales, las llamadas tecnologías de secuenciación de nueva generación, con las que se pueden generar una gran cantidad de datos biológicos que permiten una mejor comprensión del microbioma y su relación con la planta huésped.

Introducción

El estudio de microorganismos asociados a plantas tiene una larga historia. Los microorganismos asociados a las plantas deben ser considerados como una pieza clave para aumentar la sanidad vegetal, la productividad, la manutención de las comunidades vegetales y el funcionamiento del ecosistema. El microbioma de las plantas (o fitobioma, al referirnos específicamente al microbioma de plantas) posee un impacto directo sobre las características funcionales de la planta, como, por ejemplo: la longevidad, el crecimiento, la absorción de nutrientes, la protección contra patógenos, entre otros. Todo lo anterior mediante la modificación de las rutas bioquímicas gracias a las interacciones que ocurren entre la planta con su microbioma, y entre las especies que forman al mismo.

El crecimiento y el rendimiento de las plantas en entornos naturales dependen de una gran cantidad de interacciones con diferentes microorganismos. Un ejemplo es la comunidad microbiana asociada con las raíces, mejor conocida como el rizobioma, la cual se postula ensambla de la siguiente manera: primero, la rizosfera (que es la zona localizada entre 1-3 mm alrededor de las raíces y es afectada por los exudados de la misma) es colonizado por un subconjunto de microorganismos de la comunidad del suelo; en segundo lugar, el rizoplano (superficie de la raíz donde se incluyen todos los microorganismos adherida a ella) y el espacio endofítico (compuesto por microorganismos que habitan dentro del tejido de la planta) son colonizados por un subconjunto de la comunidad de la rizosfera (Fig.14.1). De lo anterior, ha surgido un término que ayuda a englobar a un conjunto de microorganismos

que se encuentran recurrentemente asociados a algún compartimiento de las plantas, denominado “core microbiome”, el cual se puede traducir como el microbioma que es localizado en una especie en particular. También podemos encontrar a las comunidades microbianas que habitan la filosfera de las plantas (superficie de la parte aérea de las mismas), que también posee funciones de gran importancia para su huésped.

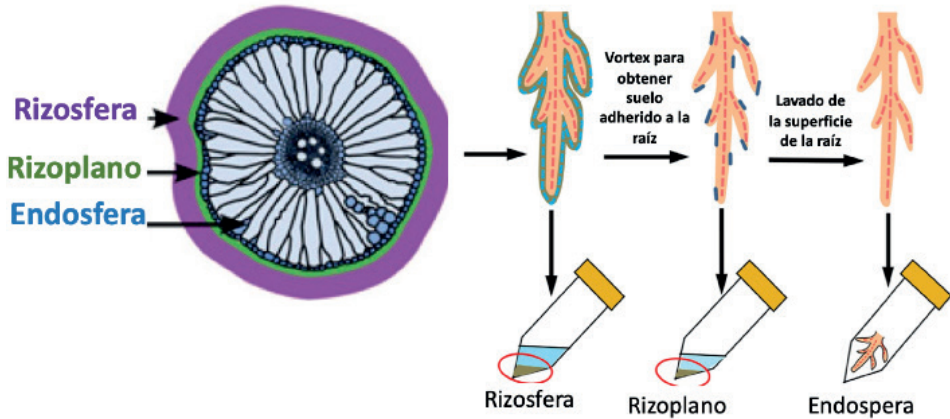


Figura 14.1 Protocolo para colectar muestras de rizosfera, rizoplano y endosfera. Tomada y modificada de Edwards *et al.* (2015) y Luo *et al.* (2017).

Estas comunidades del fitobioma pueden ser estudiadas y divididas según el compartimiento de la planta que habitan: a) los asociados a su raíz se les denomina rizobioma; b) las comunidades asociadas a la filosfera forman el filobioma; y c) las asociadas a sus componentes interiores o endosfera (comunidades endofíticas).

Al igual que el microbioma humano, el fitobioma constituye un aspecto biológico menos apreciado (fisiología, genoma, metaboloma, etc.) de las plantas. Las plantas y su microbioma asociado se afectan unos a otros en variadas y sutiles formas. Por ende, una planta es considerada como un metaorganismo, teniendo una persistente y regulada relación con su fitobioma. La composición del fitobioma está regulado por numerosos factores bióticos y abióticos, donde podemos encontrar una compleja matriz de interacciones microorganismo-planta y microorganismo-microorganismo.

Finalmente, la importancia del estudio del fitobioma, además de la ecológica, es debido a que puede ser aprovechado y explotado de varias maneras: a) desarrollar nuevos enfoques para la promoción del crecimiento de cultivos, b) optimizar procesos de fermentación y formulación relacionados, y c) desarrollar nuevos mecanismos de biocontrol y biofertilizantes que permitan un mejor aprovechamiento de una manera amigable con el medio.

Funciones de las comunidades microbianas asociadas a las plantas

Los microorganismos que conforman al microbioma de las plantas poseen varias funciones. Estos microorganismos son necesarios para promover el crecimiento vegetal. Los microorganismos más estudiados y caracterizados son los que conforman el rizobioma. Estos microorganismos que forman parte del microbioma, pueden estar en varios compartimientos de la planta y estimular el crecimiento de las mismas gracias a varios mecanismos: 1) solubilización de nutrientes (particularmente fósforo), 2) producción de sideróforos que ayudan a asimilar metales, 3) fijación de nitrógeno, 4) producción de fitohormonas, 5) producción de compuestos orgánicos volátiles, 6) inducción de resistencia sistémica (ya sea a través de la resistencia sistémica inducida (ISR), o de la resistencia sistémica adquirida (SAR), y 7) supresión de la enfermedad a través de la producción de compuestos o por competencia directa.

Todos los organismos requerimos nitrógeno (N) para sintetizar biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la fuente principal de N en la naturaleza, el nitrógeno atmosférico (N_2), no se encuentra accesible para la mayoría de los organismos vivos, incluidos los eucariotas. La fijación biológica de nitrógeno, proceso por el cual el N_2 se reduce a amoníaco (NH_3) lo llevan a cabo algunas especies de microorganismos, particularmente bacterias y arqueas. Este fenómeno se realiza gracias a la nitrogenasa (genes *nif*, fijación de N_2), una enzima altamente conservada que comprende dos metaloproteínas, la FeMo-proteína y la Fe-proteína.

Por otra parte, el hierro (Fe) es un micronutriente esencial para las plantas y microorganismos, ya que está involucrado en varios procesos biológicos importantes, tales como fotosíntesis, respiración, biosíntesis de clorofila y en la fijación biológica del nitrógeno. En condiciones aeróbicas, la solubilidad del Fe es baja, lo que refleja el predominio de Fe_3+ , limitando así el suministro

de Fe para los seres vivos. Sin embargo, ciertos microorganismos han desarrollado ciertas estrategias para la absorción de Fe. Por ejemplo, las bacterias pueden superar la limitación nutricional de Fe al producir agentes quelantes llamados sideróforos. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (<1000 Da) con alta especificidad y afinidad por quelar o unir Fe_3^+ , seguido del transporte y deposición de Fe dentro de las células bacterianas.

Otro mecanismo por el cual las bacterias pertenecientes al microbioma de las plantas promueven beneficios a las mismas, es a través de la solubilización de compuestos como el fosfato. A pesar de que el fósforo se encuentra en grandes cantidades en la mayoría de los suelos, la mayor parte de este es insoluble y por lo tanto no permanece disponible para ser aprovechado por las plantas. El fósforo insoluble está presente como material inorgánico en compuestos como la apatita o como una de varias formas orgánicas, como el fosfato de inositol, fosfomonoésteres y fosfotriésteres. La solubilización inorgánica del fósforo se produce como resultado de la acción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glicólico y el ácido cítrico, y por la producción de ciertas enzimas llamadas fosfatasas, que son sintetizadas por diferentes bacterias del suelo.

Así mismo, las hormonas vegetales o fitohormonas juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es bien conocido que los microorganismos del rizobioma también pueden producir o modular los niveles de ciertas fitohormonas en las plantas hospedadas. Por lo tanto, pueden afectar el equilibrio hormonal de la planta huésped y su respuesta al estrés al alterar los niveles de fitohormonas endógenas en éstas plantas. El ejemplo mejor conocido es la producción de la fitohormona auxina (ácido indol-3-acético/ácido indol-acético/IAA). Se estima que cerca del 80% de los microorganismos que se han aislado de la rizosfera de varios cultivos poseen la capacidad de producirlo o modular a esta fitohormona.

Finalmente, una de las formas más comunes por las que las bacterias que habitan en el microbioma de las plantas promueven el crecimiento de las mismas de una forma indirecta, es debido a que pueden prevenir la proliferación de patógenos mediante la síntesis de diferentes tipos de compuestos antimicrobianos, como antibióticos, entre otros, así como por la competición directa por el espacio contra diferentes patógenos.

Interacciones entre las plantas y su microbioma

Las interacciones entre plantas y su microbioma ocurren a través de procesos simbióticos, endofíticos o asociativos con distintos grados de proximidad con las raíces y el suelo circundante, principalmente. Estas interacciones están influenciadas por factores ambientales, como la composición del suelo, la temperatura, la humedad, la irradiación y el viento. Para establecer estas interacciones entre plantas y microorganismos, algunas barreras preformadas de las plantas y las defensas del sistema inmunitario deben pasarse por alto mediante una efectiva comunicación química entre la planta y el microbioma (Figura 14.2). La percepción extracelular en las plantas está mediada típicamente por receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors o PRR) unidos a la membrana plasmática que detectan epítomos microbianos conservados, denominados patrones moleculares asociados a microbios (Microbe-Associated Molecular Patterns o MAMP). La activación de un PRR por un MAMP asociado induce respuestas de defensa de la planta, denominadas colectivamente inmunidad activada por MAMP (MAMP-Triggered Immunity o MTI), que limitan el crecimiento de los patógenos. La MTI incluye respuestas tales como la alcalinización extracelular, el aumento de la concentración de Ca_2+ y la activación de la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógeno (Mitogen Activated Protein Kinase o MAPK). La MTI funciona en el reconocimiento de muchos componentes del fitobioma, incluidas las bacterias, hongos, oomicetos, nematodos e insectos. Por otra parte, los patrones moleculares asociados a daños (Damage-Associated Molecular Patterns o DAMP) son, por definición, moléculas propias, pero que su presencia señala la actividad dañina en las plantas por otros organismos. Las señales DAMP pueden incluir oligogalacturonidas, que son compuestos formados por la degradación fúngica de las paredes celulares de las plantas durante la infección. La percepción de DAMP también se logra mediante los PRR. Para evitar estos mecanismos de reconocimiento, los microorganismos secretan moléculas llamadas efectores, que son moléculas expresadas que cambian la fisiología del huésped para beneficiar al invasor. La percepción de la planta de los efectores está frecuentemente mediado por proteínas LRR (Leucine-Rich Repeat) de unión a nucleótidos (Nucleotide-binding LRR proteins o NLR) que son proteínas principalmente intracelulares. Las proteínas NLR han evolucionado para detectar la presencia o actividad de proteínas efectoras, que conducen a la

activación de fuertes reacciones inmunes, un proceso conocido como inmunidad activada por efectores (Effector-Triggered Immunity o ETI).

Un aspecto muy interesante y poco entendido es, de hecho, que la mayoría de los microorganismos pertenecientes al microbioma con los que las plantas interactúan, no son patógenos. Sin embargo, muchos de ellos expresan moléculas que son potencialmente reconocidas por el sistema inmune de la planta. Por lo tanto, una importante pregunta sobre el microbioma de las plantas es, ¿cómo el sistema inmune de la planta distingue a los comensales de los patógenos y cómo los hace durante el ensamblaje del mismo? Una de las formas que se ha visto hasta el momento es, que al igual que los patógenos, varios microorganismos no patógenos poseen la capacidad de suprimir la MTI a través de tres posibles mecanismos: i) divergencia de los MAMP, ii) degradación/secuestro de los MAMP, y iii) modificación de los MAMP.

Por otra parte, para establecer una relación simbiótica con las plantas, algunas bacterias del fitobioma secretan o emiten moléculas beneficiosas para la planta. Estas moléculas, que regularmente se producen en la rizosfera, pueden desencadenar cambios o ajustes específicos en el transcriptoma de la planta. Si bien, las fitohormonas son reguladores de crecimiento y defensa producidos por las plantas, algunas bacterias, como las llamadas promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth-promoting bacteria o PGPB) también pueden producir estos compuestos que incluyen auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido absísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), entre otros. Así mismo, algunas de estas PGPB del microbioma también producen compuestos volátiles orgánicos (VOC, compuestos lipofílicos de bajo peso molecular) que están involucrados en el mantenimiento de la salud del suelo, la modulación del crecimiento de las plantas y la inducción de resistencia. Algunos ejemplos de éstos VOC conocidos producidos por PGPR son el 2-heptanol, 2-undecanona y el pentadecano.

Así mismo, las plantas sirven como fuentes ricas de nutrientes para las bacterias y otros microorganismos que viven dentro de sus tejidos y alrededor de ellos. A través del proceso de rizodeposición (dado por los exudados de la raíz), las plantas liberan compuestos orgánicos en el suelo. Estos compuestos pueden contribuir a la acumulación del carbono derivado de plantas a la biomasa microbiana circundante. Un ejemplo de estos exudados son los flavonoides, que son metabolitos secundarios ricos en carbono. La adaptación bacteriana a los exudados de las raíces de las plantas es claramente visible en

todos los niveles, desde el genoma hasta el metaboloma de los microorganismos que conforman el fitobioma. Una adaptación evidente es la observada en el enriquecimiento del metabolismo de los carbohidratos y los genes de transporte, junto con sus reguladores transcripcionales en genomas de bacterias asociadas a plantas de diferentes especies.

Finalmente, para que exista un correcto ensamblaje de las comunidades microbianas que forman el fitobioma de las plantas, además de la comunicación que debe existir entre los microorganismos que la habitan con su huésped, también deben existir interacciones microorganismo-microorganismo. Uno de los principales mecanismos a través de los cuales ocurren éstas interacciones es a través del llamado “quorum sensing” (QS). El proceso de QS involucra a la célula bacteriana que produce señales químicas conocidas como autoinductores (AI), que se secretan en el espacio extracelular. Hasta la fecha, tres tipos de autoinductores se han caracterizado en bacterias: AI-1, AI-2 y AI-3. El AI-2 (regularmente en Gram-negativas una acil-homoserin lactona o AHL) está involucrado en la comunicación entre diferentes especies bacterianas.

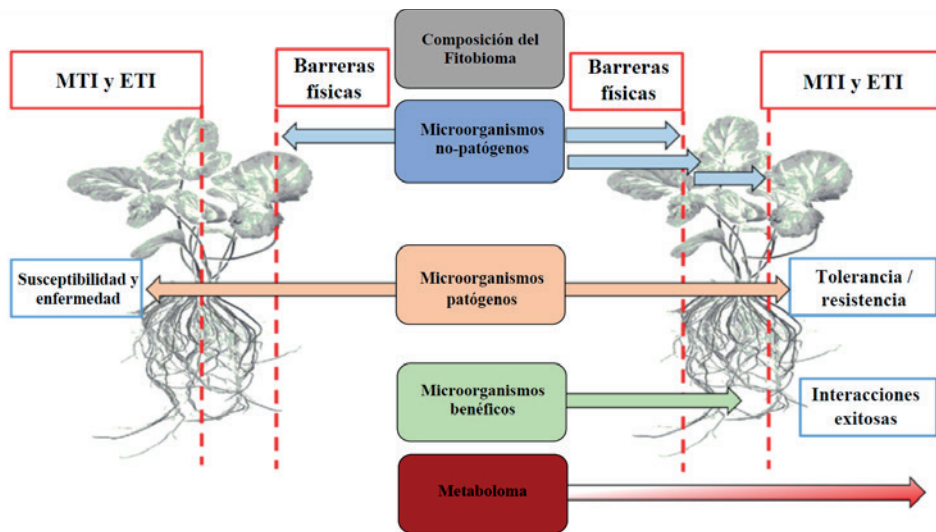


Figura 14.2 Interacciones entre plantas y su fitobioma (MTI: MAMP-Triggered Immunity; ETI: Effector-Triggered Immunity). Tomada y modificada de Mhlongo *et al.* (2018).

La metagenómica y la Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Las secuencias de los genes del ARNr y especialmente el ARNr 16S representan los objetivos actuales de estudio más importantes en la evolución y ecología bacteriana, incluida la determinación de las relaciones filogenéticas entre los taxones, la exploración de la diversidad bacteriana en el medio ambiente y la cuantificación de la abundancia relativa de taxones de varios rangos. El 16S ARNr es adecuado para esto por varias razones: a) el gen está distribuido universalmente, permitiendo el análisis de las relaciones filogenéticas entre taxones distantes; y b) como una parte funcionalmente indispensable del conjunto de genes centrales, se espera que el gen 16S ARNr solo se vea débilmente afectado por transferencia horizontal de genes, que respalda aún más su uso para estudios filogenéticos. A pesar de lo anterior, el 16S ARNr está sujeto a la variación, especialmente en ciertas regiones variables de los genomas. Esta presencia de regiones variables permite una diversificación suficiente para proporcionar una herramienta para la clasificación. Por otra parte, la presencia de regiones conservadas permite el diseño de cebadores para PCR adecuados o sondas de hibridación para varios taxones a diferentes niveles taxonómicos que van desde cepas individuales a phyla.

A pesar del amplio uso de 16S ARNr, hay varios aspectos a considerar durante la interpretación de los resultados derivados de 16S ARNr. Uno de los principales es el hecho de que sus números de copias por genoma varían de 1 hasta 15 o más copias. Los números de copias parecen ser específicos de taxones hasta cierto punto, pero la variación entre cepas de la misma especie también ha sido registrada. El número de copias de ARNr ha sido puesto en contexto con la estrategia de vida de las bacterias porque el número de copias de ARNr de algunos taxones está correlacionado con su capacidad de responder a condiciones de crecimiento desfavorables.

En 1977, Frederick Sanger desarrolló la tecnología de secuenciación de ADN que se basaba en el método de terminación de cadena (conocida como secuenciación de Sanger). Al mismo tiempo, Walter Gilbert desarrolló otra tecnología de secuenciación basada en la modificación química del ADN y la posterior escisión en bases específicas. Sin embargo, debido a su alta eficiencia y baja radioactividad, la secuenciación de Sanger fue adoptada como la tecnología principal. Después de años de mejora, Applied Biosystems introdujo la primera máquina de secuenciación automática (el AB370) en 1987, adop-

tando la electroforesis capilar que hizo que la secuenciación fuera más rápida y precisa. La Secuenciación de Nueva Generación (Next-Generation Sequencing o NGS) es diferente del método Sanger en aspectos tales como el análisis masivo paralelo de datos, el alto rendimiento y los reducidos costos. Aunque la NGS hace que obtener las secuencias de genomas sea más fácil, rápido y con menores errores, el análisis de los datos obtenidos y las explicaciones biológicas que se les den a éstos siguen siendo el cuello de botella en el estudio de los genomas. Muchas plataformas de secuenciación están disponibles hoy en día. Todas ellas usan fragmentos cortos, llamados lecturas o “reads”, para investigar secuencias del genoma. Las tecnologías de NGS analiza millones de fragmentos cortos de ADN durante una secuenciación. Las longitudes de lectura de esos fragmentos dependen del tipo de plataforma de NGS y pueden estar en el rango de 25–450 pares de bases. Si bien las lecturas son mucho más cortas que las creadas por la secuenciación tipo Sanger, NGS tiene un mayor rendimiento y crea conjuntos de datos con hasta 50 gigabases por ejecución. Esto exige algoritmos mejorados que sean capaces de procesar esas enormes cantidades de material de datos sin procesar.

En la metagenómica, la información de la secuencia genética que se captura representa casi la totalidad de las especies de un microbioma, donde se incluyen las que no pueden representarse mediante cultivos microbiológicos tradicionales. Actualmente, se utiliza con mayor frecuencia en las investigaciones de los microbiomas y las comunidades microbianas para el estudio de la abundancia relativa de taxones individuales, el análisis basado en la construcción de grupos de similitud (o unidades taxonómicas operativas, operational taxonomic units o OTU) de amplicones de PCR del gen 16S ARNr. Una alternativa al 16S ARNr, es la secuenciación de un metagenoma del microbioma de la planta (“shotgun metagenomics”). Esta técnica se basa en la secuenciación del ADN total de toda la comunidad del microbiana. El mayor desafío en la metagenómica tipo “shotgun metagenomics” es ensamblar las lecturas de secuenciación en genomas correctamente ensamblados con alta calidad donde se capturan todos los genes en un genoma y las lecturas (en este paso se les denomina contigs) ensambladas se asignen a los organismos correctos. Esto puede ser particularmente desafiante para microorganismos raros o de nueva descripción. Otros obstáculos incluyen la asignación taxonómica adecuada de los genomas ensamblados y la diferenciación entre cepas relacionadas en muestras que contienen un alto grado de heterogeneidad.

Análisis bioinformático

Plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS)

Actualmente las plataformas de secuenciación de siguiente generación o NGS (“Next-generation sequencing”) son las siguientes: IonPGM (Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence.html>), PacBio (Pacific Biosciences, <https://www.pacb.com/>), MinIon (Oxford Nanopore, <https://nanoporetech.com/>) e Illumina (<https://www.illumina.com/>). Estas plataformas tienen la capacidad de secuenciar productos de amplificación por PCR, ya sean únicos, de varios genes o genes marcadores de distintos organismos al mismo tiempo, así como, genomas y transcriptomas únicos, y varios genomas y transcriptomas al mismo tiempo. Dependiendo de las necesidades de trabajo, se puede elegir la plataforma de secuenciación NGS adecuada. Las plataformas de secuenciación PacBio y MinIon se caracterizan por generar lecturas largas (“long reads”) desde 10 Kb hasta 100 Kb, pero con una precisión por base de ~85%. La plataforma de secuenciación IonPGM generan fragmentos de tamaño heterogéneo de 100 pb hasta 400 pb con una precisión por base de ~98%. La plataforma de secuenciación Illumina ofrece distintos niveles de rendimiento (nivel de mesa de trabajo, desde 4 millones a 400 millones de “reads”; y nivel de producción escalada, desde 400 millones hasta 20 mil millones) y una longitud de lecturas uniforme (150 pb, 250 pb, 300 pb, dependiendo el equipo de secuenciación) y con una precisión por base >99%; además, es la única plataforma en que las secuencias generadas son pareadas (“paired-end”), es decir, se producen lecturas en sentido “forward” (a las que se les denomina R1) y lecturas en sentido “reverse” (R2) a partir de la misma secuencia. Por el hecho de producir secuencias pareadas las denominaciones de los productos de secuenciación son: 2 x 150, 2 x 250 y 2 x 300. Para los análisis de diversidad bacteriana mediante la secuenciación de las regiones hipervariables (V1-V9) V3 o V4 del gen 16S rDNA, las plataformas de secuenciación recomendadas son las IonPGM e Illumina (MiniSeq y MiSeq); aunque, por la homogeneidad de los productos de secuenciación (2 x 150 del MiniSeq o 2 x 300 pb del MiSeq), la precisión por base y la generación de secuencias para-

das (R1-R2). Estas características aumentan la precisión por base, en este tipo de estudios y por ende esta plataforma es la de uso más extendido.

Productos de la secuenciación NGS

Los productos directos de la secuenciación NGS son las lecturas o “reads”. Las lecturas o “reads” generados poseen información importante para su procesamiento, análisis y manipulación. Esta información es: la secuencia en sí y la calidad por base o nucleótido secuenciado. La calidad por base indica que tan precisa es la información, es decir, que tan fiable es la secuencia en cada base o nucleótido secuenciado. Los rangos de calidad varían de acuerdo a la plataforma de secuenciación. Sin embargo, el rango de calidad más usado es el de las plataformas Sanger (secuenciación automatizada de primera generación, que sólo secuencia una lectura a la vez) e Illumina. El rango de calidad de ambas plataformas de secuenciación es de 0 a 40, lo cual equivale a la tasa de error o calidad por base y se le denomina valor de Phred o calidad (y se representa con la letra “Q”). Entre más bajo sea el valor Q de la base secuenciada, menor es el valor de calidad y entre mayor sea este valor, mayor será la calidad. Además, el valor Q corresponde a la siguiente escala de calidades: 90% de precisión por base $Q = 10$, 99% de precisión por base $Q = 20$, 99.9% de precisión por base $Q = 30$, y 99.99% de precisión por base $Q = 40$. El formato de los archivos en los cuales se encuentra la información de la secuencia de las lecturas y la calidad por base secuenciada es el formato .fastq. Los archivos .fastq contienen todas las secuencias de las lecturas correspondientes a una muestra, que puede ser desde unos cientos hasta cientos de millones, o incluso más, de lecturas o “reads”. La información correspondiente a la calidad por base se encuentra en este archivo y está codificada en formato hexadecimal (Fig. 14.3).

```

@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:4900:1219 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ATCCTACGGGAGCAGCAGTGGGGAAATTTGCCAAATGGGGAAACCTGTGCAGCACGCCGCTGAGTGAAGAAGTATTCGGTAGTAAAGCTTATCAGCAGGGAAGAACATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCTCACTA
+
FFFAFFFF/FFFFFFF=FF/6F/FFFFA/FFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/FFFFFFFAA/
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:14789:1408 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:7385:1298 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
CTCTACGGGAGCAGCAGTGGGGGATTTGCCAAATGGGGCAACTCTGACGACGCAATGCCCGTGAGGATGAAGTTTTCCGGATTGTAACCTCTTTTATTAAGGACGATAATGACGGTACTTAATGAATAAGCTCCGGCTAACTA
+
AFFAFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
ACTCTACGGGAGCAGCAGTGGGGAAATTTGCCAAATGGGGCAACCTGTGCAGCACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTCCGGATTGTAACCTCTGTTGAAGAAGAAGCTGTGTGAGAGTGGAAGTTTACACAGTGCAGGTA
+
FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:20658:1430 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ACACCTACGGGAGCAGCAGTGTATTAAGATACAGACTCTCCGGTGCACCACGCCCGGAACCTGCTCTTATGCACCTCCGCCCCACGAGACGAGGCATGGGGAGTATGGCGAGTGGGGTTAAAATGTCGAGTGGGGTG
+
FF/FFFFFFFFFFFFFFFF/FF6F/FFFF/FF6F=FFFFFFFFFFFFFFFF/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/FA/FF/
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:15270:1440 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ACTCTACGGGAGCAGCAGTGGGGAAATTTGCCAAATGGGGCAACCTGTGCAGCAATGCCCGTGAGTGAAGAAGCTTAGGGTTGAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCCGGAGAATAAGCTCCGGCTAACT
+
FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:18469:1472 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
+
#####
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:25659:1473 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
+
#####
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:9353:1482 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ACCCCTACGGGAGCAGCAGTGGGGGATTTGCCAAATGGGGCAACCTGTGCAGCACCAATACCCTGAGGATGAAGTTTTCCGGATTGTAACCTCTTTTATTAAGGACGATAATGACGGTACTTAATGAATAAGCTCCGGCTAACTA
+
FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:18125:1490 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ACTCTACGGGAGCAGCAGTGGGGGATTTCCGCAATGGGGCAACCTGTGCAGCACCAATACCCTGAGGATGAAGTTTTCCGGATTGTAACCTCTTTTCCCGGAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGAAATGACATCGGCTAA
+
#####
@MN00341:44:00H2N2WJ:1:11101:24306:1561 1:N:0:TAGGCATG+AGAGGATA
ACTCTACGGGAGCAGCAGTGGGGAAATTTGGTCAATGGTGAAGGACTGAACAGCAGCAATGCCCGTGAGGATGACGGCCCTATGGGCTTAACCTCTTTTCCGAGGAGCAATAAGGGTCAGTGGCGTAGAGATGACCTCGGCA
+
FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF

```

Figura 14.3. Archivo de secuencias NGS en formato fastq. El inicio de cada secuencia está representado con “@”, seguido del identificador de secuencia dentro del archivo. En el siguiente renglón se encuentra la secuencia propiamente dicha. Se muestra un separador en el tercer renglón entre la secuencia y la calidad por base con “+”. El último renglón corresponde a la calidad por base en codificación hexadecimal.

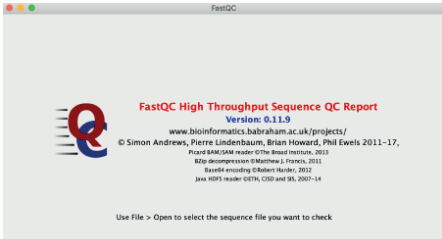
Procesamiento de los “reads” y control de calidad (QC)

Los archivos de secuenciación contienen las lecturas o “reads” generados por cada muestra mediante la secuenciación NGS. Las secuencias contenidas en los archivos poseen la información correspondiente a la calidad de secuenciación por base, lo que nos indica que tan confiable es la información de cada base secuenciada por secuencia, para todas las secuencias de cada muestra o archivo.

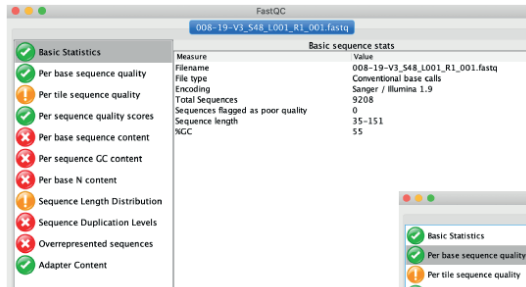
Para revisar de manera rápida y eficiente todas las lecturas presentes en un archivo de secuenciación NGS (archivo.fastq) se puede hacer a través del uso de la aplicación “Terminal” en Mac OS y en cualquier distribución de Linux, y para todas las plataformas se puede usar la aplicación FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Con la aplicación

“Terminal” puedes ver los archivos de secuenciación, contar cuantos “reads” se encuentran en el archivo e incluso eliminar los adaptadores que se agregaron en el proceso de síntesis de las “librerías” para el proceso de secuenciación; en el caso de que las secuencias de los adaptadores no se hayan eliminado previamente porque se prepararon estas en nuestro laboratorio acorde a nuestras especificaciones. De haberse preparado las librerías en nuestro laboratorio es necesario tener a la mano la secuencia correspondiente a los adaptadores empleados en el caso de que fuera diseños por nuestro equipo de trabajo, o cuales de los presentes de los “kits” de secuenciación comerciales, se emplearon para quitarlos de la secuencia de interés. Con el uso de la aplicación “Terminal” se pueden identificar los adaptadores usando en conjunto los comandos “grep”, “sed” en conjunto con las secuencias específicas de los adaptadores o con expresiones regulares. Con la aplicación FastQC se puede acceder al archivo de secuenciación NGS usando una interface gráfica de usuario o GUI (“Graphic user interface”, es decir, se puede “abrir” un archivo de manera habitual como accedamos a los archivos con los programas de ofimática de Microsoft Office [Word, Excel]). Al acceder a los archivos de secuenciación NGS, estos son procesados por la aplicación y al término de este procesamiento se despliega toda la información correspondiente a la calidad por base de todas las secuencias o “reads” presentes en el archivo, presencia de adaptadores (si es que los hay), abundancia de ambigüedades en las secuencias (“N”, o nucleótidos no definidos en la secuencia) (Fig. 14.4).

Las secuencias de los archivos de secuenciación NGS se pueden procesar con distintas aplicaciones o programas para eliminar las pares de bases, o incluso secuencias completas, de baja calidad (Fig. 14.4, zona roja). Las aplicaciones o programas más utilizados para este fin son: Trimmomatic y BBDuk. Para ambas aplicaciones es necesario especificar el valor de la calidad mínima por base, para eliminar las pares de bases que no cumplan con este criterio. Este proceso también se le conoce como “Trimming” que es parte del proceso “QC” (“Quality Control”), ya que al eliminar las pares de bases o secuencias de baja calidad se está aplicando un criterio cuantitativo sobre las secuencias presentes en el archivo de secuenciación NGS y así los análisis realizados a estas secuencias serán más confiables (Figura 14.5).



1



2



3

Figura 14.4 Aplicación FastQC. 1) GUI de la aplicación, con la indicación para el uso o apertura de un archivo de secuenciación NGS para su procesamiento. 2) Despliegue de todas las características del archivo de secuenciación NGS procesado por la aplicación. 3) Gráfica de cajas (“boxplot”) de la distribución de las calidades por base de cada secuencia presente en el archivo de secuenciación NGS, con tres zonas de calidad: roja (baja calidad, no recomendable), amarilla (calidad moderada, justificar uso) y verde (calidad alta, recomendable sin justificación de uso).

Control de Calidad y “Trimming”

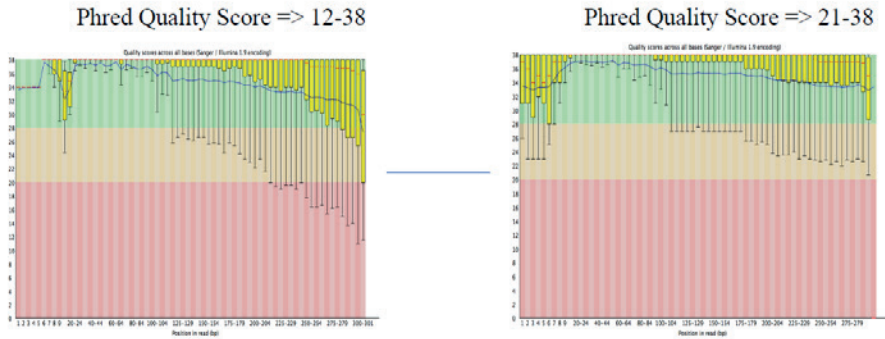


Figura 14.5 Proceso QC mediante el “trimming” de los pares de bases de las secuencias en los archivos de secuenciación NGS. Al inicio (izquierda) están presentes pares de bases con un rango de calidad de 12-38 (es decir que se encuentran en la zona roja a la zona verde) con valores medios de calidad de 28-38 (línea azul). Después del proceso de “trimming” (derecha) el rango de calidad aumentó de 21-38 con valores medios de calidad de 34-37 (línea azul).

Procesamiento de “reads” y generación de tablas de OTUs

Las secuencias procesadas ahora se pueden agrupar por pares, ya que como se generaron a partir de la plataforma de secuenciación Illumina, se cuentan con lecturas en sentido “forward” denominadas R1 y lecturas en sentido “reverse” denominadas R2. Al tener las secuencias en pares se procede al empalme o “merging” de los pares de secuencias R1 y R2 con la aplicación BBMerge. Este proceso elimina las secuencias quiméricas que se generaron en el proceso de creación de las librerías y en el mismo proceso de secuenciación; ya que, las secuencias quiméricas no tienen una secuencia complementaria a la cual complementarse y así generar un empalme de secuencias R1-R2. Previo al proceso de empalme o “merging” de las secuencias R1 y R2 se pueden eliminar las quimeras con el uso de la aplicación UCHIME. Las secuencias resultantes del proceso de empalme o “merging” se denominan ahora con la letra R y se puede proceder al proceso de agrupamiento, mapeo y generación de tablas de unidades taxonómicas operacionales (“Operational taxonomical units or OTU”) (Fig. 14.6).

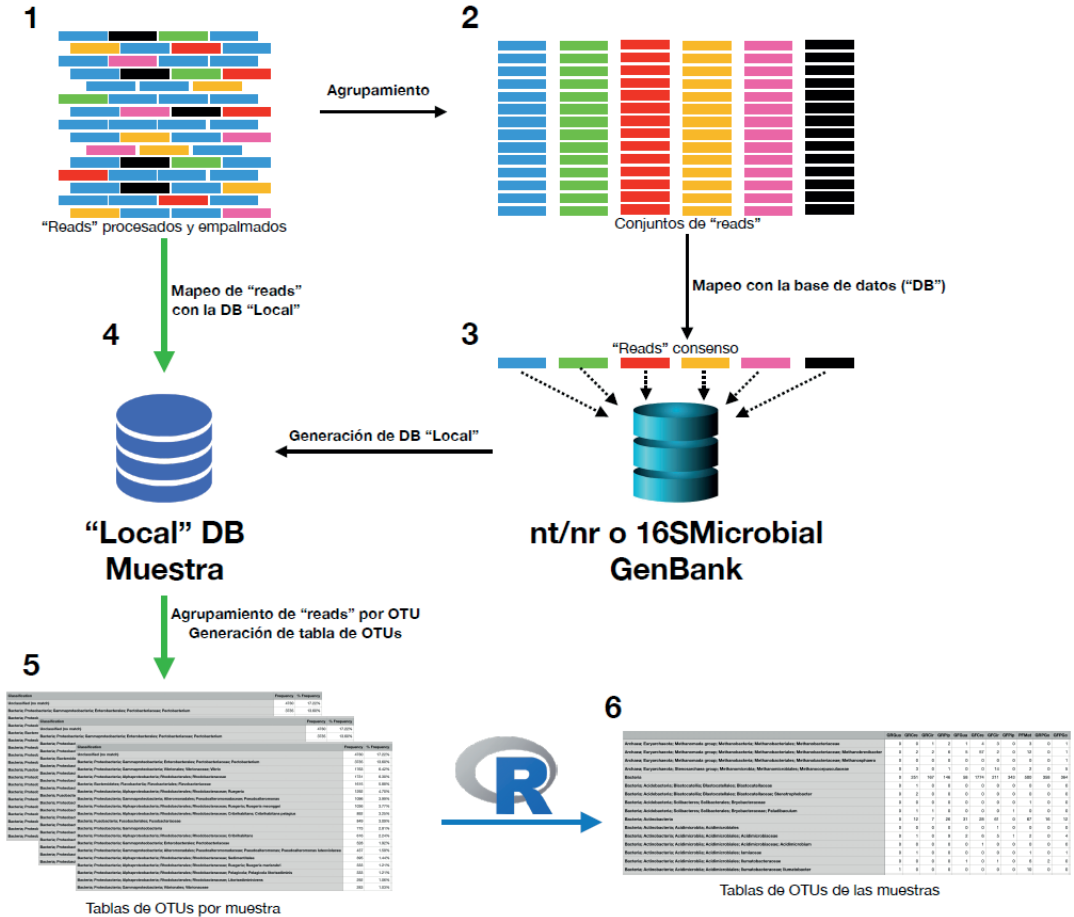


Figura 14.6 Proceso de generación de la tabla de OTUs. 1) Conjunto de "reads" procesados, pareados y empalmados. 2) "Reads" agrupados con base al criterio de identidad/similitud del 98%. 3) "Reads" consenso de cada agrupación que serán "mapeados" con la base de datos ("database" o "DB") del GenBank, para la generación de una DB "Local" o por muestra. 4) Mapeo del conjunto de "reads" procesados, pareados y empalmados de la muestra con la DB "Local" de la muestra. 5) Agrupamiento de los "reads" por cada OTU y generación de la tabla de frecuencias de cada OTU en la muestra. 6) Integración de las tablas de OTUs por muestra a una tabla de OTUs de las muestras.

El proceso de agrupamiento de los “reads” consiste en formar grupos basados en el criterio de “identidad/similitud” de las secuencias de los “reads”, es decir, agrupar las secuencias que se parecen a nivel de secuencia con al menos un porcentaje del 98% de “identidad/similitud” como requisito mínimo de agrupamiento de los “reads” (Fig. 14.6.1 y 14.6.2). Este proceso se puede realizar con las aplicaciones Velvet, SPAdes, CAP3, SOAPdenovo, así como cualquier ensamblador *de novo*. Los ensambladores *de novo*, en principio, se encargan de agrupar los “reads” presentes en un archivo de secuenciación NGS, tomando como criterio principal la “identidad/similitud” de las secuencias o “reads” y así poder formar agrupaciones de secuencias. Los ensambladores *de novo* se utilizan para la generación de “contigs”. Los “contigs” son el producto del empalme de secuencias contiguas que se extienden a longitudes de pares de bases mayores que las lecturas originales. La generación de “contigs” ayuda en la construcción de secuencias completas de ARNm’s, en el caso de la transcriptómica, sin necesidad de contar con un genoma de referencia y determinar que genes están transcripcionalmente activos; así como para la construcción completa de cromosomas y, por ende, del genoma completo de un organismo, o genómica, para la generación de un genoma de referencia.

Los grupos de “reads” generados en el proceso de agrupamiento con el uso del ensamblador *de novo* se designan con un identificador único por grupo (Fig. 14.6.2). Cada grupo identificado genera una secuencia consenso propia, la cual se utiliza para llevar a cabo el proceso de “mapeo” con una base de datos de secuencias de referencia (Fig. 14.6.3). Las bases de datos de las secuencias de referencia pueden ser de genomas completos o de genes marcadores, tales como el 16S para procariotes, 18S y región ITS (“Internal transcribed spacer”) para eucariotes. Los genes 16S ADNr y 18S ADNr ambos poseen 9 regiones hipervariables (V1-V9). Las regiones hipervariables tienen la característica de que son regiones que presentan alta variabilidad en su secuencia para poder diferenciar entre organismos de distintas especies, pero entre organismos de la misma especie, estas regiones se mantienen estables o conservadas. Para los estudios de diversidad procariótica, la o las regiones hipervariables que se recomienda(n) utilizar es la región V3 o V3-V4 (V3 junto con la región V4). El proceso de “mapeo” consiste en el alineamiento de cada secuencia consenso de cada grupo generado en el proceso de “agrupamiento” con una base de datos. El algoritmo o aplicación para llevar a cabo este proceso es “Megablast” y la base de datos puede ser la de nucleótidos no redundantes (“nt/nr”) o la

“16SMicrobial” del GenBank, así como la SSU de Silva y Greengenes, <https://www.arb-silva.de/>, <https://greengenes.secondgenome.com/>). Los resultados de los alineamientos obtenidos servirán para establecer una base de datos “local” por muestra, es decir, este proceso de mapeo se realiza por cada muestra (Fig. 14.6.3, 14.6.4). Una vez obtenida la base de datos “local” por muestra, se procede al proceso de “generación de tablas de unidades taxonómicas operacionales” o de “tablas de OTUs (Operational taxonomic units)” con el uso de todas las secuencias empalmadas y un criterio de asignación taxonómica a nivel de especie del 97% al 99% (Fig. 14.6.5). Este criterio de asignación indica que para que un “read” pueda ser asignado al nivel taxonómico de especie requiere un 97% o 99% de identidad con la secuencia correspondiente en la base de datos “local”, si el porcentaje de identidad es menor al 97% o 99% se asignará al nivel de genero; menor al 95% se asignará a nivel de familia y así sucesivamente hasta llegar al nivel de filo o hasta dominio. Este proceso se lleva a cabo con cada “read”, lo que genera una tabla de frecuencia del total de “reads” asignados a cada OTU en la muestra analizada.

Las tablas de OTUs generadas por muestra se integran en una tabla de OTUs de todas las muestras y de sus replicas basadas en las frecuencias de “reads” de cada OTU (Fig. 14.6.6). El siguiente paso consiste en la normalización de los datos. La normalización de los datos de cada muestra se realiza obteniendo la proporción o porcentaje de la frecuencia de “reads” en cada OTU con respecto al total de “reads” de cada muestra. Esto nos permite comparaciones más claras y evita los sesgos provocados por la cantidad de “reads” generados en cada replica de cada muestra en el proceo de secuenciación NGS; ya que, la obtención de “reads” varia con cada replica de cada muestra. Al tener las tablas de OTUs de las muestras por replicas, estas se pueden integrar sólo por muestra para comparar distintas muestras más fácil y claramente. Para los análisis de diversidad ecológica (alfa y beta, principalmente), es necesario tener las tablas de OTUs por muestra y de sus replicas ya normalizadas.

Análisis de diversidad ecológica microbiana

Los análisis de diversidad alfa son los que se llevan a cabo para conocer que tan homogénea o uniforme es la muestra de trabajo que se eligió para ser estudiada. La muestra de trabajo es cualquier zona de muestreo bien delimitada y con características bien definidas. La muestra de trabajo puede ser la hoja

de una planta, suelo asociado a raíces de plantas (rizoplano), suelo cerca de las raíces de una planta (rizosfera), suelo de un campo de cultivo, suelo de bosque, muestras fecales de pacientes sanos, muestras fecales de pacientes con alguna enfermedad diagnosticada, etc. Las replicas de cada muestra corresponden a tomar varias muestras de la muestra de trabajo, es decir, si son muestras de hojas de una planta tomar varias hojas de esa planta, varias muestras de suelo o varias muestras fecales del mismo paciente. Los índices alfa que se estiman comúnmente son los que nos indican que tan diversa, rica y homogénea es la muestra *per se*. Los índices alfa de diversidad corresponden directamente al número de OTUs observados o identificados en la muestra y al índice de Chao1. Este último toma en cuenta además de la cantidad de OTUs observados en la muestra los OTUs poco representados en la misma, para así darle un peso ecológico relevante a estos organismos en la comunidad microbiana que conforma la muestra. El índice de riqueza o índice de Shannon evalúa que la cantidad de OTUs sea tan variada como la proporción que representa cada OTU en la comunidad microbiana de la muestra analizada. El índice de homogeneidad o índice de Simpson evalúa que la comunidad microbiana este conformada principalmente por un dominio o nivel taxonómico en particular: Bacterias, Archaeas, Eukaryas, Fungi, Metazoa, etc. Los índices alfa se representan gráficamente mediante “boxplots” y se realiza una comparativa estadística para determinar diferencias netas o significativas aplicando las pruebas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis (Fig. 14.7.1). Además, los índices alfa se pueden estimar mediante curvas de muestreo, es decir, realizar una simulación de los OTUs presentes en cada muestra contra el total de “reads” presentes en la muestra; también se les denomina curvas de rarefacción y ayudan para determinar si la cantidad de “reads” presentes en la muestra está representando la totalidad, al menos a nivel teórico, de la diversidad microbiana en la muestra (Fig. 14.7.2). Este análisis de estimación de curvas de muestreo se puede aplicar a los índices de Chao1, Shannon y Simpson con los OTUs presentes en cada muestra (interpolación) e incluso extenderlos, mediante la simulación computacional, al doble de “reads” de la muestra o extrapolación (Fig. 14.7.3). Además, con estos análisis de interpolación/extrapolación se puede estimar de manera más precisa si la cantidad de “reads” en cada muestra está representando la totalidad teórica de la diversidad microbiana (Fig. 14.7.4). Para el manejo de datos, es decir, de las tablas de OTUs, la normalización de los datos, manejo de la integración de las tablas de

OTUs por réplicas y por muestra, cálculo de los índices alfa para diversidad, riqueza y homogeneidad de las muestras, se requiere del uso del lenguaje de programación R y del ambiente de desarrollo integrado o IDE (“Integrative development environment”) de RStudio (<https://www-r-project.org>, <https://rstudio.com>), así como de los paquetes de visualización de gráficos ggplot2 y de análisis ecológicos vegan y iNEXT.

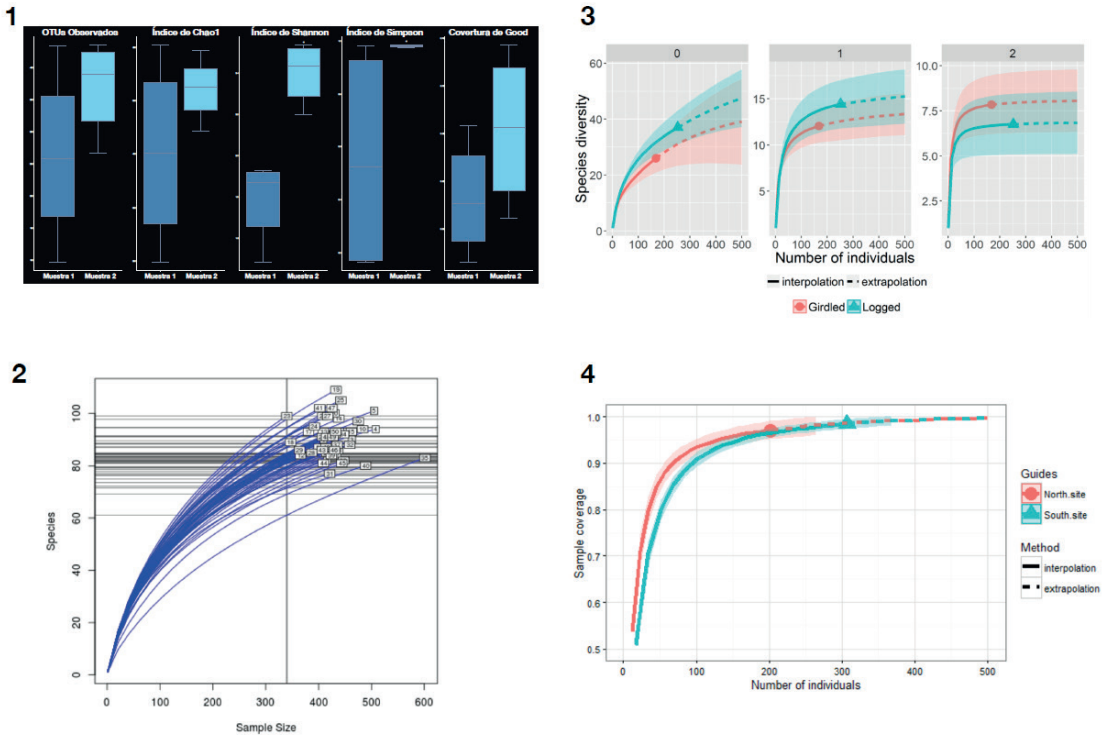


Figura 14.7 Representación de los índices de diversidad alfa. 1) Análisis de distribución de los índices alfa de diversidad (OTUs observados, índice de Chao1), riqueza (índice de Shannon) y homogeneidad (índice de Simpson) de cada muestra en “boxplots”. 2) Estimación de las curvas de rarefacción de cada muestra. 3) Estimación de las curvas de muestra mediante el proceso de inter- y extrapolación de la diversidad ((0) índice de Chao1, riqueza (1) índice de Shannon) y homogeneidad (2) índice de Simpson) de cada muestra. 4) Estimación de la curva de cobertura de diversidad acorde a la cantidad de “reads” mediante el proceso de inter- y extrapolación.

La comparación entre muestras se lleva a cabo por medio de los índices beta. Los índices beta consisten en análisis de agrupamientos de las muestras, los cuales pueden tomar como base la estimación de la matriz de distancias de disimilitud de Bray-Curtis, Jaccard, UniFrac, entre otras. La estimación de la matriz de distancias de disimilitud estima de manera cuantitativa que tan diferentes o similares son las muestras entre sí. Entre más alto el valor entre dos muestras, indica que es mayor la disimilitud o que son muy diferentes. Entre más bajo el valor entre dos muestras, mayor es la similitud entre ellas. Una de las maneras en que se puede visualizar la estimación de la matriz de distancias de disimilitud es mediante un agrupamiento jerarquizado, el cual desplegará como resultado un dendrograma en el cual se agruparán las muestras en ramas o clados acorde a la similitud de las muestras comparadas. Este análisis de agrupamiento se puede extender, tomando como base de los cálculos a la matriz de distancias de similitud estimada previamente, a análisis de coordenadas principales (PCoA), escalamiento multidimensional (NMDS), de correspondencia restringida (CCA) y redundancia basada en distancias (dbRDA), para la representación gráfica para la estimación de los agrupamientos de las muestras en dos o en tres dimensiones. También, se pueden llevar a cabo análisis de agrupamientos independientes de la estimación de la matriz de distancias de disimilitud, los cuales son: análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de agrupamiento bidimensional no supervisado. El soporte estadístico de los agrupamientos de las muestras se lleva a cabo mediante los análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) y/o de los análisis de similitud (ANOSIM), tomando en cuenta el o los factores que están influyendo en el agrupamiento. Estos factores pueden ser los tratamientos aplicados, ambientales (temperatura, humedad, estación del año), estado de salud, etc. Para la estimación de la matriz de distancia de disimilitud, los análisis de agrupamientos dependientes de esta matriz estimada e independientes, así como para la estimación del PERMANOVA y/o ANOSIM es necesario la utilización de los paquetes `vegan`, `ape`, `ggplot2`, `dplyr` del lenguaje de programación R (Fig. 14.8).

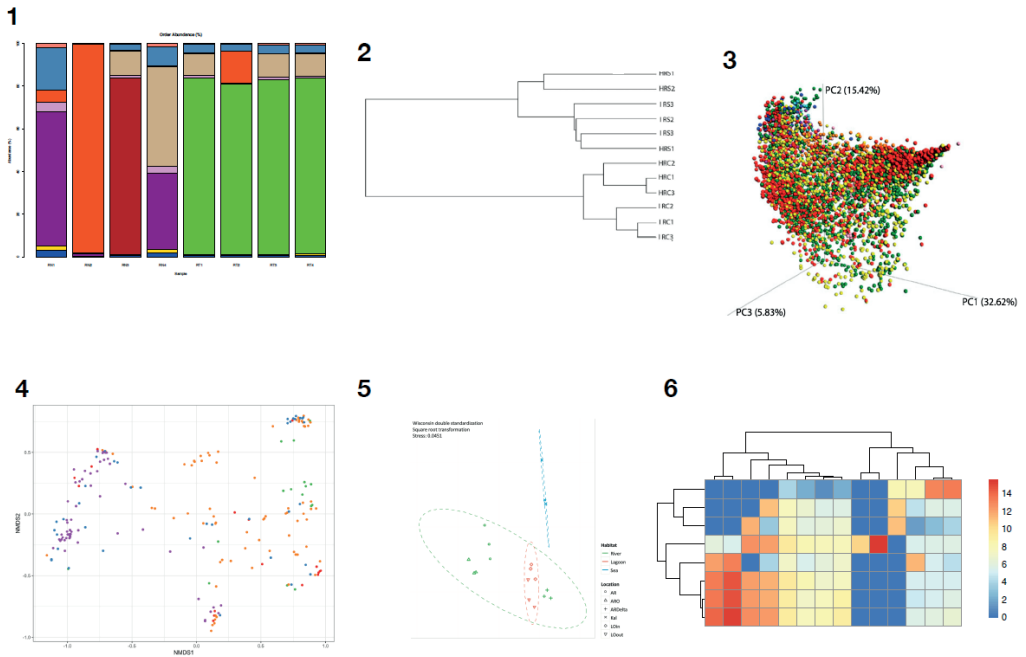


Figura 14.8 Análisis de similitud/disimilitud entre muestras o índices de diversidad beta. 1) Visualización de la estructura de las comunidades bacterianas en las muestras. 2) Dendrograma del análisis de agrupación jerarquizada de muestras. 3) Análisis de componentes principales (PCA). 4.) Análisis de escalamiento multidimensional (NMDS). 5) Análisis de correspondencia restringida (CCA). 6) Análisis de agrupamiento bidimensional no supervisado.

Protocolos

Toma de muestras

La microbiota ha sido analizada por muchos años usando cultivo tradicional y por métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, PCR), los cuales excluyen a un gran número de microorganismos que no pueden ser cultivados fuera de su hospedero. La secuenciación de nueva generación

(NGS) es una herramienta que permite considerables avances en el estudio de la ecología microbiana. En esta tecnología, mantener la integridad de las muestras recolectadas, es un desafío importante en la investigación del microbioma. Desde la recolección de la muestra, la composición del microbioma puede comenzar a cambiar, por esta razón, la congelación a menudo se considera un método estándar de preservación; sin embargo, si la colecta se realiza en ubicaciones remotas, en donde transportar y almacenar en frío resulta costoso, la preservación con compuestos químicos son una opción si se desea evitar el sesgo en el momento de analizar los datos.

Las ventajas de un buen método de preservación de muestras para análisis de la microbiota son: estabilizar la muestra desde el punto de recolección evitando sesgos introducidos por el crecimiento microbiano, homogeneizar las muestras creando una buena reproducibilidad en comparación con muestras frescas o congeladas, un agente conservante que lisa toda la muestra, inactivará los virus y hará segura a la muestra permitiendo que todos los tipos de ADN (bacteriano, fúngico, viral, hospedero) se unirán durante el aislamiento del ADN.

En plantas, el análisis de los perfiles taxonómicos bacterianos ha incrementado drásticamente, la microbiota asociada a raíz y las bacterias endófitas de la planta son las de mayor análisis. Para preservar las muestras de suelo sin que estos presenten efectos en sus perfiles taxonómicos bacterianos; las temperaturas recomendadas son de $4 + 2^{\circ}\text{C}$ para un máximo de tiempo de 3 meses, y de $-20 + 2^{\circ}\text{C}$ para un periodo de tiempo de un año.

Muestras de suelo que no pueden ser preservadas por temperatura pueden ser guardadas con amortiguadores ofrecidos por las diferentes casas comerciales, sin embargo, diversos autores recomiendan analizar la adecuada para cada tipo de muestra por procesar.

Se ha observado un efecto en las comunidades bacterianas al preservar muestras de suelo con LifeGuard de MOBIO comparado con muestras recién colectadas o preservadas en una solución con DMSO-EDTA. Los autores demuestran que el método de conservación por refrigeración presenta perfiles taxonómicos bacterianos similares a las muestras recién colectadas, comprobando ser un método de preservación eficiente.

Protocolo para la toma de muestra para análisis de la microbiota asociada a la rizosfera, rizoplano y endófitas de plantas

Importante: Seleccionar 3 plantas las cuales representan una muestra al realizar la combinación del material colectado de ellas (proceso mencionado como pool). Para los análisis de perfiles taxonómicos se requiere un mínimo de dos muestras por punto de análisis para la validación estadística.

- 1) Para muestras de rizosfera: Tomar la muestra de tierra adherida a la superficie de la raíz que no se sacude fácilmente (aproximadamente 1mm desde la superficie de la raíz hacia dirección del suelo), recolectar con ayuda de un amortiguador de lavado (amortiguador de sales de fosfatos PBS es recomendado) en un tubo falcón de 50 ml y preservar (Fig. 14.1).
- 2) Para muestras de rizoplano: Tomar la raíz y eliminar el excedente de sustrato tierra dejando solo aquella que se encuentra estrictamente pegada a las raíces. Esta tierra se recupera por medio de lavados de la raíz con ayuda de vortex (Fig. 14.1).
- 3) Para muestras de bacterias endófitas: Lavar perfectamente la raíz para eliminar el sustrato de tierra pegado a ella por vortex, preservar la raíz en tubo falcón (ver Barraza *et al.* 2020).
- 4) Preservación de las muestras: Guardar los tubos falcón con las muestras previo al procesamiento de extracción a -20 ° C (Fig. 14.1).

Extracción de ADN

Las muestras de suelo a menudo se consideran como uno de los entornos más desafiante, debido a la diversidad de las especies presentes y la variedad de inhibidores enzimáticos (ácidos húmicos o metales pesados) que pueden ser co-extraídos con el ADN.

El método de extracción de ADN es de importancia para los análisis de taxonomía bacteriana, ya que varios grupos de investigación han observado el impacto que puede tener sobre las comunidades bacterianas. La lisis celular es un paso inicial y crucial en los procesos de extracción de ADN, en los que se incluye disrupción física, química y enzimática. La disrupción física puede aumentar la cantidad de ADN, sin embargo, puede potenciar el corte del ADN genómico en fragmentos pequeños que pueden conducir a productos químé-

ricos en el resultado final de la secuenciación. Los métodos de lisis química y enzimática tienen menos probabilidad de dañar el ADN, pero pueden introducir sesgos al no ser general a todos los organismos blancos en una muestra con una amplia gama de contenido bacteriano.

El método tradicional de extracción de ADN de suelos involucra procesos tales como incubación con enzimas líticas y extracción con fenol/cloroformo. Muchos paquetes comerciales para extracción de ADN han sido desarrollados, los cuales se basan en su mayoría en la extracción directa, siendo los componentes secreto comercial. La purificación de ADN puede causar diferencias en la cantidad y pureza de la muestra. La cantidad y pureza del ADN extraído están relacionadas con la diversidad microbiana, en consecuencia como la diversidad de las secuencias obtenidas refleja la presencia de una especie determinada, debido a que cantidad de ADN no equivale a la diversidad representada. Para evaluar el método de extracción para muestras destinadas a los análisis metagenómicos, se debe considerar la cantidad y calidad del ADN recuperado, la diversidad de las secuencias obtenidas, los índices de diversidad de los datos y la reproducibilidad de los resultados entre replicas.

Teng y colaboradores (2018), analizaron seis métodos de extracción. Los autores observaron que entre los paquetes comerciales no se tienen efectos en la cantidad y calidad del ADN. Interesantemente se observó que fue leve el efecto en la calidad del protocolo de extracción de ADN del fenol-cloroformo. El impacto en la microbiota se vio afectado por el método de extracción evaluado, sin embargo, el método de fenol-cloroformo es reproducible entre replicas y las taxas más representativas son identificadas. Fue a nivel de abundancia relativa en donde los métodos de extracción difieren.

Protocolo para la extracción de ADN genómico para análisis de la microbiota asociada a la rizosfera, rizoplano y endófitas de plantas

- 1) Colectar en un tubo eppendorf de 1.5 mL 500 mg de suelo (rizoplano y rizosfera) o de tejido de raíz (previamente pulverizado con ayuda de nitrógeno líquido). Posteriormente adicionar 1 mL de amortiguador de extracción (SDS 2%, NaCl 1.4 M, Tris 100 mM, y EDTA 20 mM).
- 2) Incubar las muestras por 1 hora a 55 °C. Posteriormente dar un segundo período de incubación a temperatura del cuarto por 72 horas.

- 3) Transcurrido el segundo período de incubación, tomar 1 mL del sobrenadante y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionar 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) pH 8.0, mezclar y centrifugar a 12,000 x g's por 15 minutos.
- 4) Terminada la centrifugación tomar la fase acuosa con ayuda de una micropipeta y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionar 500 µL de isopropanol por 24 horas a 4 °C.
- 5) Transcurrido el tiempo de incubación, realizar una centrifugación a 12,000 x g's por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante. Adicionar 500 µL de alcohol al 70 % (v/v), centrifugar a 12,000 x g's por 10 minutos, descartar el sobrenadante y repetir la operación.
- 6) Concluido el último lavado con etanol, descartar sobrenadante y secar la pastilla para eliminar todo residuo de etanol. Como último paso, re-suspender con amortiguador TE (10:1) o H₂O estéril (grado biología molecular) y guardar a -20 °C.
- 7) Las muestras de ADN total son cuantificadas para determinar la calidad y la cantidad. Para ello, en una nanodrop se cuantifica 1 µL de muestra. Se toma importancia a la lectura con relación de 260/230 y la de 260/280 para determinar la calidad. Para determinar la concentración se toma la lectura de 260.

Secuenciación de Nueva Generación

La secuencia del gen 16S ARNr se utilizó por primera vez en 1985 para análisis filogenéticos, debido a que contiene regiones altamente conservadas para el diseño de oligonucleótidos. Las regiones hiper-variables 16S son para identificar las características filogenéticas de los microorganismos, convirtiéndose en el gen marcador más utilizado para perfilar la comunidad bacteriana. La secuencia completa del gen 16S ARNr consiste de nueve regiones hiper-variables que son separadas por nueve regiones altamente conservadas las cuales fueron nombradas de V1 hasta V9. El análisis de cada región del 16S RNAr dará como resultado una composición distinta de una comunidad microbiana dada. La elección de la región hiper-variable del 16S ARNr para secuenciación es un paso importante. En décadas pasadas, la región V1-V3 fue frecuente en la plataforma 454 (ofrece lecturas de una longitud de un solo extremo hasta de 750 pb). En fechas actuales, la región V3-V4 y la V4-V5 han permitido

una caracterización precisa y rentable de muestras de microbioma, empleado por ello por diversos grupos de investigación, siendo las plataformas MiSeq, NextSeq500 y HiSeq 2500 las más empleadas en la última década.

Se ha observado que la estimación de las comunidades bacterianas empleando los fragmentos de la V3 del 16S ARNr tiene una alta resolución para taxones de rango inferior (especie y genero), siendo una buena región para los análisis de taxonomía bacteriana.

Protocolo para la amplificación y secuenciación de la región V3 del 16S ADNr

- 1) Amplificar la región V3-V4 del 16S ADNr por PCR empleando los oligonucleótidos v3-338f y los v4-806r, como templado se emplea ADN total (Figura 14.9).
- 2) Amplificar la región V3 usando los oligonucleótidos V3-338F y V3-533r con adaptadores de illumina siguiendo las recomendaciones del manual, se emplea como templado el producto de PCR amplificado en la sección 1.
- 3) Cuantificar los productos de PCR resultantes de esta segunda amplificación con el instrumento qubit.
- 4) Generar las lecturas de secuenciación usando la plataforma Illumina MiSeq (2x 150 pb) o MiSeq (2 x 300 pb).

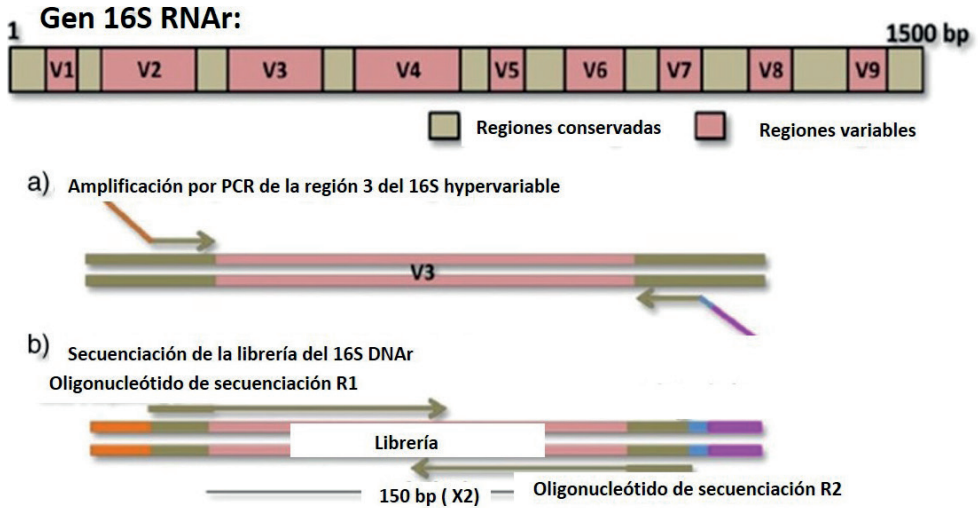


Figura 14.9 Flujo de trabajo del sistema de secuenciación de una librería de 16S ADNr. Tomada y modificada de Ranjith *et al.* (2016).

Análisis bioinformático en MG-Rast

Los primeros pasos en el análisis de cualquier metagenoma implican comparar esas secuencias con secuencias conocidas en bases de datos. Esta tarea intensiva proporciona los tipos de datos básicos para muchos análisis posteriores. Existe un sistema abierto totalmente automatizado para el procesamiento de datos de metagenoma empleando bases de datos ya disponibles. El servidor MG-RAST es un sistema de códigos para la comparativa genómica. Los usuarios pueden cargar datos de secuencias en formato fastq. Las secuencias serán normalizadas y procesadas de forma automática.

Protocolo para el uso de la plataforma del MG-RAST para análisis de secuencias 16S ADNr

- 1) Registrar un usuario en la plataforma: Emplear la página web <http://metagenomics.anl.gov/> para el registro y gestión de usuario, este primer paso tiene dos funciones, limita el acceso a cada conjunto de datos para el usuario y colaboradores y asegura una dirección de correo electrónico válida en caso de que la correspondencia sea requerida. Una vez que inician sesión, los

usuarios pueden ver sus propios metagenomas y los disponibles públicamente. En la plataforma se permite tener los datos confidenciales y pueden ser liberados en el momento que se autorice (Fig. 14.10).

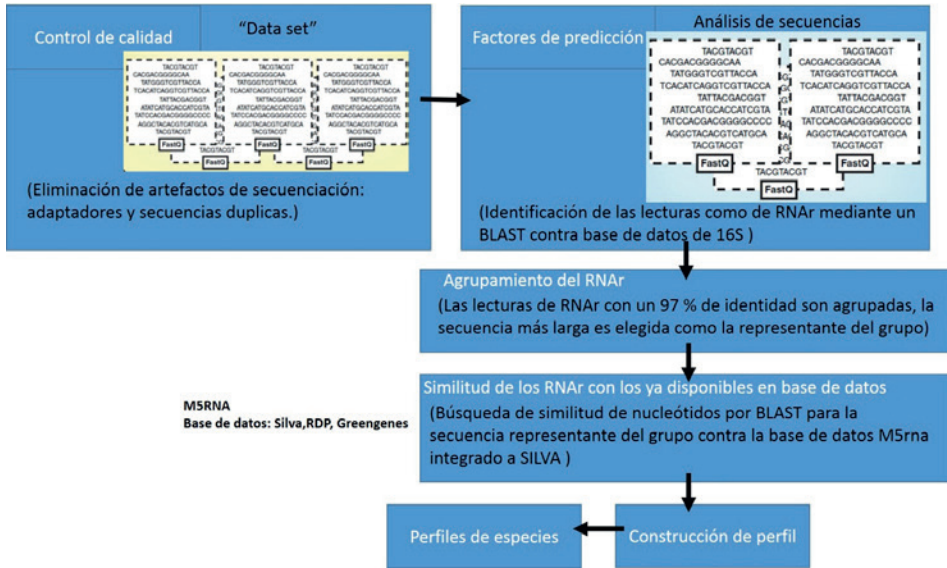


Figura 14.10 Flujo de trabajo desarrollado en la MG-RAST, tomado de Wilke *et al.* (2014).

- 2) Cargar los datos a la plataforma: Los usuarios pueden cargar las lecturas sin ensamblar, sin procesar o como contigs ensamblados. Para ello, acceder a la plataforma del MG-RAST con usuario y contraseña, en la parte superior de la barra se observa un icono de la nube con flecha apuntando arriba, dar click, se despliega una ventana en donde se dan indicaciones de cómo subir los datos en formato fastq en la plataforma. Los datos tienen un tiempo de subida según la demanda de la plataforma. La plataforma permite visualizar el estado del proceso, al concluir se notifica al usuario.

En la plataforma se realiza el “pipeline” o flujo de trabajo de forma automática, el cual implica una curación de la lectura, ensamble, predicción de genes y anotación tanto funcional como taxonómico de los genes resultantes.

Después de cargar los datos, un paso de normalización es ejecutado, generando secuencias únicas y removiendo secuencias duplicadas. En un segundo paso, las secuencias son analizadas en busca de genes codificadores de proteínas a través de BLASTX contra la base de datos “SEED” en el cual se encuentra integrados datos genómicos de una variedad de fuentes como la base de datos de SILVA, RDP entre otros.

- 3) Analizar los datos en la plataforma: Para los análisis en la plataforma se dirige al icono con símbolos de barras, al dar click se despliega una ventana con el título de crear nuevo análisis, se selecciona la base de datos. En las opciones se encuentran RDP, Silva SSU, Silava LSU (para taxonomía bacteriana). Seleccionar Silva SSU y dar click en adicionar. En la parte inferior se selecciona el tipo de secuencia y metagenoma que se analizará mediante el uso del nombre o ID otorgado al momento de haber subido los datos en formato fastq. En el recuadro izquierdo de la parte inferior aparecerán los metagenomas con ID similar, seleccionar el que será sometido al análisis y dar click a la flecha del recuadro céntrico. Posterior a esto se observará que el metagenoma aparecerá en el recuadro derecho. La operación se repite si se quiere analizar varios metagenomas. Concluida la selección dar click a la palomita, para cargar los genomas completos.

En la sección superior derecha aparecerá una ventana con parámetros default, seleccionar el nivel del análisis (Dominio, fila, clase, orden, familia, género u especie), para dar una idea gráfica de la abundancia seleccionar “stacked bar”, seleccionar la normalización de los datos. Los datos pueden ser extraídos de la plataforma, dar click en exportar, seleccionar formato TSV, para la obtención de ellos.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.
ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
SAR: resistencia sistémica adquirida.
ISR: resistencia sistémica inducida.
N: nitrógeno.
Fe: fierro.
IAA: ácido indol-acético.
PRR: receptores de reconocimiento de patrones.
MAMP: patrones moleculares asociados a microbios.
MTI: inmunidad activada por MAMP.
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógeno.
DAMP: patrones moleculares asociados a daños.
ETI: inmunidad activada por efectores.
ABA: ácido abscísico.
SA: ácido salicílico.
JA: ácido jasmónico.
PGPB: bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
VOC: compuestos volátiles orgánicos.
QS: quorum sensing.
AI: autoinductores.
AHL: acil-homoserin lactona.
NGS: secuenciación de nueva generación.
OTUS: unidades taxonómicas operativas.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
QC: control de calidad.
ITS: espaciador transcrito interno.
PcoA: análisis de coordenadas principales.
NMDS: escalamiento multidimensional.
CCA: análisis de correspondencia restringida.
PCA: análisis de componentes principales.
PERMANOVA: análisis de varianza permutacional.

ANOSIM: análisis de similitud.

SDS: dodecilsulfato sódico.

NaCl: cloruro de sodio.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Pb: pares de bases.

SSU: subunidades cortas (16S/18S).

LSU: subunidades largas (23S/28S).

Glosario

Microbioma: comunidad de microorganismos que habitan un lugar determinado, como un ser vivo.

Fitobioma: microbioma específico de plantas.

Rizobioma: microbioma que abarca la raíz y la rizosfera de las plantas.

Rizosfera: zona localizada entre 1-3 mm alrededor de las raíces.

Rizoplano: superficie de la raíz donde se incluyen todos los microorganismos adherida a ella.

Core microbiome: microbioma que es localizado en una especie en particular.

Filosfera: superficie de la parte aérea de las plantas.

Filobioma: microbioma de la filosfera.

Endofítico: parte interna de la planta donde podemos encontrar diferentes microorganismos habitando en ella.

Endosfera: microbioma de la parte endofítica de la planta.

Agradecimientos

Las investigaciones actuales del grupo son apoyadas por CONACYT/México y CIBNOR/México.

Bibliografía

- Barraza, A., Caamal-Chan, M.G., Castellano, T. & Loera-Muro, A. (2020). Bacterial community characterization of plants belonging to *Solanaceae* family cultivated in desert soils. *Annals of Microbiology*, 70, 34.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M. & Smalla, K. (2014). The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in Microbiology*, 5, 491.
- Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Morozov, I.V., Bukin, S.V., Zakharenko, A.S. & Zemskaya, T.I. (2019). Data Descriptor: The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific DATA*, 6, 190007.
- Bushnell, B., Rood, J. & Singer, E. (2017). BBmerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS ONE*, 12(10), e0185056.
- Caamal-Chan, M.G., Loera-Muro, A., Castellanos, T., Aguilar, C.J., Marfil, M.D. & Barraza, A. (2019). Analysis of the bacterial communities and endosymbionts of natural populations of *Bemisia tabaci* in several crop field from Mexico semi-arid zone. *Annals of Microbiology*, 69, 909-922.
- Davis, A., Kohler, C., Alsallaq, R., Hayden, R., Maron, G. & Margolis, E. (2019). Improved yield and accuracy for DNA extraction in microbiome studies with variation in microbial biomass. *BioTechniques*, 66, 285-289.
- de Souza, R., Ambrosini, A. & Passaglia, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38, 401-419.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos, C., Lurie, E., Kumar, N., Bhatnagar, S., Eisen, J.A. & Sundaresan, V. (2014). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 20, E911-E920.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8, 175-185.
- Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequences traces using phred. II. *Genome Research*, 8, 186-194.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S. & Shan, D. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in

- abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4907-4921.
- Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M. & Cotter, P.D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiology*, 16, 123.
- Garrido-Oter, R., Nakano, R.T., Dombrowski, N., Ma, K.W., AgBiome Team, McHardy, A.C. & Schulze-Lefert, P. (2018). Modular traits of the rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. *Cell Host Microbe*, 24, 155-167.e5.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 17-25.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H. & Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1451-1456.
- Jones, J.D.G., Vance, R.E. & Dangl, J.L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, 354, 1117-1125.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Keegan, K.P., Glass, E.M. & Meyer, F. (2016). MG-RAST, a metagenomic service for analysis of microbial community structure and function. In Martin, F. & Uroz, S. (eds) *Microbial Environmental Genomics (MEG)*. *Methods in Molecular Biology*, Vol 1399. Humana press, New York, NY.
- Klammer, S., Mondini, C. & Insam, H. (2005). Microbial community fingerprints of composts stored under different conditions. *Annals of Microbiology*, 55, 299-305.
- Lauber, C.L., Zhou, N., Gordon, J.I., Knight, R., & Firer, N. (2010). Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiology Letters*, 307, 80-86.
- Leach, J.E., Triplett, L.R., Argueso, C.T. & Trivedi, P. (2017). Communication in the phytobiome. *Cell*, 169, 587-596.

- Levy, S.E. & Myers, R.M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 95-115.
- Levy, A., Conway, J.M., Dangel, J.L. & Woyke, T. (2018). Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. *Cell Host Microbe*, 24, 475-485.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. & Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*, 2012, 251364.
- Luo, J., Tao, Q., Wu, K., Li, J., Qian, J., Liang, Y., Yang, X. & Li, T. (2017). Structural and functional variability in root-associated bacterial microbiomes of Cd/Zn hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 7961-7976.
- Mabood, F., Zhou, X. & Smith, D.L. (2014). Microbial signaling and plant growth promotion. *Canadian Journal of Plant Science*, 94, 1051-1063.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: A potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 3315-3335.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilkening, J. & Edwards, R.A. (2008). The metagenomics RAST-serve a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 19, 386.
- Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N. & Dubery, I.A. (2018). The chemistry of plant-microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 112.
- Mutz, K.O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.G. & Stah, F. (2013). Transcriptome Analysis Using Next-Generation Sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 22-30.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. (2014). Vegan: community ecology package. R package version 2.2-0. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>.
- Pausch, J. & Kuzyakov, Y. (2018). Carbon input by roots into the soil: quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology*, 24, 1-12.

- Randle-Boggis, R.J., Helgason, T., Sapp, M. & Ashton, P.D. (2016). Evaluating techniques for metagenome annotation using simulated sequence data. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(7), fiw095.
- Ranjith, M.T., Chellappan, M., Harish, E.R., Girija, D. & Nazeem, P.A. (2016). Bacterial communities associated with the gut of tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner)(*Lepidoptera:Noctuidae*) base on illumina Next-Generation Sequencing. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19, 333-340.
- Rao, R.M., Pasha, S.N. & Sowdhamini, R. (2016). Genome-wide survey and phylogeny of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) enzyme in bacterial genomes. *BMC Genomics*, 17, 742.
- Sasse, J., Martinoia, E. & Northen, T. (2018). Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome?. *Trends in Plant Science*, 23, 25-41.
- Smith, D.L., Subramanian, S., Lamont, J.R. & Bywater-Ekegård, M. (2015). Signaling in the phytomicrobiome: breadth and potential. *Frontiers in Plant Science*, 6, 709.
- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundarsan, V., *et al.* (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, 14, 130.
- Tatangelo, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G. & Ambrosini, R. (2014). Effect of preservation method on the assessment of bacterial community structure in soil and water samples. *FEMS Microbiology Letters*, 356, 32-38.
- Teixeira, P.J.P., Colaianni, N.R., Fitzpatrick, C.R. & Dangl, J.L. (2019). Beyond pathogens: Microbiota interactions with the plant immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 7-17.
- Teng, F., Darveekaran, S.S., Zhu, P., Li, S., Huang, S., Li, X., Xu, J. & Yang, F. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Scientific Reports*, 8, 16321.
- Vetrovsky, T. & Baldrian, P. (2013) The Variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*, 8, e57923.
- Villena, J., Kitazawa, H., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. & Takahashi, H. (2018). Receptors and signaling pathways for recognition of bacteria in

- livestock and crops: prospects for beneficial microbes in healthy growth strategies. *Frontiers in Immunology*, 9, 2223.
- Whiteley, M., Diggle, S.P. & Greenberg, E.P. (2018). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 555, 126.
- Whon, T., Chung, W.H., Lim, M., Song, E.J., Kim, P.S., Hyun, D.W., Shin, N.R., Bae, J.W. & Nam, Y.D. (2018). The effects of sequencing platforms on phylogenetic resolution in 16S rRNA gene profiling of human feces. *Scientific Data*, 5, 180068.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilke, A., Glass, E.M., Bischof, J., Braithwaite, D., Souza, M.D., Gerlach, W., Harrison, T., Keegan, K.P., Matthews, H., Paczian, T., Tang, W., Trimble, W.L., Wilkening, J., Desai, N. & Meyer, F. (2014). MG-RAST Manual for version 3.3.6, revision 7.
- Wilke, A., Bischof, J., Gerlach, W., Glass, E., Harrison, T., Keegan, K.P., Paczian, T., Trimble, W.L., Bagchi, S., Grama, A., Chaterji, S. & Meyer, F. (2016). The MG-RAST metagenomics database and portal in 2015. *Nucleic Acids Research*, 44, 590-594.
- Yang, B., Wang, Y. & Qian, P.Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17, 135.
- Zielinska, S., Radkowski, P., Blendowska, A., Ludwig, A.G., Los, M.J. & Los, M. (2017). The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. *Microbiology Open*, 6(4), e00453.

Capítulo 15

Producción de lípidos en microalgas

Ruth Elena Soria Guerra
Juan Marcos Castro Tapia
*Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí*

Hans Christian Correa Aguado
*Instituto Politécnico Nacional
Unidad Interdisciplinaria de Ingeniería campus Zacatecas
(UPIIZ-IPN), Departamento de Ciencias Básicas*

Resumen

Las microalgas son consideradas como una fuente ideal para la producción sostenible de compuestos fisiológicamente activos tales como lípidos, proteínas y polisacáridos. Su gran capacidad para soportar condiciones ambientales adversas y su alta eficiencia fotosintética, conducen a una elevada productividad de biomasa bajo cortos periodos de tiempo. Adicionalmente, mediante la modificación de las condiciones de cultivo o a través de la ingeniería metabólica, es posible incrementar su biomasa y los metabolitos de interés. Las proteínas y los polisacáridos de la biomasa microalgal, pueden utilizarse de forma sostenible en la industria alimentaria para satisfacer las necesidades dietéticas tanto de humanos como de animales. Asimismo, el alto contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

en algunas microalgas, se puede aprovechar en la industria nutracéutica para facilitar la prevención o el tratamiento de una enfermedad y, en la industria de los biocombustibles, para la elaboración de biodiésel. En este capítulo, se presenta una visión general del efecto producido en las microalgas, por la modificación de las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, intensidad de luz, nutrientes, y uso de reguladores de crecimiento. Además, se describen algunas aplicaciones comerciales de los lípidos producidos por las microalgas.

Introducción

Hoy en día el 80% de la energía primaria proviene del petróleo, carbón y gas natural dejando en menor proporción a las energías renovables; definidas como fuentes prácticamente inagotables con respecto al tiempo de vida de un ser humano y cuyo aprovechamiento es técnicamente viable. Dentro de estos tipos de energías se encuentran: la solar, eólica, hidráulica, geotérmica y la biomasa; esta última se refiere al conjunto de productos energéticos y materias primas originadas a partir de la materia orgánica renovable que puede ser procesada para proveer formas bioenergéticas más elaboradas y adecuadas para el consumo final, de la que se pueden obtener biocombustibles líquidos como el biodiésel y bioetanol.

Existen 3 generaciones de biocombustibles que se pueden obtener a partir de lípidos provenientes de diferentes materias primas. En la primera generación los lípidos son producidos principalmente por cultivos alimenticios y semillas oleaginosas, por ejemplo, palma, colza, soya, girasol, coco, cacahuete, entre otros. El uso de aceites vegetales comestibles requiere del uso de enormes extensiones de tierra fértil y esto conlleva a la falta de alimentos para la población, la deforestación y la escasez de agua. En la segunda generación de biocombustibles, los lípidos se obtienen de plantas lignocelulósicas y desperdicios de cultivos, también con inconvenientes tales como los largos períodos de producción, el rendimiento lipídico restringido (menor al 5% del peso seco total) y la dependencia por las condiciones climáticas.

La sustentabilidad de la industria del biodiésel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas, apareciendo en respuesta a esta necesidad la tercera generación de biocombustibles. La tercera generación esta conformados por microorganismos

mos oleaginosos entre las que se encuentran las microalgas, las cuales son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariontes y eucariontes que se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Fig. 15.1).

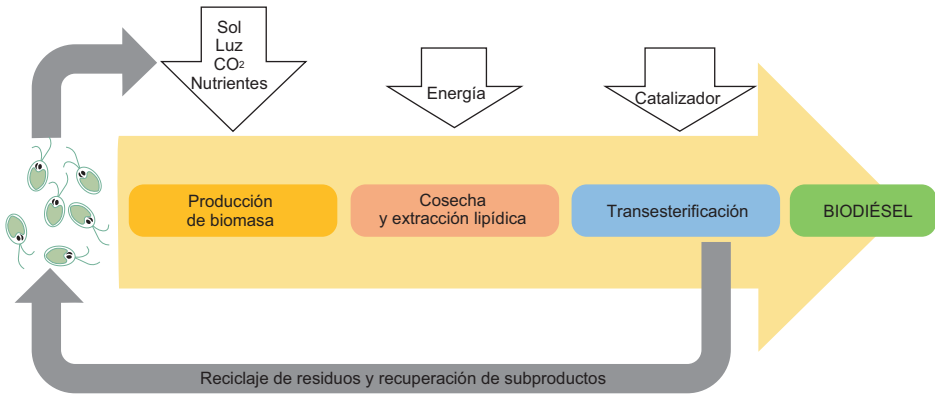


Figura 15.1. Esquema del proceso de producción de biodiésel a partir de microalgas.

Desafortunadamente se ha visto que es poco factible la producción de biodiésel a partir de microalgas, en base a los rendimientos actuales y a modelos económicos de las instalaciones de producción. Además, no todos los lípidos microalgales son satisfactorios para la producción de biodiésel, los apropiados son aquellos ácidos grasos (cadena larga saturados o monoinsaturados) libres y unidos covalentemente a un glicerol, llamados triacilglicéridos (TAGs).

Debido a lo anterior se han buscado estrategias que aumenten el porcentaje de lípidos de reserva. Algunas de estas estrategias consisten en exponer al organismo a diferentes condiciones de estrés fisiológico o químico como pueden ser: Limitación de nutrientes, cambios de pH, modificación en la longitud de onda irradiante, aumento o disminución de temperatura, uso de reguladores de crecimiento, etc. Otras estrategias están basadas en la ingeniería genética; produciendo cepas transgénicas que sobreexpresan enzimas clave en la biosíntesis de lípidos. En este capítulo se describe la biosíntesis de lípidos en microalgas y el fundamento de algunas estrategias utilizadas para incrementar la cantidad de lípidos.

Biosíntesis de lípidos en microalgas

Los lípidos en las microalgas están compuestos de lípidos polares y lípidos neutros. Los lípidos neutros se componen de TAGs formados por tres moléculas de ácidos grasos acopladas a una molécula de glicerol. La producción y acumulación de lípidos en las microalgas depende principalmente de la especie y de su constitución genética, pero también es afectada por diversas condiciones físicas y químicas del cultivo, como lo son la disponibilidad de nutrientes, salinidad, períodos e intensidad de luz, temperatura, pH, entre otros.

Se ha reportado que la composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Los ácidos grasos de 16C (carbonos) a 18C son los más frecuentes, no obstante, moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies. Por lo general, en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, observándose en menor proporción compuestos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés Polyunsaturated Fatty Acids). Estos últimos, ocasionalmente constituyen la mayor fracción de ácidos grasos en especies marinas. La variación del perfil de ácidos grasos entre los diversos grupos algales es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo.

El metabolismo lipídico de las algas es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, como consecuencia de la homología entre secuencias y la similitud de características bioquímicas observadas entre ciertos genes y enzimas de origen vegetal y algal involucrados en la producción de lípidos. En el cloroplasto ocurre la síntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo paso inicial consiste en la carboxilación de acetil-CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa y es considerada el paso limitante del proceso, ya que compromete el flujo de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos, donde las unidades de acetil-CoA probablemente derivan del piruvato proveniente de la glucólisis. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y β -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas (Fig. 15. 2).

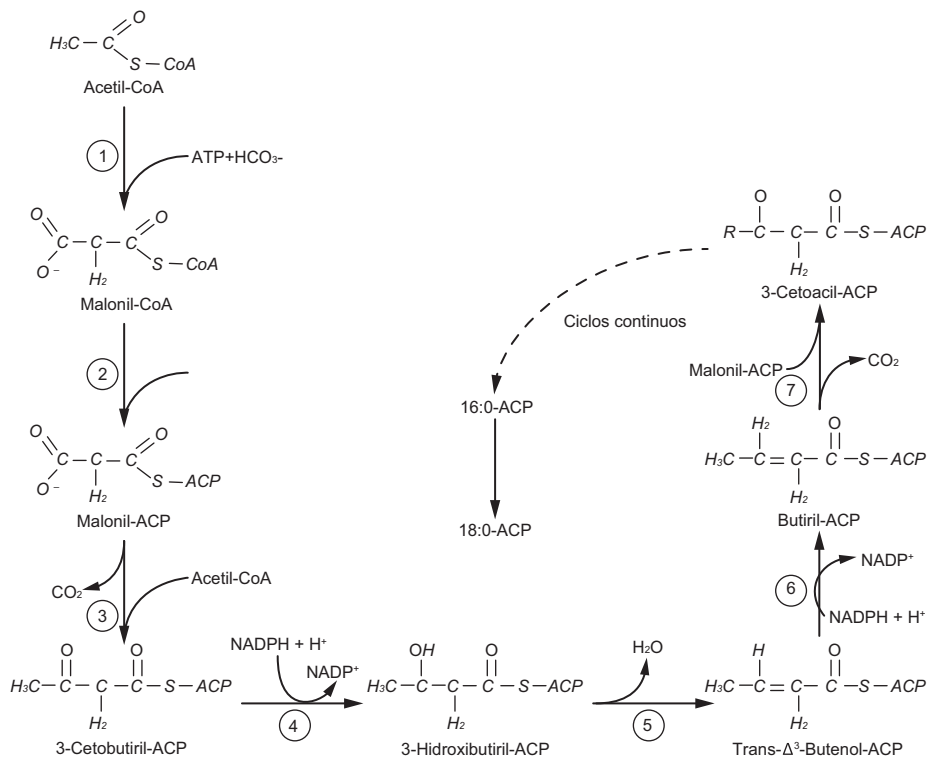


Figura 15. 2. Síntesis de lípidos por microalgas (Adaptado de (Garibay Hernández *et al.*, 2009). *Reacción 1: El Acetil-CoA entra al ciclo como sustrato para la enzima ACCasa y se obtiene el Malonil-CoA. Reacción 2: es catalizada la conversión de Malonil-CoA a Malonil-ACP por la Malonil-CoA: ACP transferasa (el Malonil-CoA es la molécula donadora de carbón en las siguientes reacciones de elongación). Reacción 3: descarboxilación del Malonil-CoA y la condensación con el Acetil-CoA. Reacción 4: reducción del 3-Cetobutiril-ACP por la 3-cetoacil-ACP reductasa. Reacción 5: deshidratación para la obtención de una insaturación en el carbono α por la enzima 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa. Reacción 6: reducción de la doble ligadura por la enoil-ACP reductasa. Reacción 7: ciclo de elongación (repetición del paso 3 al 6) hasta la obtención de ácidos grasos saturados de 16C o 18C o ambos.

El ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1 ω 9) son los precursores de los ácidos grasos poliinsaturados, a su vez producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación (Fig. 15. 3). Por su parte, se sugiere que la biosíntesis de triacilglicéridos en microalgas ocurre en el citosol y en el

retículo endoplásmico, esencialmente a través de la catálisis por acil-transferasas que realizan el traslado secuencial de ácidos grasos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde antes de la última transferencia, se requiere de la desfosforilación del ácido fosfatídico previamente formado, lo cual se ve representado en la Figura 15.4.

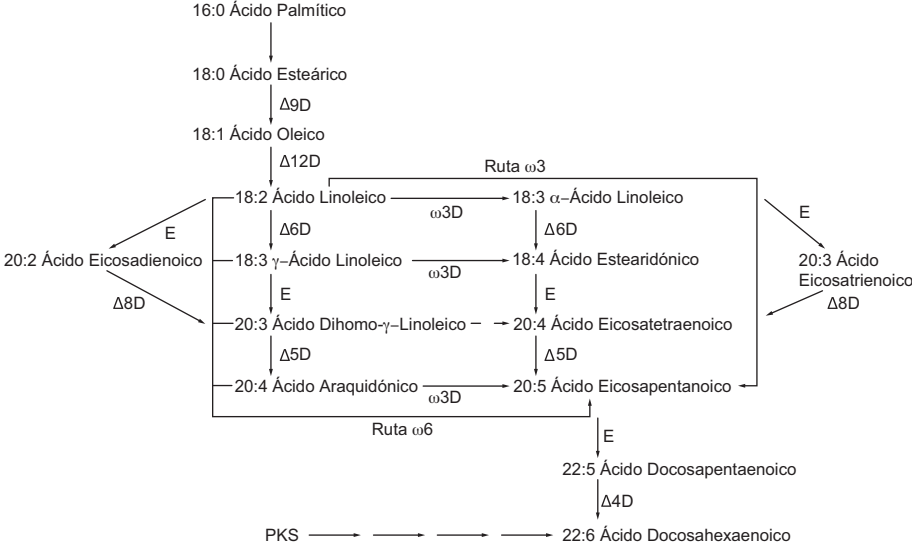


Figura 15.3. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algas eucariotas (Adaptado de Harwood y Guschina, 2009).

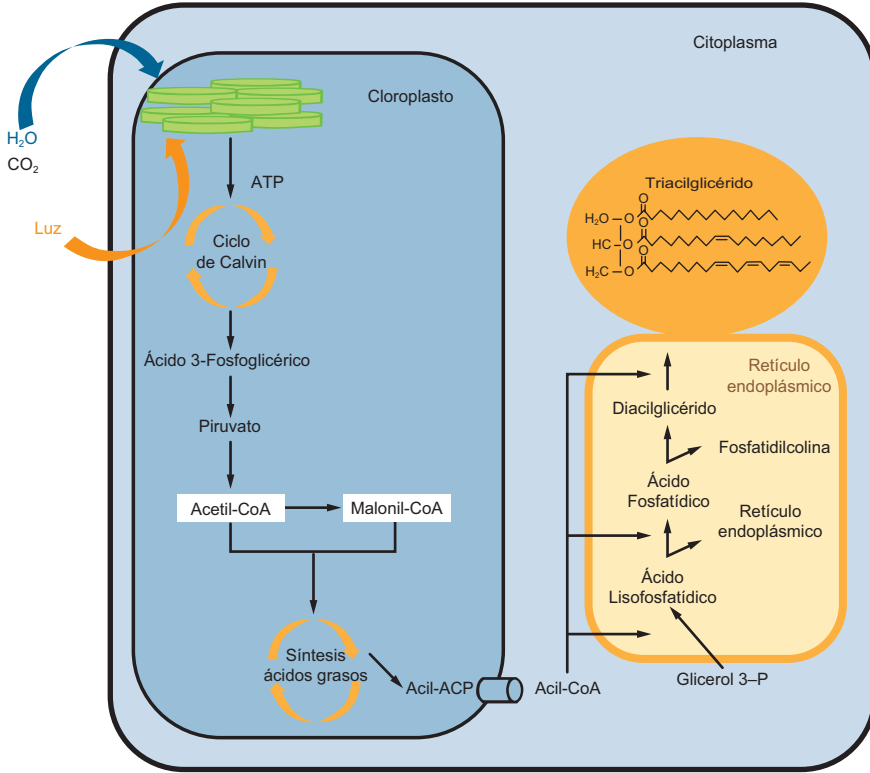


Figura 15.4. Biosíntesis de lípidos. En términos generales, en el sistema fotosintético a partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua con la consecuente formación de protones, electrones y O_2 , los cuales a su vez posibilitan la obtención de los productos fotosintéticos: ATP y NADPH. Estos productos fotosintéticos son el sustrato del Ciclo de Calvin en el cual el CO_2 es fijado en moléculas de 3 átomos de Carbono (3C), las cuales a su vez son asimiladas como carbohidratos, lípidos y proteínas. En el caso particular de los lípidos de microalgas, las moléculas de 3C son transformadas a piruvato y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para la síntesis de *novo* de ácidos grasos (grupos acilo: Acil-ACP). El mecanismo de transporte de ácidos grasos al exterior del citoplasma se desconoce. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde algunos intermediarios son desviados hacia la síntesis de lípidos de membrana (Tomado de Garibay Hernández *et al.*, 2009).

Condiciones para estimular la producción de lípidos

Se han llevado a cabo distintas estrategias para que las microalgas produzcan una mayor cantidad de lípidos, de las cuales la limitación de nitrógeno es considerada como la más eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular la de TAGs conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación.

La adaptación de las microalgas a la limitación de nutrientes se caracteriza por la manifestación de respuestas específicas para el elemento limitado (inducción de sistemas de transporte de alta afinidad y de la síntesis de enzimas hidrolíticas para la liberación intra- o extracelular del nutriente), además de respuestas generales tales como cambios morfológicos, cese de la división celular, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, acumulación de lípidos y/o polisacáridos, reducción de la actividad fotosintética y modificación de procesos metabólicos. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas. Asimismo, la disponibilidad de hierro influye en el contenido oleaginoso, aunque el mecanismo aún se desconoce. Sin embargo, el comportamiento de las microalgas ante la limitación de nutrientes es considerablemente variable y, por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies de microalgas.

La acumulación de lípidos en especies oleaginosas, a pesar de la atenuación de la división celular, es consecuencia de la asimilación continua de carbono y su reorientación metabólica hacia la síntesis activa de ácidos grasos. Los lípidos bajo tales circunstancias funcionan como una reserva de carbono y energía, además de proteger al organismo contra el estrés fotooxidativo.

El pH y la salinidad son otros factores que modifican la síntesis de lípidos de diversas microalgas. Sin embargo, el tipo y cantidad de lípidos producidos también dependen de la especie y de la magnitud del cambio de estas variables. La intensidad luminosa es otra condición que modifica sustancialmente la acumulación de TAGs en las microalgas. Altas intensidades, inducen la producción de ácidos grasos con un elevado perfil de saturación, mientras que intensidades bajas, promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados. A continuación, se detallan las estrategias mencionadas.

Limitación de nutrientes

Las microalgas son capaces de subsistir en condiciones ambientales extremas ya que son capaces de alterar su patrón metabólico para adaptarse a diversos entornos. Macronutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) son componentes esenciales para un correcto funcionamiento del mecanismo celular. Por ejemplo, el nitrógeno (N) es esencial en la producción de lípidos y forma parte de catalizadores e intermediarios del metabolismo primario de las microalgas; se encuentra en aminoácidos, en nucleótidos (incluyendo ADP/ATP y NADP⁺/NADPH), en vitaminas, clorofilas y ficobilinas cromóforas, así como en compuestos involucrados en la remoción de especies oxígeno-reactivas como el glutatión. El fósforo (P) desempeña un papel determinante en el crecimiento y eco-fisiología de las microalgas, es el suministro de energía en reacciones de señalización y es un elemento base para la construcción de ácidos nucleicos y de membranas lipídicas. La presencia de azufre (S) en microalgas es fundamental en compuestos estructurales (cisteína, metionina y sulfolípidos) y funcionales (glutatión, vitaminas y cofactores). Micronutrientes como hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni), magnesio (Mg), calcio (Ca) y potasio (K) son importantes en reacciones redox, ácido-base y en la transmisión y almacenamiento de información y energía dentro de la célula.

La producción de lípidos en microalgas es afectada significativamente por la disponibilidad de nutrientes, cuando se someten a condiciones limitadas de éstos, la división celular decrece, pero la actividad biosintética de lípidos se mantiene e inclusive aumenta en algunas especies. Conforme el crecimiento celular de las microalgas disminuye, la síntesis de compuestos de membrana ya no es requerida y se promueve la conversión de ácidos grasos a TAGs como productos de almacenamiento de carbono y energía, en respuesta a las condiciones de estrés.

Déficit de nitrógeno

La limitación de N conduce a una acumulación de lípidos en diferentes especies de microalgas (Tabla 15.1). Al disminuir la proporción celular, en la membrana del tilacoide, se activa la acil hidrolasa y se estimula la hidrólisis de fosfolípidos; lo cual, en conjunto, aumenta la fracción intracelular de áci-

dos grasos de acil-CoA. Esta deficiencia de N también activa la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), que cataliza la conversión de la acil-CoA a TAG como mecanismo de defensa a las condiciones de estrés.

Diversos estudios han evaluado el efecto de diferentes condiciones de cultivo en microalgas con el propósito de inducir mayores productividades lipídicas. Se ha reportado que la temperatura (variando entre 20 y 30° C) y la concentración de N (entre 7 y 70 mg L⁻¹) afectan la productividad de lípidos y la composición de ácidos grasos en tres cepas de *Chlorella*. En general, se reporta la mayor productividad en cultivos con 3% de N y con temperaturas elevadas.

Tabla 15.1. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de N (N-).

Microalga Cepa/especie	Lípidos obtenidos *N+	Lípidos obtenidos **N-	Referencia
<i>S. rotundus</i>	29.2 ± 1.65 %	41.46 ± 1.94 %	(Dixit <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. abundans</i>	31.4 %	48.12 %	(Rai y Gupta, 2017)
<i>N. salina</i>	33.0 %	56.1 %	(Fakhry y El Maghraby, 2015)
<i>N. oculata</i>	22-29 %	49.7 %	(Millán-Oropeza <i>et al.</i> , 2015)
<i>D. salina</i>	6-25 %	54.15 ± 2.71 %	(Gao <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. vulgaris</i>	18-20 %	53 %	(Mujtaba <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. zofingiensis</i>	27.3 %	54.5 %	(Feng <i>et al.</i> , 2011)

* N+: cultivos de microalgas sin deficiencia de N.

**N-: cultivos de microalgas con deficiencia de N

Después del hidrógeno (H), C y oxígeno (O), el N es uno de los componentes más abundantes en las células fotosintéticas. Las formas más comunes de N inorgánico utilizadas por las microalgas son nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺) y ocasionalmente nitrito (NO₂⁻), aunque es el NO₃⁻ la forma preferida como fuente de N para la mayoría de las microalgas. Estudios en *Scenedesmus rotundus* MG910488 indican que una concentración de 3.5 mM induce el mayor porcentaje de lípidos, alcanzando hasta un 41%, mientras que la menor acumulación de lípidos (29%) se registró con la concentración de 17.6 mM de NaNO₃, mostrando que el estrés por deficiencia de N es una estrategia efectiva para aumentar la producción de lípidos en microalgas.

Déficit de fósforo

El fósforo es un nutriente crucial para todas las formas de vida, su rol principal lo encontramos en los ácidos nucleicos haciendo del fósforo esencial en la expresión y almacenamiento de la información genética. Generalmente, las concentraciones de fosfatos orgánicos en el agua exceden las de los fosfatos inorgánicos, no obstante, el dihidrógeno fosfato (H_2PO_4^-) y el hidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}) son las formas de fósforo que las microalgas absorben más fácilmente.

La limitación de fósforo en microalgas provoca daños en el crecimiento y división celular. La ausencia de fósforo también reduce drásticamente la síntesis de fosfolípidos, lo que promueve la producción de sulfolípidos, lípidos de betaína y glucolípidos sin fósforo, además de la síntesis de TAG. Se ha reportado una acumulación mejorada de lípidos bajo limitación de fósforo en diferentes especies de microalgas (Tabla 15.2). En cultivos de *Chorella* sp. sometidos a bajas concentraciones de fósforo (32 μM), se ha observado un incremento en la productividad y el contenido de lípidos totales.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son ácidos grasos esenciales para el desarrollo de organismos marinos y muy apreciados por su efecto biológico en la salud humana, en esta categoría se encuentran los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3), docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) y araquidónico (AA, 20:4 ω 6) que han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades del corazón, cáncer, artritis, degeneración muscular, etc. La limitación de fósforo es una estrategia que puede ser utilizada para producir PUFAs a escala industrial; esto se ha demostrado en el alga roja *Porphyridium purpureum*, en donde se ha reportado un aumento significativo en la producción de ácidos grasos, aminoácidos y EPA a bajas concentraciones de fósforo.

Tabla 15.2. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de P.

Microalga Cepa/especie	Ausencia/Limitación de P	Lípidos obtenidos	Referencia
<i>Monodus subterraneus</i>	Ausencia	39.3 % de TAGs	(Khozin-Goldberg y Cohen, 2006)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Ausencia	53 % de lípidos totales	(Xin <i>et al.</i> , 2010)

Si bien, la limitación de fósforo en cultivos de diversas cepas de microalgas genera una mayor acumulación de lípidos, también es cierto que en algunas otras cepas el comportamiento es opuesto, un ejemplo de lo anterior se observó en las microalgas *Nannochloris atomus* (Chlorophyceae) y *Tetraselmis* sp. (Prasinophyceae) que disminuyeron su producción de lípidos al someterse a bajas concentraciones de P.

Déficit de azufre

El azufre es uno de los elementos principales de las microalgas, frecuentemente es absorbido y asimilado como sulfato (SO_4^{2-}) que es la forma más abundante de S inorgánico en la naturaleza, aunque también puede asimilarse a partir de fuentes orgánicas en forma de sulfuro (S^{2-}). Desempeña un papel muy importante en la cadena transportadora de electrones, en la biosíntesis de proteínas y en el metabolismo de lípidos.

Se ha demostrado que la deficiencia nutritiva de S afecta el volumen y crecimiento celular en microalgas, sin embargo, la respuesta a esta condición es un aumento en la síntesis de ácidos grasos, pigmentos y carbohidratos. Estudios con cultivos de *C. vulgaris* crecida en medio con S limitado y a pH distintos (5.0-8.0) indican que las variaciones en el pH no afectan significativamente la composición de ácidos grasos, sin embargo, en la deficiencia de S a pH = 7.5, se produce una mayor acumulación de lípidos totales (53%). En cultivos de *Dunalliella salina* privados de S se reportó un incremento en la producción de β -caroteno en más del doble (de 6.7 mg L⁻¹ a 15 mg L⁻¹), comparado con los cultivos en medios suplementados con azufre.

El efecto del aumento en la síntesis de lípidos por limitación o ausencia de azufre puede explicarse, al menos en *Chlamydomonas reinhardtii* por una represión en la síntesis de proteínas y un efecto simultáneo de sobre-expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos y una desviación del flujo metabólico de C hacia la síntesis de TAGs.

Otros ejemplos de la deficiencia o privación de S en cultivos de microalgas con relación a la producción de lípidos se muestran en la Tabla 15.3. Se puede observar que el comportamiento en diversas cepas y especies bajo la deficiencia/ausencia de S es similar en el aspecto de que existe un aumento general en la síntesis de lípidos totales. Esta estrategia, también ha mostrado

ser eficiente, si se pretende obtener una mayor síntesis de carbohidratos importantes para la generación de bioetanol.

Tabla 15.3. Producción de lípidos en microalgas por estrés bajo deficiencia de S.

Microalga Cepa/especie	Ausencia/Limitación de P	Lípidos obtenidos	Referencia
<i>P. kessleri</i>	Ausencia	Incremento en lípidos totales	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2018)
<i>C. vulgaris</i>	Limitación	53.43 ± 3.93 %	(Sakarika y Kornaros, 2017)
<i>C. reinhardtii</i>	Limitación	36.98 %	(Morowvat y Ghasemi, 2016)
<i>Coccomyxa sp.</i>	Limitación	13.0 %	(Ruiz-Domínguez <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. lobophora</i> , y <i>P. kessleri</i>	Limitación	En <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> y <i>C. lobophora</i> los lípidos aumentaron entre 1.5 a 2.4 veces su producción. En <i>P. kessleri</i> el aumento fue de 24.3 a 59.7.	(Mizuno <i>et al.</i> , 2013)

Cambio de temperatura

La temperatura es un factor de estrés que influye en la tasa de crecimiento, la productividad neta de lípidos y los perfiles de ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés, Fatty Acids) en una amplia gama de especies de microalgas. Se ha reportado que se han utilizado temperaturas bajas o altas para modificar el perfil lipídico dependiendo de la especie, de manera general se ha observado que los niveles de insaturación en los FA aumentan a bajas temperaturas, mientras que los FA saturados totales aumentan a altas temperaturas. El nivel de insaturación es alto a bajas temperaturas principalmente debido a la mayor concentración de oxígeno disuelto (OD), que permite que las enzimas dependientes del oxígeno, conocidas como desaturasas ω -3, funcionen apropiadamente.

Se ha reportado que un aumento en la temperatura tiene un efecto positivo en la fotosíntesis y la división celular. Esta tendencia se explica por la mejora de las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de Calvin. Debido al estrés térmico se pueden ver afectadas las funcionalidades de las enzimas (inactivación o desnaturalización) o modificar las proteínas que están involucradas en los procesos fotosintéticos. Las altas temperaturas pueden

causar condiciones de estrés que modifiquen el equilibrio de energía y aumente la producción de radicales libres en exceso. Con el fin de contrarrestar el efecto de estos compuestos dañinos y asegurar el crecimiento, las microalgas son capaces de generar moléculas adicionales con propiedades antioxidantes. Los pigmentos como el β -caroteno, son capaces de contrarrestar la sobreproducción de los radicales libres.

En *Chlorella vulgaris*, una disminución de temperatura de 30 a 25 °C aumenta el contenido de lípidos en 2.5 veces sin afectar la tasa de crecimiento. Una tendencia similar se ha observado en *Scenedesmus sp*, donde una disminución de la temperatura de 25 a 20 °C aumenta el contenido de lípidos en 1.7 veces con un ligero efecto sobre la tasa de crecimiento, mientras que en *Nannochloropsis oculata*, la productividad de lípidos parece no depender de la temperatura.

En las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* también se ha evaluado el efecto de la temperatura en la acumulación de lípidos. Se ha reportado que *S. acutus* acumula una mayor cantidad de lípidos (22%) a una de temperatura de 38 °C, mientras que en la misma temperatura *N. oculata* acumula un 15.7 % de lípidos, por otra parte *C. vulgaris* a una temperatura de 30 °C acumula hasta un 11% de lípidos.

En la Tabla 15.4 se describen algunas especies de microalgas en las que se evaluó el efecto del cambio de temperatura en la composición lipídica, lo que demuestra el interés por conocer la factibilidad de utilizar microalgas para la obtención de lípidos destinados a la producción de biodiésel.

Tabla 15.4. Inducción de lípidos en microalgas utilizando diferentes temperaturas
(Modificado de Sharma *et al.* (2012).

Microalga	Condición de estrés por temperatura	Contenido de lípidos
<i>Rhodomonas sp.</i> <i>Cryptomonas sp.</i> <i>Isochrysis sp.</i>	Rango de 27 °C a 30 °C	Aumento de un 15.5, 12.7 y 21.7 % respectivamente en lípidos totales.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Aumento de 20 °C a 25 °C	Aumento de un 14.92 % de lípidos totales.
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Disminución de temperatura	Incremento de ácidos grasos insaturados.
<i>Nannochloropsis salina</i>	Aumento de temperatura	Aumento de los lípidos totales.
<i>Dunaliella salina</i>	Cambio de 30 °C a 12 °C	Aumento de los lípidos insaturados.

Microalga	Condición de estrés por temperatura	Contenido de lípidos
<i>Ochromonas danica</i>	Aumento de 15 °C a 30 °C	Aumento de los lípidos totales.
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Cambio de 25 °C a 10 °C	Aumento en la cantidad de ácido oleico
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Cambio de 25 °C a 10 °C durante 12 h	Rendimientos más altos de ácidos grasos poliinsaturados y ácido eicosapentaenoico
<i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Botryococcus braunii</i>	Aumento de temperatura	Ácidos grasos saturados aumentados

Intensidad de luz y longitud de onda irradiante

Se ha reportado que el crecimiento de las microalgas bajo diferentes intensidades de luz y longitudes de onda ha dado como resultado cambios en el metabolismo de éstas alterando los perfiles lipídicos. A bajas intensidades de luz se induce a la formación de lípidos anfipáticos particularmente lípidos de membrana asociados con el cloroplasto (fosfolípidos y glucolípidos), sin embargo, el crecimiento es limitado; mientras que a altas intensidades de luz decrece el contenido de estos lípidos anfipáticos con un simultáneo incremento en la cantidad de lípidos neutrales de almacenamiento, principalmente triglicéridos (TAGs), no obstante, esto puede provocar foto-oxidación y foto-inhibición. Para evitar esto, es necesario optimizar la cantidad de luz emitida al cultivo para obtener un crecimiento adecuado y al mismo tiempo provocar la formación de TAGs.

Bajo estrés por alta intensidad de luz, el exceso de electrones de la cadena de transporte fotosintética puede inducir un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno, esto puede causar la inhibición de la fotosíntesis y daño a la membrana. La formación de ácidos grasos de cadena larga como el C18 puede consumir aproximadamente 24 NADPH de la cadena de transporte de electrones, que es el doble requerido para la síntesis de carbohidratos y proteínas, y por lo tanto relaja la cadena de transporte de electrones bajo estas condiciones. Por lo anterior se puede concluir que la producción de TAGs bajo condiciones de alta intensidad de luz se puede deber a un mecanismo de protección para la célula. Los aceptores de electrones utilizados por el proceso de fotosíntesis podrían agotarse y esto llevaría a sintetizar ácidos grasos que

a su vez, se almacenan como TAGs, lo cual potencialmente ayuda a la célula para generar aceptores de electrones. Además, se sabe que la síntesis de TAGs está coordinada junto con la producción de carotenoides en algas. Las moléculas de la vía de los carotenoides como β carotenos, luteína y astaxantina están esterificados con los TAGs y secuestrados dentro de los cuerpos lipídicos. La distribución periférica de los cuerpos lipídicos ricos en carotenoides sirve como protectores para prevenir o reducir un exceso de luz que incide sobre el cloroplasto bajo estrés.

Por otro lado, las microalgas no aprovechan en su totalidad la radiación solar durante la fotosíntesis, sólo es útil el espectro comprendido entre los 400 y 700 nm de longitud de onda denominada “radiación fotosintéticamente activa”, región que representa el 42.3% del total de radiación recibida (Fig. 15. 5). La energía promedio de los fotones comprendidos en este rango es de 218 kJ calculando una eficiencia fotosintética máxima para microalgas de 7.6% respecto a la radiación solar total, valor que es superior al de las plantas C3 (2.4-4.3%) y C4 (1.3-3.7%).

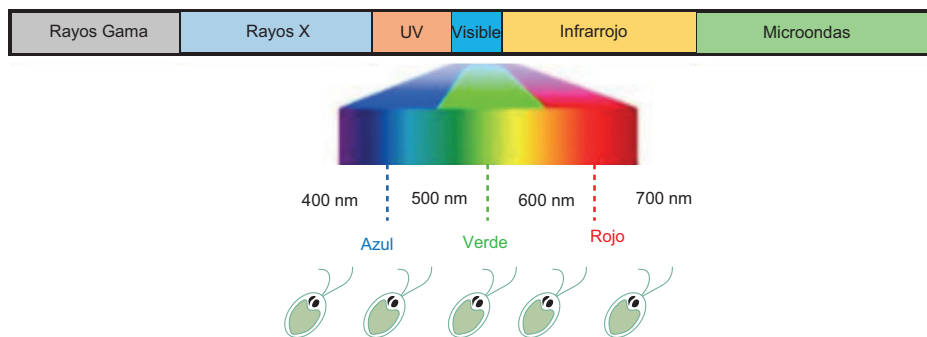


Figura 15. 5. Espectro electromagnético y radiación fotosintéticamente activa para las microalgas.

Se han estudiado diversos tipos de microalgas crecidas bajo diferentes longitudes de onda, entre los que destacan la luz roja (600-700 nm) y azul (400-500 nm), demostrando que la velocidad de crecimiento, el crecimiento celular y el contenido lipídico aumentan; en *Botryococcus braunii* la luz roja a 660 nm muestra una mejor eficiencia en el crecimiento, en la fijación del CO_2 y en la producción de hidrocarburos; bajo estrés por la luz azul (475 nm)

Chlorella vulgaris aumenta su velocidad de crecimiento y la productividad de biomasa en 14 días mientras que la luz roja (650 nm) y verde (510 nm) no fueron favorables. Bajo el crecimiento en luz azul (457 nm) usando lámparas LEDs, las microalgas marinas *Nannochloropsis sp.* y *Tetraselmis sp.* aumentaron su velocidad de crecimiento y su producción de ácidos grasos saturados comparados con el estrés de luz roja (660 nm), roja-azul y luz blanca.

Chlamydomonas reinhardtii contiene clorofila *a* y *b* asociadas a pigmentos, las cuales absorben principalmente en las regiones azul y rojo del espectro. Se conoce la existencia de un receptor de luz azul en *C. reinhardtii* que controla la producción de algunas enzimas esenciales que desencadenan varias etapas en la reproducción y en la formación de gametos. Esto ha sugerido que también existe un receptor de luz roja pero no se ha encontrado aún, a pesar de eso se ha encontrado que la luz roja está ligada a genes de regulación y desarrollo, mientras que tiene un papel menor en la formación de gametos. En esta misma microalga se han realizado estudios para conocer el efecto que tienen la luz roja y azul en el crecimiento, usando un sistema con láser individual y combinado a 655 nm (rojo), 680 nm (rojo), 655 nm + 474 nm (rojo-azul) y 680 nm + 474 nm (rojo-azul); se ha demostrado que el crecimiento y la división celular no son favorecidas bajo estas longitudes de onda específicas y solo se logró un incremento en la velocidad de crecimiento y de división celular bajo una combinación de luz roja y azul. De la misma manera, se ha estudiado el potencial de *C. reinhardtii* para acumular lípidos bajo luz blanca (400-700 nm), roja (650 nm) y verde (550 nm), encontrándose que la luz roja muestra un efecto positivo en el crecimiento de la microalga, el contenido de clorofila y en la cantidad de lípidos en comparación con los cultivos crecidos bajo luz blanca y verde.

Algunos procesos implicados en el crecimiento de la microalga son afectados por la intensidad de luz como la fotoadaptación y fotoaclimatación los cuales conducen a cambios en las propiedades celulares de acuerdo con la disponibilidad de la luz y al aumento en la eficiencia fotosintética. La adaptación puede ocurrir a través de múltiples mecanismos como cambios en los tipos y cantidades de pigmentos, tasa de crecimiento, tasa de respiración oscura o la disponibilidad de ácidos grasos esenciales. La fotoaclimatación morfológica está acompañada por cambios en el número y volumen celular, así como en la densidad de las membranas tilacoideas. Estos resultados evidencian que no todas las especies de microalgas presentan el mismo comportamiento, ya que

además de la intensidad y longitud de onda, existen otros factores que pueden afectar los resultados.

Cambio de pH

Durante el crecimiento de microalgas, el pH del medio juega un papel importante ya que puede cambiar no solo la distribución de las especies de dióxido de carbono (Fig. 15. 6), sino también la disponibilidad de los metales traza y nutrientes esenciales para su crecimiento, así como la producción de clorofila. Se ha reportado que *C. reinhardtii* requiere un pH citosólico entre 7 y 7.5 para que sus orgánulos y otros procesos internos funcionen apropiadamente. Para mantener este pH citosólico, las proteínas de membrana utilizan ATP para evitar que en el entorno externo se genere un gradiente de H^+ y este pueda ser internalizado a la célula. Bajo condiciones ácidas externas se consume ATP adicional para mantener el pH citosólico de 7; por lo tanto, *C. reinhardtii* es energéticamente menos eficiente en ambientes ácidos. A medida que se agota el ATP, hay menos energía para el crecimiento y la reproducción celular.

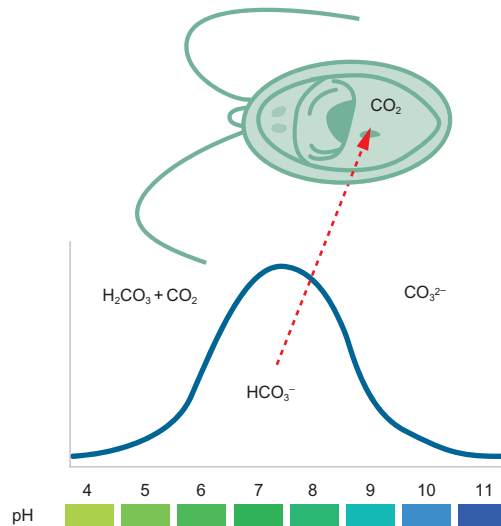


Figura 15. 6. Distribución del carbono por efecto del pH en *Chlamydomonas reinhardtii*. AC: Anhidrasa carbónica.

Se ha reportado que la acumulación de lípidos se maximiza cuando las células de *C. reinhardtii* están estresadas por cambios de pH, aunque su crecimiento es más lento, el almacenamiento de energía en forma de TAGs es mayor. En *C. reinhardtii* se ha evaluado el contenido de clorofila y de lípidos totales bajo pH diferentes (7, 7.8 y 8.5). A pH de 7.8 se ha observado un incremento en el crecimiento celular y una acumulación significativa de clorofila respecto al cultivo crecido a pH de 7.0 (control), mientras que a pH de 8.5 se registró una fuerte disminución en ambos parámetros en comparación con los otros valores de pH analizados. Con relación a los lípidos, el contenido aumento 3 y 2.3 veces más a pH 7.8 y 8.5, respectivamente, en comparación con el cultivo a pH 7. Los resultados sugieren que para *C. reinhardtii*, un pH de 7.8 podría ser el óptimo para maximizar el crecimiento y la acumulación de lípidos.

Resultados similares se han observado utilizando otras microalgas, por ejemplo, en *Nannochloropsis salina* también se ha estudiado la influencia del pH en el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. De los valores de pH analizados (5, 6, 7, 8, 9 y 10) fue a pH 8 en donde se encontró una acumulación máxima de lípidos. Por otro lado, se ha reportado que la relación entre la concentración de nitrógeno y pH influye en la producción de biomasa y lípidos en los cultivos de *Chlorella sp.* y *Dunaliella salina*. En este estudio se reportó que *Chlorella sp.* crece mejor a pH 7.5 con una concentración inicial de nitrógeno de 0.1 mg L^{-1} , mientras que *Dunaliella salina* presentó mayor crecimiento a pH 8.5 sin afectar la concentración de nitrógeno utilizada.

De la misma manera, *Chlorella vulgaris* se ha crecido en cultivos bajo limitación de azufre a diferentes pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.5 y 11.0), los resultados indicaron que esta microalga es capaz de crecer a pH de 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 alcanzando la máxima productividad de biomasa a pH superior a 7; sin embargo, el cultivo a pH 7.5 alcanzó la mayor acumulación de lípidos (53%) mientras que a pH 8.0 el contenido de lípidos se redujo a 33%, se ha indicado también que la composición de ácidos grasos no está relacionada con el pH.

De la misma manera, la microalga *Scenedesmus abundans* fue crecida a 5 pH diferentes (5, 6, 7, 8 y 9) y 4 concentraciones iniciales de fosfato. A pH 8 se registró la mayor productividad de biomasa y de lípidos (26%), mientras que a pH 5 se redujo el contenido a 12%. Aunque el fosfato no mostró un efecto significativo en el crecimiento de la microalga, si causó una alteración en el perfil de FA. Estos estudios permiten comprender que incluso cuando se mo-

difican los mismos parámetros de crecimiento en un cultivo de microalgas, no se puede predecir un comportamiento general.

Uso de reguladores de crecimiento

Tradicionalmente, las hormonas vegetales y los reguladores sintéticos del crecimiento de las plantas se han considerado herramientas valiosas para dilucidar las respuestas fisiológicas de las plantas a los cambios ambientales. Además, su uso puede extenderse al campo de la producción de algas o microalgas para mejorar la viabilidad potencial de las aplicaciones comerciales de la producción de biomasa renovable. Puede ser posible reducir los costos de producción por tonelada de biomasa producida, aumentando así la rentabilidad de las industrias que producen algas para biocombustibles. Varios reguladores del crecimiento vegetal (RCs) tales como el ácido salicílico (SA), ácido 1-naftalenacético (NAA), giberelina A3 (GA_3), el ácido jasmónico (JA), entre otros, han sido investigados por sus efectos sobre el crecimiento de las microalgas en la última década.

Las auxinas desempeñan un papel versátil en el crecimiento y en el metabolismo de las microalgas; incluso concentraciones muy pequeñas de auxinas pueden estimular el crecimiento, la producción de biomasa y la biosíntesis de biomoléculas. Se han identificado diversas concentraciones de ácido indolacético (AIA) o sus derivados en extractos de microalgas y sobrenadantes, que presentan efectos estimulantes e inhibidores sobre el crecimiento y el metabolismo de microalgas. Se plantea la hipótesis de que las auxinas pueden promover el crecimiento al estimular la actividad fotosintética al incrementar el contenido de clorofila y activar los sistemas redox celulares.

Las citoquininas (CK) son derivados de adenina y adenosina, descubiertos a mediados del siglo XX. El tipo *cis*-zeatina es la citoquinina predominante en las microalgas. También se ha descubierto que las CK desempeñan un papel clave en los procesos biológicos de las microalgas, incluida la inducción de la división celular, la estimulación de los procesos de crecimiento y el aumento de la actividad fotosintética. En condiciones adversas, las CK de microalgas tienen un efecto protector sobre las actividades fisiológicas, especialmente la fotosíntesis.

El ácido acetilsalicílico fue sintetizado a partir del ácido salicílico; el ácido salicílico (SA) es un miembro de una clase de pequeñas moléculas fenólicas en

plantas que se definieron como un anillo aromático sustituido con un grupo hidroxilo o sus derivados. Se ha especulado que algunos ácidos fenólicos funcionan como reguladores del crecimiento cuando se aplican a las microalgas.

En *C. vulgaris* FACHB-9 se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de ocho reguladores de crecimiento (RCs): (SA, NAA, GA₃, 6-bencil aminopurina (6-BA), 2,4 epibrasinólido (EBR), ácido abscísico (ABA), etefón (ETH) y espermidina (SPD) en la acumulación de lípidos, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y carotenoides en la microalga, también se evaluó la expresión transcripcional de algunos genes implicados en la síntesis de FA con la finalidad de comprender el mecanismo molecular de la bioacumulación de lípidos. Los resultados indicaron que los RCs son útiles para inducir la acumulación de lípidos en esta microalga, además de proteínas solubles, carotenoides y PUFAs. Se encontró también que ABA es el RC más efectivo para aumentar el contenido total de lípidos y la productividad de estos hasta en 3 y 2 veces más respectivamente, en comparación con los controles. Los tratamientos con 6-BA, NAA, ABA y ETH provocaron que las células de *C. vulgaris* acumularan PUFAs, especialmente Ácido Linoleico (LNA), Ácido docosahexaenoico (DHA), Ácido araquidónico (ARA) y Ácido eicosapentaenoico (EPA). Similar a los lípidos, la acumulación de carotenoides también se indujo en las células de *C. vulgaris* con todos los RCs utilizados, excepto el ABA. Por el contrario, solo el SA fue efectiva para inducir la acumulación de proteínas.

En la Tabla 15.5 se resumen los efectos de los reguladores en el crecimiento y los bioproductos que se obtienen de las distintas microalgas evaluadas.

Tabla 15.5. Efectos de los reguladores de crecimiento en microalgas
(Modificado de Han *et al.*, 2018)

Regulador de crecimiento	Microalga	Efecto
Ácido Indolacético	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Aumento en el crecimiento celular, producción de biomasa, biosíntesis de pigmentos (clorofila a y carotenoides totales) y en la biosíntesis de ácidos grasos.
Ácido Indolacético	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Aumento el crecimiento 1.9 veces respecto al control, aumento de ácidos grasos (ácidos palmítico, oleico, linoleico y α -linolénico).
Ácido Abscísico	<i>Chlorella saccharophila</i>	Aumento de lípidos, principalmente de triacilglicéridos.
Bencil- aminopurina y Kinetina	<i>Chlorella protothecoides</i>	Aumento en la producción de biomasa y la síntesis de lípidos (particularmente ácido α -Linoleico).
Ácido Giberélico (GA3)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Aumento en el crecimiento celular, aumento en el contenido y la productividad lipídica.
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Mejora en la productividad lipídica de hasta 7 veces más respecto al control.
Etefón	<i>Chlorella vulgaris</i>	Incremento en la acumulación de ácidos grasos saturados, α -tocoferol, ácido g-aminobutírico, asparagina, prolina

Sobreexpresión de genes y factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de lípidos

Las estrategias basadas en ingeniería genética proponen la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas clave en la síntesis de ácidos grasos y TAGs; como por ejemplo la sobreexpresión de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que cataliza la primera reacción limitante en la biosíntesis de ácidos grasos al transformar el acetil-CoA en malonil-CoA (Fig. 15. 7). Sin embargo, este enfoque no ha tenido mucho éxito en el aumento de las reservas de lípidos ya que el aumento o disminución de la expresión de estas enzimas parece provocar “cuellos de botella” en otros pasos de la ruta. Esta estrategia aún se encuentra en estudio a fin de lograr identificar las enzimas clave para aumentar estas reservas de energía, descifrando los transcriptomas de las cepas ante distintas condiciones de estrés. Sin embargo, existen reportes en los cuales se

ha demostrado que la sobreexpresión de las isoformas de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) tipo 2 inducen un aumento en la cantidad de ácidos grasos formando gotas lipídicas en el citoplasma cuando la microalga se somete a estrés. La DGAT forma parte de la familia de aciltransferasas y juega un papel importante en el metabolismo de los glicerolípidos al participar en la fase final de la síntesis de triglicéridos (Fig. 15. 7).

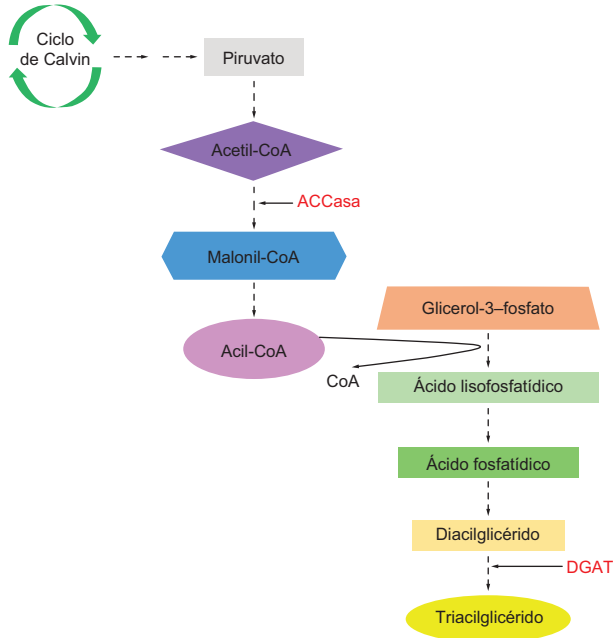


Figura 15. 7. Biosíntesis de lípidos en microalgas. ACCasa: acetil-CoA carboxilasa; DGAT: diacilglicerol aciltransferasa.

La microalga *C. reinhardtii* se ha transformado via nuclear sobreexpresando dos isoformas de la enzima DGAT2; de acuerdo a los resultados, las cepas transgénicas obtenidas acumulan una mayor cantidad de lípidos, de manera particular, la cepa sobreexpresante de la isoforma 3 duplicó la cantidad de lípidos respecto a la cepa sin transformar. Resultado similar se ha reportado para la misma microalga, pero transformada con el gen DGAT de *Brassica napus*, al igual que el caso anterior, las cepas transgénicas presentaron un aumento del doble en los lípidos neutros totales comparados con la cepa no modificada.

Sin embargo, se ha sugerido en los últimos años que la regulación de las vías metabólicas debe estudiarse en el contexto de toda la célula y no en un solo paso de la ruta metabólica. En este sentido, los factores de transcripción (TFs) pueden regular la expresión o la actividad de varias enzimas relacionadas con los productos deseados. Estos pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, reclutando a otros factores o uniéndose directamente a la ARN polimerasa. Este enfoque es más prometedor ya que no solo se afecta a una de las proteínas o enzimas, sino a todo el conjunto de proteínas de la ruta metabólica evitando así los “cuellos de botella”. Las investigaciones más recientes se enfocan en la búsqueda de TFs que regulan la biosíntesis de lípidos en microalgas. En años anteriores se han descubierto en plantas los factores de transcripción tipo-Dof (DNA-binding-with-one-finger), los cuales están implicados en la ruta de biosíntesis de lípidos en semillas de soya. De manera particular, los genes *GmDof4* y *GmDof11* aumentan la cantidad de lípidos totales en semillas de *Arabidopsis* transgénicas y aumentan la expresión de genes que están asociados con la biosíntesis de ácidos grasos. Este factor de transcripción también se ha encontrado en otros organismos incluyendo *C. reinhardtii*.

La cepa de *C. reinhardtii* ha sido modificada para sobreexpresar el gen *GmDof11* que codifica para el factor de transcripción tipo Dof. Los resultados indicaron una mayor cantidad de lípidos en las cepas recombinantes respecto a la cepa no transformada. También se reportó que la sobreexpresión del TF Dof incrementó la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y glicerolípidos. Estas mismas transformantes se sometieron a estrés por inanición de nitrógeno y azufre, ya que se ha reportado que una combinación de estrategias (por ejemplo, ingeniería genética y déficit de nutrientes) podría incrementar aún más el contenido lipídico. Los resultados demostraron que las cepas sobreexpresantes del TF Dof bajo privación de azufre y nitrógeno acumulan 2.6 y 2.7 veces, respectivamente, en relación a la cepa sin transformar sometida al mismo tipo de estrés nutricional. Es relevante el hecho de que las rutas metabólicas no solo se ven afectadas por el nivel de expresión de los factores de transcripción, sino también por las condiciones de estrés nutricional. Una estrategia basada en cultivar microalgas sobreexpresantes de TFs en un medio con concentraciones optimizadas de nutrientes podría aumentar el rendimiento de la obtención de lípidos.

El método de TFs es una tecnología muy prometedora y es probable que pueda proporcionar el avance necesario que permita la producción rentable

de lípidos de microalgas. Sin embargo, ésta todavía se encuentra en fase inicial y el primer paso importante sería identificar varios TFs que regulan la biosíntesis de lípidos en microalgas. Otra estrategia que puede ser prometedora es la sobreexpresión de más de una enzima clave en la producción de TAGs para mejorar la biosíntesis de lípidos.

Aplicaciones de los lípidos producidos en microalgas

Hoy en día es imperativo que, al satisfacer nuestras necesidades de alimentos, de transporte y de cuidado de la salud, preservemos nuestro medio ambiente, pues es la única manera de vivir saludablemente y garantizar el desarrollo de futuras generaciones. Mitigar la contaminación ambiental y tratar de solucionar el problema de la demanda energética mundial, puede lograrse con el desarrollo y uso de nuevas fuentes renovables de combustibles que sean eficientes y compatibles con la infraestructura actual. Enormes esfuerzos se han dedicado a la búsqueda de combustibles alternativos que suplan en menor o mayor grado el consumo de combustibles fósiles, en este sentido, los metabolitos de las microalgas, y en particular los lípidos, pueden desplazar parcial e incluso totalmente, nuestra dependencia a los combustibles fósiles ya que pueden ser convertidos fácilmente en biodiésel por un proceso de transesterificación. La transesterificación es un proceso catalítico de intercambio de un grupo alcoxi de un éster por un alcohol (aceptor de acilo), esto convierte a los triglicéridos en ésteres alquílicos de ácidos grasos y glicerol (Fig. 15.8). Este proceso también se le conoce también como alcoholisis ya que utiliza alcoholes de cadena corta como el etanol y metanol como aceptores de acilo, siendo este último el más utilizado comercialmente debido a su bajo costo.

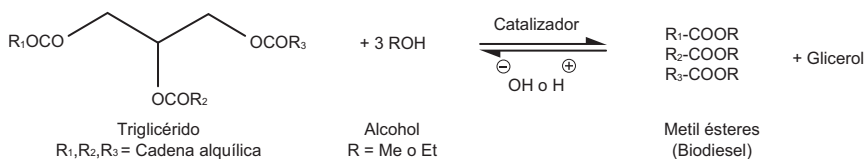


Figura 15.8. Proceso de transesterificación de un aceite (triglicéridos) a biodiésel.

El aceite de microalgas parece ser el único con el potencial para desplazar al diésel convencional. A diferencia de otros cultivos oleaginosos, las microalgas crecen extremadamente rápido y algunas son ricas en aceite (Tabla 15. 6). Una gran cantidad de microalgas duplican su biomasa en tan sólo 24 h y su contenido de aceite puede llegar hasta un 80% en peso de biomasa seca.

Tabla 15.6. Comparación del rendimiento de aceite microalgal con otras materias primas. (Basada en datos publicados por Mata *et al.* (2010).

Microalga Cepa/especie	% aceite en peso de biomasa	Rendimiento de aceite (L / ha /año)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	44	172
Cáñamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	18	636
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070
Higuerilla (<i>ricinus communis</i> L.)	48	1307
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366
Microalgas (contenido bajo de aceite)	30	58,700
Microalgas (contenido medio de aceite)	50	97,800
Microalgas (contenido alto de aceite)	70	136,900

Otra ventaja del diésel obtenido del aceite de microalgas es que es renovable, no tóxico y ecológico; presenta un punto de inflamación más alto, mayor biodegradabilidad, mejor número de cetano y emite menos gases de efecto invernadero respecto al diésel proveniente de fuentes fósiles. Se han investigado nuevas estrategias para disminuir costos de producción y comercialización de este biocombustible, desafortunadamente, el precio de su manufactura por técnicas convencionales sigue siendo muy alto como para desplazar por completo al diésel convencional.

Además del aceite extraído de microalgas que puede ser útil para elaborar el biodiésel, es posible obtener otros bioproductos de interés industrial. Se han

reportado numerosos componentes en las microalgas como son: proteínas, antioxidantes, clorofilas, carotenoides, ácido fólico, polisacáridos, PUFAs, triglicéridos y vitaminas, que se utilizan comercialmente en diferentes sectores industriales (por ejemplo, en alimentos funcionales, nutraceuticos, productos farmacéuticos, cosméticos, acuicultura, etc.). Los PUFAs de las microalgas tienen un mercado biotecnológico muy prometedor, ya que poseen un olor mucho menos desagradable que el aceite de pescado y tienen un menor riesgo de contaminación por metales, esto se aprovecha para darle un valor agregado a la leche y mejorar la nutrición en niños pequeños.

Se ha publicado que algunas aves de corral han sido alimentadas con microalgas como *Nannochloropsis oceánica* para aumentar sus niveles de PUFAs en carne y huevos. También se ha reportado la adición de ácido EPA y DHA a partir *Cryptocodinium cohnii* y *Schizochytrium* en las fórmulas infantiles y en el mercado de alimentos saludables. Otro ejemplo, es el de Nutrinova[®], una empresa alemana que invita a las personas vegetarianas a consumir suplementos con DHA, debido a que los índices en sangre en personas que lo obtienen a través de las plantas es insuficiente. Se ha propuesto que el aceite obtenido a partir de microalgas satisface las necesidades básicas de DHA en vegetarianos. Martek Biosciences Corporation es una empresa que también ha apostado por el aceite de microalgas; a través de una cepa mejorada de *Schizochytrium* obtienen un aceite (rico en DHA y EPA) con un perfil de ácidos grasos que es muy parecido al obtenido por otras fuentes. La empresa Martek[®] ha solicitado la aprobación para su uso en galletas y aceites de cocina (Martek Biosciences Corporation 2011). Thrive[®] es otra empresa que actualmente vende aceite comestible de microalga con un bajo contenido en grasas saturadas (“Thrive[®] culinary oil” 2020).

Con relación a los cosméticos (cremas o lociones), los ácidos grasos cumplen una función importante en la piel, intervienen en la pérdida de agua trans-epidérmica y en la restauración de la barrera de permeabilidad. Se ha reportado también que la astaxantina proveniente de microalgas presenta la propiedad de renovar la piel y es capaz de disminuir las arrugas (patas de gallo), así mismo disminuye el tamaño de manchas por la edad, mejora la elasticidad y textura de la piel y el contenido de humedad de la capa de corneocitos.

Existen también los llamados marinosomas[®] (liposomas basados en extractos de lípidos de microalgas y otros organismos marinos con altas cantidades de PUFAs), éstos están adquiriendo importancia comercial debido a

que proporcionan efectos nutritivos y protectores para la piel. Actualmente, se siguen investigando otras clases de compuestos derivados de microalgas para su aplicación en cosméticos (Tabla 15.7).

Tabla 15.7. Uso potencial de derivados microalgales en cosméticos
(Basada en datos de Mourelle *et al.*, 2017).

Molécula bioactiva	Microalga/cianobacteria	Uso potencial en cosméticos	Referencia
β -carotenos	<i>Dunaliella salina</i>	Antioxidantes	(Hamed, 2016)
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioxidantes y protector solar	(Hamed, 2016; Koller <i>et al.</i> , 2014)
Licopeno	<i>Anabaena vaginicola</i>	Antioxidante Anti-envejecimiento Pantalla solar	(Hashtroudi <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2012)
Escitonemina	Cianobacterias marinas	Pantalla solar	(Takamatsu <i>et al.</i> , 2003)
Vitamina E (α-tocoferol)	<i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>	Antioxidante	(Carballo-Cárdenas <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Reparador de colágeno	(Koller <i>et al.</i> , 2014)
Extractos de microalgas	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> , <i>Phaeodactylum</i> <i>Tricornutum</i> y <i>Chlorella kessleri</i>	Antioxidantes	(Morelli y Scarano, 2004; Sabatini <i>et al.</i> , 2009)

En la industria alimentaria, los carotenoides de microalgas también tienen potenciales aplicaciones. Los carotenoides como el α - y β -caroteno, licopeno, β -criptoxantina, zeaxantina y luteína tienen usos comerciales como colorantes naturales para alimentos. El β -caroteno reúne dos propiedades importantes: es un poderoso antioxidante y a la vez su coloración, que varía desde el rojo hasta el amarillo, por lo cual proporciona color natural a la margarina, queso, pescado, yema de huevo, zanahorias, jitomates, espinacas melones, peras, etc., es por esto que se usa como colorante en frituras, mantequilla para palomitas de maíz, en imitaciones de lácteos, gelatinas, dulces, etc. Una de las principales ventajas del uso de carotenoides en la industria alimentaria es que tienen un impacto positivo en la salud humana, sin embargo, el potencial de las microalgas como fuente de colorante para alimentos sigue siendo limitado debido a

la termo- y foto-inestabilidad de los pigmentos. Aun así, *Dunaliella salina*, se cultiva como fuente de β -caroteno para utilizarlo como precursor de vitamina A, como colorante naranja y como suplemento de vitamina C; la astaxantina obtenida a partir de *Haematococcus* es útil en acuicultura para pigmentar la carne de peces, y para la piel de pollo se han utilizado la luteína, zeaxantina y cantaxantina.

Las microalgas tienen numerosos compuestos lipídicos que están presentes actualmente en nutracéuticos, por ejemplo, vitaminas: A (Retinol), D, y E (Tocoferol). Sin olvidar también a los ácidos grasos AA ($\omega 6$), DHA ($\omega 3$) y el EPA. Microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *D. salina* y *Aphanizomenon flos-aquae* son las cepas más utilizadas para comercializar sus productos. Los ácidos grasos de estas microalgas son excelentes para el cuidado de la salud, son anticancerígenos, tienen actividad antioxidante y propiedades antivirales y antibacterianas, participan en procesos de antiinflamación e inmunomodulación; además, se han observado efectos positivos contra la hiperlipidemia, daño por radiación, diabetes, intoxicación por metales pesados y/o toxicidad inducida por químicos, en reacciones alérgicas y anemia.

El desarrollo de productos a partir de microalgas tiene un gran potencial, su riqueza en metabolitos biológicamente activos es de vital importancia para diversos sectores de la industria y, a medida que la población humana continúe creciendo, estos microorganismos serán clave en la búsqueda desenfrenada de satisfacer la necesidad global de alimentos, energías y nutrición, así como en la mejora y conservación del medio ambiente y de la salud.

Protocolo

En esta sección se describe un protocolo para la cuantificación de lípidos totales, lípidos neutros y saponificación de muestras de microalgas:

Cuantificación de lípidos totales

1. Cosechar la biomasa al final de la cinética de crecimiento mediante centrifugación.
2. Dejar secar las muestras por 1 día a 70 °C dentro de una estufa de secado y se registrar el peso

3. Añadir 10 mL de metanol absoluto para extraer la clorofila de las muestras y agitar vigorosamente.
4. Centrifugar para remover el sobrenadante con la clorofila.
5. Agregar 5 mL de agua destilada y homogenizar por vortex.
6. Sonicar a una amplitud de 60% por 5 s y reposar por otros 5 s, repetir este paso 4 veces.
7. Añadir 10 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v:v), homogenizar por vórtex y reposar por 24 h a -20 °C.
8. Posterior a este tiempo, centrifugar a 4500 rpm por 20 min, transferir la fase orgánica a un nuevo tubo.
9. Añadir 5 mL de NaCl 0.9% (w/v) para crear un sistema bifásico, del cual se recupera la fase inferior, la cual contiene los lípidos totales.
10. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min para facilitar la separación de la fase superior.
11. Para eliminar los residuos acuosos, incubar las muestras a 70 °C dentro de una estufa de secado hasta la evaporación completa y registrar los pesos obtenidos.

Saponificación

Este protocolo describe la saponificación de las muestras para remover los restos de clorofila.

1. Añadir 10 mL de una solución de NaOH al 1% a las muestras (lípidos extraídos) e incubar a 70 °C durante 1 hora.
2. Añadir 10 mL de la mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v), y homogenizar por vortex.
3. Añadir 3 mL de NaCl a 0.9% y agitar vigorosamente para generar 2 fases.
4. La fase superior contiene los productos derivados de la separación de la clorofila.

Este procedimiento permite realizar una saponificación en presencia de NaOH, lo que conlleva a la producción de clorofilina soluble en agua y fitol (los cuales son solubles en fase acuosa y en la fase orgánica (fase inferior) se encuentran los lípidos totales.

5. Retirar la fase acuosa y dejar en incubación la fase inferior a 70 °C para registrar finalmente el peso de los lípidos totales sin clorofila.

Cuantificación de lípidos neutros

El Rojo de Nilo es un colorante fluorescente ampliamente utilizado para la cuantificación de lípidos neutros en microalgas. Usualmente, la intensidad de fluorescencia de las muestras teñidas se correlaciona con el contenido de lípidos neutros utilizando una curva estándar y a partir de esta es posible deducir la concentración de lípidos neutros de las muestras desconocidas interpolando los valores de intensidad de fluorescencia en la curva. Este protocolo describe la cuantificación de lípidos neutros utilizando el colorante Rojo de Nilo (método modificado de Bertozzini *et al.* (2011)).

1. Centrifugar las muestras durante 20 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente.
2. El pellet conseguido se resuspende en 1 mL de medio Bold, para eliminar las impurezas presentes durante el crecimiento celular.
3. Tomar 200 μL y depositarlos en un pocillo de una placa de 96 pozos de fondo oscuro (realizar en ensayo por triplicado).
4. Registrar la lectura de fluorescencia de las muestras utilizando una longitud de onda de Excitación de 525nm y 580–640nm de Emisión.
5. Después de la lectura, añadir 5 μL de Rojo de Nilo (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en isopropanol) y dejar reposar por 5 min.
6. Registrar la lectura de fluorescencia de las muestras utilizando una longitud de onda de Excitación de 525nm y 580–640nm de Emisión.
7. Restar el valor de fluorescencia obtenida después de añadir la solución de Rojo de Nilo al valor obtenido de fluorescencia que emiten las muestras de cultivo por sí mismas (paso 4) para determinar la fluorescencia de los TAGs presentes en las muestras.
8. Haciendo uso de una curva estándar de trioleína, interpolar el resultado de fluorescencia obtenida para conocer la concentración de TAGs.

La trioleína es un triacilglicérido (TAG) monoácido. Son simples o monoácidos si contienen solo un tipo de ácido graso, diácido si contienen dos tipos de ácidos grasos y triácido si son tres grupos acilos diferentes. Las longitudes de cadena de los ácidos grasos en los triacilglicéridos que se producen de forma natural pueden ser de diferentes longitudes y saturaciones, pero 16, 18 y 20 carbonos son los más comunes (Bertozzini *et al.*, 2011).

Para la elaboración de la curva estándar de trioleína en medio basal bold se realizó lo siguiente:

1. En todos los puntos de la curva se añadieron 180 mL de medio basal bold
2. Dado que la concentración final de trioleína es diferente en cada punto de la curva, los volúmenes de trioleína cambiaron en cada punto de acuerdo a lo descrito en la Tabla 8.

Tabla 15.8. Reactivos y volúmenes utilizados para la generación de la curva estándar de trioleína

Concentración [mg/L]	Medio Bold [μL]	Isopropanol [μL]	Trioleína [μL]
0	180	20	0
1	180	19.8	0.2
2	180	19.6	0.4
3	180	19.4	0.6
4	180	19.2	0.8
5	180	19	1
6	180	18.8	1.2
7	180	18.6	1.4
8	180	18.4	1.6
9	180	18.2	1.8
10	180	18	2
15	180	17	3
20	180	16	4

3. Después de preparar la curva, registrar la lectura de fluorescencia de los estándares utilizando una longitud de onda de excitación de 525nm y 580–640nm de emisión.
4. Realizar una regresión lineal para después interpolar en esta curva los valores de fluorescencia de las muestras problema.

Abreviaturas:

%	Por ciento
°C	Grados Celcius
μL	microlitro
6-BA	6-bencilaminopurina
AA	Ácido araquidónico
ABA	Ácido abscísico
AC	Anhidrasa carbónica
ACCasa	Acetil Co-A carboxilasa
ACDP	palmitoil desaturasa
ACP	proteína transportadora de acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AIA	Ácido indolacético
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CK	Citoquininas
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima-A
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DHA	Docosaheptaenoico
Dof	DNA-binding-with-one-finger (por sus siglas en inglés)
EBR	2,4 epibrasinólido
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ETH	Etefón
FA	Ácidos grasos (por sus siglas en inglés, Fatty Acids)
FAD	ácido graso desaturasa
FAS	ácido graso sintasa
FATA	ácido graso acil-ACP tioesterasa
GA ₃	Giberelina A3
GPAT	glicerol-3-fosfato aciltransferasa
h	horas
H ⁺	Ion hidronio
H ₂ PO ₄ ⁻	Dihidrógeno fosfato
HPO ₄ ⁻²	Hidrógeno fosfato

JA Ácido jasmónico
KAS cetoacil ACP sintasa
LNA Ácido Linoleico
LPAAT ácido lisofosfatídico aciltransferasa
LPAT lisofosfatidil aciltransferasa
mg/L miligramos por litro
min minutos
MT malonil transferasa
NAA Ácido 1-naftalenacético
NaCl Cloruro de sodio
NADP⁺ Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato oxidada
NADPH Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato reducida
NaNO₃ Nitrato de sodio
NaOH Hidróxido de sodio
nm nanómetro
p Potencial de hidrógeno
PT palmitoil tioesterasa
PUFAs Ácidos grasos poliinsaturados (por sus siglas en inglés, Polyunsaturated Fatty Acids)
RCs Reguladores del crecimiento vegetal
rpm Revoluciones por minuto
s segundos
SA Ácido salicílico
SAD estearoil ACP desaturasa
SO₄⁻² Sulfato
SPD Espermidina
ST estearoil tioesterasa
TAGs Triacilglicéridos
TFs Factores de transcripción
UV Ultravioleta
v/v Relación volumen: volumen
w/v Relación peso: volumen
WT línea no transformada

Glosario

Ácido graso: Ácido orgánico que se combina con la glicerina para formar las grasas, y que cumple funciones fisiológicas importantes.

Acuicultura: Cultivo de especies acuáticas vegetales y animales.

Alimento funcional: Alimento que, además de su función nutritiva básica, aporta ventajas al organismo.

Aminoácido: Sustancia química orgánica en cuya composición molecular entran un grupo amino y otro carboxilo.

Anfipático: Dicho de una molécula o de una sustancia que tiene propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas.

Anticancerígeno: Perteneciente o relacionado con la prevención o el retraso de la aparición del cáncer.

Antioxidante: Sustancia o producto que evita la oxidación.

Antiviral: Dicho de un medicamento, de una sustancia, de un procedimiento, etc., que se utiliza para combatir los virus.

Auxina: Hormona vegetal que ocasiona el crecimiento de las plantas por elongación celular.

Biodegradable: Dicho de una sustancia que puede ser degradada por acción biológica.

Biomasa: Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Bioproductos: Materiales, productos químicos y energía derivados de recursos biológicos renovables.

Biocombustibles: Combustibles producidos a partir de biomasa, esto es, desechos de organismos vegetales disponibles en el medio ambiente.

Biosíntesis: Síntesis de compuestos orgánicos realizada por seres vivos o *in vitro* mediante enzimas.

Carbohidrato o polisacárido: Sustancia orgánica formada por carbono, hidrógeno y oxígeno, en la que estos dos últimos elementos se encuentran en la proporción de dos a uno.

Caroteno: Pigmento de origen vegetal o animal, de color rojo, anaranjado o amarillo, que se encuentra en el tomate, la zanahoria, la yema de huevo, etc., y que, en los animales, se transforma en vitamina A.

Carotenoide: Semejante al caroteno en estructura y propiedades.

- Catalizador:** Dicho de una sustancia que, en pequeña cantidad, incrementa la velocidad de una reacción química y se recupera sin cambios esenciales al final de la reacción.
- Centrifugar, centrifugación:** Aprovechar la fuerza centrífuga para secar ciertas sustancias o para separar los componentes de una masa o mezcla según sus distintas densidades.
- Cepa:** Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida.
- Citosol:** Región celular comprendida entre la membrana plasmática y el núcleo, con los órganos celulares que contiene.
- Citoquinina o citoquina:** Polipéptido responsable del crecimiento y la diferenciación de distintos tipos de células.
- Clorofila:** Pigmento propio de las plantas verdes y de ciertas bacterias, que interviene activamente en el proceso de la fotosíntesis.
- Clorofilina:** Mezcla semisintética de sales de cobre y sodio derivada de la clorofila.
- Cloroplasto:** Orgánulo de las células vegetales en el que tiene lugar la fotosíntesis.
- Cofactor:** Pequeña molécula necesaria para la actividad de una enzima.
- Configuración *cis-trans* o isomerismo *cis-trans*:** Término utilizado en química que se refiere a la disposición espacial de los átomos dentro de las moléculas. Los prefijos *cis* y *trans* provienen del latín: “del mismo lado” y “del lado opuesto”, respectivamente.
- Cromóforo:** Dicho de un agrupamiento químico que causa la coloración de una sustancia.
- Diatomea:** Alga unicelular, que vive en el mar, en el agua dulce o en la tierra húmeda, y que tiene un caparazón silíceo formado por dos valvas de tamaño desigual.
- Estrés o factor estresante:** Cualquier estímulo, externo o interno (físico, químico, acústico o somático) que, de manera directa o indirecta, propicia la desestabilización en el equilibrio dinámico del organismo.
- Eucarionte o eucariota:** Células que presentan un núcleo diferenciado, protegido por una membrana y con citoplasma organizado.
- Enzima:** Proteína que cataliza específicamente una reacción bioquímica del metabolismo.
- Especie:** Cada uno de los grupos en que se dividen los géneros y que se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en

- común otros caracteres por los cuales se asemejan entre sí y se distinguen de los de las demás especies.
- Factor de transcripción:** proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero.
- Fotosíntesis:** Proceso metabólico específico de ciertas células de los organismos autótrofos, como las plantas verdes, por el que se sintetizan sustancias orgánicas gracias a la clorofila a partir de dióxido de carbono y agua, utilizando como fuente de energía la luz solar.
- Fotón:** Cada una de las partículas que, según la física cuántica, constituyen la luz y, en general, la radiación electromagnética.
- Gameto:** Cada una de las células sexuales, masculina y femenina, que al unirse forman el huevo de las plantas y de los animales.
- Gen:** Secuencia de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios
- Hidrólisis:** Desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.
- Hiperlipemia:** Nivel de lípidos en la sangre superior al normal.
- Ingeniería genética:** Tecnología de la manipulación y transferencia del ADN de unos organismos a otros, que posibilita la creación de nuevas especies, la corrección de defectos génicos y la fabricación de numerosos compuestos útiles.
- Isoforma:** Distintas formas de una misma proteína.
- Lípido:** Cada uno de los compuestos orgánicos que resultan de la esterificación de alcoholes, como la glicerina y el colesterol, con ácidos grasos.
- Longitud de onda:** Distancia entre dos puntos correspondientes a una misma fase en dos ondas consecutivas.
- Macronutriente:** Sustancia esencial para el desarrollo de un organismo, que se debe ingerir en cantidades elevadas.
- Metabolismo:** Conjunto de reacciones químicas que efectúan las células de los seres vivos con el fin de sintetizar o degradar sustancias.
- Metabolito:** Producto del metabolismo.
- Micronutriente:** Sustancia que, en pequeñas cantidades, es esencial para el desarrollo de un organismo.
- Microorganismos fotosintéticos:** Organismos microscópicos capaces de capturar la energía solar y usarla para la producción de compuestos orgánicos.

Número o índice de cetano: Tiempo que transcurre entre la inyección del carburante y el comienzo de su combustión.

Nutracéutico: Producto alimenticio que combina propiedades nutritivas y otras beneficiosas para la salud.

Oleaginoso: Aceitoso.

pH: Medida de acidez o alcalinidad que indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia.

Procarionte o procariota: Organismos que no disponen de un núcleo celular. Su ADN, por lo tanto, se encuentra esparcido a lo largo del citoplasma.

Productividad: Relación entre lo producido y los medios empleados, tales como mano de obra, materiales, energía, etc.

Proteína: Sustancia constitutiva de la materia viva, formada por una o varias cadenas de aminoácidos.

Radicales libres: Átomos o conjuntos de ellos que disponen de un electrón sin aparejar, una condición que les confiere inestabilidad y reactividad

Redox: Dicho de una reacción química que se caracteriza por la oxidación de un reactante y la reducción del otro.

Regulador de crecimiento: Pequeñas sustancias químicas producidas naturalmente por las plantas para regular su crecimiento y desarrollo.

Retículo endoplásmico: Conjunto laberíntico de conductos y espacios membranosos del interior de la célula, con funciones de síntesis y transporte de sustancias.

Saponificar: Transformar en jabón una sustancia grasa combinándola con sosa.

Sobreexpresión: Expresar un determinado gen más de lo normal. Esto significa que se producen más copias de ARNm, lo que generalmente conduce a un aumento en los productos proteicos que el gen codifica.

Sustentabilidad: Proceso que tiene por objetivo encontrar el equilibrio entre el medio ambiente y el uso de los recursos naturales.

Tilacoide: Sacos aplanados que son independientes de la membrana interna del cloroplasto. Sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación.

Transgénico: Dicho de un organismo vivo que ha sido modificado mediante la adición de genes exógenos para lograr nuevas propiedades.

Vitamina: Cada una de las sustancias orgánicas que existen en los alimentos y que, en cantidades pequeñísimas, son necesarias para el perfecto equilibrio de las diferentes funciones vitales.

Bibliografía

- Abdel-Daim, M. M., Farouk, S. M., Madkour, F. F., & Azab, S. S. (2015). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 37(2), 126-139. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.998368>
- Abdelhafez, H. M., & El-Wahsh, A. M. (2019). Hypolipidemic effects of aphazinomenon flos-aquae and slimquick on cardiac muscle fibers of the adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 77(3), 5258-5275. <https://doi.org/10.12816/ejhm.2019.55488>
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*, 131, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.159>
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M. M., & Shiraiwa, Y. (2012). Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 109, 266-270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059>
- Balat, M., & Balat, H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, 87(6), 1815-1835. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.012>
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., & Schaub, T. (2014). pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1431-1437. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>
- Benning, C., Huang, Z. H., & Gage, D. A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(1), 103-111. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1141>
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P. G. (1989). Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25(1), 70-78. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x>
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral

- lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*, 87(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>
- Bishop, W. M., & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(5), e1000147. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665-674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Bochenek, M., Etherington, G. J., Koprivova, A., Mugford, S. T., Bell, T. G., Malin, G., & Kopriva, S. (2013). Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine microalga *Emiliania huxleyi*. *New Phytologist*, 199(3), 650-662. <https://doi.org/10.1111/nph.12303>
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3-15. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). *The Physiology of Microalgae: Vols. 6 BT-Th*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766-776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>
- Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J., & Miller, K. A. (1996). Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*, 32(1), 64-73. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00064.x>
- Capell, T., & Christou, P. (2004). Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.01.009>
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M., & Wijffels, R. H. (2003). Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20(4), 139-147. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00040-6)

- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48(6), 1146-1151. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>
- Czerpak, R., Bajguz, A., Gromek, M., Kozłowska, G., & Nowak, I. (2002). Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(1), 45. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0020-x>
- Das, P., Lei, W., Aziz, S. S., & Obbard, J. P. (2011). Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 102(4), 3883-3887. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>
- Deng, X.-D., Gu, B., Li, Y.-J., Hu, X.-W., Guo, J.-C., & Fei, X.-W. (2012). The roles of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 genes in the biosynthesis of triacylglycerols by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant*, 5(4), 945-947. <https://doi.org/10.1093/mp/sss040>
- Deng, X., Fei, X., & Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), 260-270. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.557>
- Dionisio, M. L., Tsuzuki, M., & Miyachi, S. (1989). Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 30(2), 215-219. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077732>
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., & Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007>

- Dixit, R., Singh, S., & Singh, A. (2020). Effect of nitrogen deficiency on the physiology and biochemical composition of microalga *Scenedesmus rotundus*-MG910488. *Journal of Basic Microbiology*, 60(2), 158-172. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900383>
- Dorval Courchesne, N. M., Parisien, A., Wang, B., & Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, 141(1), 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.018>
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., & Karube, I. (1995). Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, 2, 61-65. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>
- Eid, F., Asmaa A.M., Eldahshan, A. A., & Hamid, S. M. (2018). The possible radio protective role of aphanizomenon Flos-Aquae (AFA) on heart of the adult male albino rats. *The Egypt Journal of Hospital Medicine*, 71(7), 3559-3571. <https://doi.org/10.12816/0047676>
- Elias, P. M. (1981). Lipids and the epidermal permeability barrier. *Archives of Dermatological Research*, 270(1), 95-117. <https://doi.org/10.1007/BF00417155>
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., & Otero, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotchnology*, 20(1), 31-35. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed>
- Fakhry, E. M., & El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40529-015-0085-7>
- Fazal, M. A., Haseeb, A. S.M. A., & Masjuki, H. H. (2013). Investigation of friction and wear characteristics of palm biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 67, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.12.002>
- Fazeli Danesh, A., Ebrahimi, S., Salehi, A., & Parsa, A. (2017). Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.017>
- Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., & Fan, L. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bio-*

- resource Technology*, 102(22), 10577-10584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.109>
- Fredriksson, S., Elwinger, K., & Pickova, J. (2006). Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry*, 99(3), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.018>
- Gao, Y., Yang, M., & Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource Technology*, 147, 484-491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.066>
- Gatrell, S. K., Kim, J., Derksen, T. J., O'Neil, E. V, & Lei, X. G. (2015). Creating ω -3 Fatty-acid-enriched chicken using defatted green microalgal biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9315-9322. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03137>
- Gaytán-Luna, D. E., Ochoa-Alfaro, A. E., Rocha-Uribe, A., Pérez-Martínez, A. S., Alpuche-Solís, Á. G., & Soria-Guerra, R. E. (2016). Effect of green and red light in lipid accumulation and transcriptional profile of genes implicated in lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1404-1411. <https://doi.org/10.1002/btpr.2368>
- Giordano, M., Pezzoni, V., & Hell, R. (2000). Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*; *Plant Physiology*, 124(2), 857-864. <https://doi.org/10.1104/págs.124.2.857>
- Gordon, H. T., Bauernfeind, J. C., & Furia, T. E. (1983). Carotenoids as food colorants. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 18(1), 59-97. <https://doi.org/10.1080/10408398209527357>
- Grossman, A. R., Lohr, M., & Im, C. S. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 119-173. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092328>
- Halperin, S. A., Smith, B., Nolan, C., Shay, J., & Kralovec, J. (2003). Safety and immunoenhancing effect of a *Chlorella*-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, 169(2), 111-117. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874157>
- Hamed, I. (2016). The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1104-1123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>

- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., & Yan, Y. (2018). Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. *Fermentation*, 4(2), 25. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020025>
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., & Mayfield, S. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763-784. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.44>
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>
- Hashtroudi, M. S., Shariatmadari, Z., Riahi, H., & Ghassempour, A. (2013). Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. *Food Chemistry*, 136(3), 1148-1153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.055>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., & Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 435-439. <https://doi.org/10.1023/A:1008175217194>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, K., & Beck, C. F. (2003). Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 6269-6274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931459100>
- Hung, C.-H., Ho, M.-Y., Kanehara, K., & Nakamura, Y. (2013). Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, 587(15), 2364-2370. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.002>
- Ibáñez-Salazar, A., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Uribe, A., Ramírez-Alonso, J. I., Lara-Hernández, I., Hernández-Torres, A., Paz-Maldonado, L. M. T., Silva-Ramírez, A. S., Bañuelos-Hernández, B., Martínez-Salgado, J. L.,

- & Soria-Guerra, R. E. (2014). Over-expression of Dof-type transcription factor increases lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 184, 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.003>
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels, R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193-210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Venkatakrisnan, V., Nagaraj, S., & Rengasamy, R. (2013). *In vitro* anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(2), 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.08.003>
- Khotimchenko, S. V, & Yakovleva, I. M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.024>
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Koničková, R., Vaňková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Muchová, L., Subhanová, I., Zadinová, M., Zelenka, J., Dvořák, A., Kolář, M., Strnad, H., Rimpelová, S., Ruml, T., Wong, R. J., & Vítek, L. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, 13(2), 273-283. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)30891-9](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)30891-9)
- Kumar, V., Bhatnagar, A. K., & Srivastava, J. N. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 7043-7048. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1175>
- Kuriakose, G. C., & Kurup, M. G. (2008). Evaluation of renoprotective effect of *aphanizomenon flos-aquae* on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Renal Failure*, 30(7), 717-725. <https://doi.org/10.1080/08860220802134730>

- Kuwahara, S. S., Cuello, J. L., Myhre, G., & Pau, S. (2011). Growth of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under red and blue lasers. *Optics and Lasers Engineering*, 49(3), 434-438. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2010.11.015>
- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749-756. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1625-9>
- Li, T., Xu, J., Wu, H., Wang, G., Dai, S., Fan, J., He, H., & Xiang, W. (2016). A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Marine Drugs*, 14(9), 162. <https://doi.org/10.3390/md14090162>
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., & Cong, W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella sp.* *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 311-318. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9865-6>
- Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y., Cui, M., Yin, Y., Li, B., Wang, M., Meng, C., & Gao, Z. (2018). Plant growth regulators promote lipid and carotenoid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1549-1561. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1350-9>
- Liu, B., & Zhao, Z. (Kent). (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(8), 775-780. <https://doi.org/10.1002/jctb.1744>
- Liu, J.G., Hou, C.W., Lee, S.Y., Chuang, Y., & Lin, C.C. (2011). Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 46(7), 1405-1410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.010>
- Liu, J., Qiu, W., & Song, Y. (2016). Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Research*, 18, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.027>
- Liu, X.J., Jiang, Y., & Chen, F. (2005). Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochemistry*, 40, 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.018>
- Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>

- Martínez Sancho, M. E., Jiménez Castillo, J. M., & El Yousfi, F. (1997). Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*, 32(8), 657-664. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00017-4)
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672-2685. <https://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
- Mayo, A. W., & Noike, T. (1996). Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds. *Water Research*, 30(2), 447-455. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00150-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00150-6)
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*, 34(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Millán-Oropeza, A., Torres -Bustillos, L. G., & Fernández-Linares, L. (2015). Simultaneous effect of nitrate (NO³⁻) concentration, carbon dioxide (CO₂) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 215-221. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.8>
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A Review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., & Kawano, S. (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*, 129, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>
- Morelli, E., & Scarano, G. (2004). Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, 167(2), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.001>
- Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2016). Rapid determination of lipid accumulation under sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* microalga

- using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Pharmacology and Clinical Research*, 8(9), 1356-1360.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, 279-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
- Ochoa-Alfaro, A. E., Gaytán-Luna, D. E., González-Ortega, O., Zavala-Arias, K. G., Paz-Maldonado, L. M. T., Rocha-Uribe, A., & Soria-Guerra, R. E. (2019). pH effects on the lipid and fatty acids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, 35(6), e2891. <https://doi.org/10.1002/btpr.2891>
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., Molnár, Z., & van Staden, J. (2016). Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal Research*, 16, 141-149.
- Pan, J. M., Haring, M. A., & Beck, C. F. (1997). Characterization of blue light signal transduction chains that control development and maintenance of sexual competence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 115(3), 1241-1249. <https://doi.org/10.1104/pags.115.3.1241>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rai, M. P., & Gupta, S. (2017). Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management*, 141, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.018>
- Ras, M., Steyer, J.P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*, 30(6), 972-979. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobio-

- reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>
- Roesler, K., Shintani, D., Savage, L., Boddupalli, S., & Ohlrogge, J. (1997). Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-Coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology*, 113(1), 75- 81. <https://doi.org/10.1104/págs.113.1.75>
- Ruiz-Domínguez, M. C., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vílchez, C., & Vega, J. M. (2015). Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain onubensis) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1099-1108. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0403-6>
- Rupprecht, J. (2009). From systems biology to fuel—*Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.008>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24(6), 128-130. <https://doi.org/10.1002/lite.201200197>
- Sabatini, S. E., Juárez, Á. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., & Ríos de Molina, M.C. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1200-1206. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.003>
- Sakarika, M., y Kornaros, M. (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219, 694-701. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.033
- Sakarika, M., & Kornaros, M. (2017). Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology*, 243, 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.110>
- Salas-Montantes, C. J., González-Ortega, O., Ochoa-Alfaro, A. E., Camarena-Rangel, R., Paz-Maldonado, L. M. T., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Uribe, A., & Soria-Guerra, R. E. (2018). Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1721-1733. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1393-6>

- Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., & Sato, N. (2014). Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 444. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00444>
- Servel, M.-O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L., & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36(3), 691-693. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8)
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2003). Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(6), 392—399. <http://europepmc.org/abstract/MED/22900366>
- Shaker, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2017). Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, β -carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina*. *Journal of Young Pharmacists*, 9(1), 107-114. <https://doi.org/10.5530/jyp.2017>
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Shen, X.F., Liu, J.J., Chauhan, A. S., Hu, H., Ma, L.L., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2016). Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*, 17, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.018>
- Singh, P., Rani, B., Chauhan, A. K., & Maheshwari, R. (2012). Lycopene's antioxidant activity in cosmetics meadow. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1), 46-47.
- Song, D., Fu, J., & Shi, D. (2008). Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(3), 341-348. [https://doi.org/10.1016/S1872-2075\(08\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2075(08)60016-3)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Su, G., Jiao, K., Li, Z., Guo, X., Chang, J., Ndikubwimana, T., Sun, Y., Zeng, X., Lu, Y., & Lin, L. (2016). Phosphate limitation promotes unsaturated fatty acids and arachidonic acid biosynthesis by microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(7), 1129-1136. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1589-6>

- Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T., & Nagle, D. G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products*, 66(5), 605-608. <https://doi.org/10.1021/np0204038>
- Takeshita, T. (2011). Competitiveness, role, and impact of microalgal biodiesel in the global energy future. *Applied Energy*, 88(10), 3481-3491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.009>
- Tang, G., & Suter, P. M. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Science*, 1(2), 111-118. <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/61173/>
- Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Biore-source Technology*, 162, 38-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.113>
- Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M., & Yamashita, E. (2012). Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1), 43-47. https://doi.org/10.18388/abp.2012_2168
- Vahmani, P., Fredeen, A. H., & Glover, K. E. (2013). Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6660-6670. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6914>
- Vo, T.S., Ngo, D.H., & Kim, S.K. (2012). Marine algae as a potential pharmaceutical source for anti-allergic therapeutics. *Process Biochemistry*, 47(3), 386-394. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.014>
- Wang, H.W., Zhang, B., Hao, Y.J., Huang, J., Tian, A.G., Liao, Y., Zhang, J.S., & Chen, S.Y. (2007). The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 52(4), 716-729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03268.x>
- Weissig, H., & Beck, C. F. (1991). Action spectrum for the light-dependent step in gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 97(1), 118-121. <https://doi.org/10.1104/pags.97.1.118>
- Wijffels, R. H. (2008). Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 26(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.002>

- Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environmental Science*, 3(5), 554-590. <https://doi.org/10.1039/B924978H>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817-1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xin, L., Hong-ying, H., & Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), 3098-3102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>
- Yamazaki, T., Konosu, E., Takeshita, T., Hirata, A., Ota, S., Kazama, Y., Abe, T., & Kawano, S. (2018). Independent regulation of the lipid and starch synthesis pathways by sulfate metabolites in the green microalga *Parachlorella kessleri* under sulfur starvation conditions. *Algal Research*, 36, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.022>
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 7(12), 555-560. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02362-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02362-2)
- Ying, K., Gilmour, D. J., & Zimmerman, W. B. (2014). Effects of CO₂ and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(3), 167-173. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138>
- Yusuf, N. N. A. N., Kamarudin, S. K., & Yaakub, Z. (2011). Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 52(7), 2741-2751. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.12.004>
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., & Cohen, Z. (2002). Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 38(2), 325-331. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01107.x>

Capítulo 16

Ficorremediación

Ruth Elena Soria Guerra
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Resumen

El crecimiento demográfico de las últimas décadas ha dado lugar a un aumento de agua contaminada derivada de diversas actividades antropogénicas; esto ha generado preocupación por la cantidad y calidad de los desechos generados y descargados en cuerpos de agua naturales. En las últimas décadas se han empleado a las microalgas como una alternativa para abordar los desafíos de la calidad del agua. Las microalgas como agentes descontaminantes ofrecen varias ventajas que incluyen bajos costos de producción, fácil manipulación, no son contaminantes y posibilitan la extracción de contaminantes metálicos, fármacos y diversas sales, por lo que no son considerados una fuente de desechos secundarios ya que la biomasa resultante puede ser reutilizada en diversos sistemas de producción tales como avicultura, acuicultura, agricultura, etc., y para la generación de nuevas

fuentes de biocombustible y fertilizantes. En este capítulo se describe la importancia de la ficorremediación y el uso de diversas especies de microalgas para la remoción de metales pesados, fármacos y compuestos fenólicos.

Introducción

La ficorremediación consiste en el uso de micro y macroalgas para remover contaminantes, incluyendo xenobióticos, nutrientes de aguas residuales y el CO_2 proveniente de emisiones. La biorremediación con microalgas es particularmente efectiva debido a su capacidad para convertir la energía luminosa en biomasa y asimilar gran cantidad de nutrientes inorgánicos como fósforo y nitrógeno. Se considera un proceso global en el tratamiento de aguas residuales ya que hay remoción de sales, aumento del pH de los efluentes, eliminación de nitrógeno amoniacal, disminución de la demanda biológica de oxígeno, oxigenación del agua y oxidación continua de materia.

La idea de utilizar microalgas en procesos de biodegradación fue propuesta desde los años cincuenta, desde entonces se planteó la idea de que los organismos fotosintéticos podrían ser útiles para la producción de oxígeno, eliminación de CO_2 y además para el tratamiento de aguas residuales. La ficorremediación presenta diversas ventajas como son: el mejoramiento de la calidad del efluente, el aprovechamiento de nutrientes, la producción de biomasa con interés comercial, la oxigenación del agua, la recuperación de CO_2 y un alto rendimiento en la bioconversión de la energía solar.

Adicionalmente, las microalgas poseen una serie de ventajas sobre otras materias primas entre las cuales se pueden mencionar su mayor eficiencia fotosintética respecto a las plantas superiores, logrando convertir entre el 3 y el 8% de la energía solar en biomasa. Otras características de importancia son:

- Su tasa de crecimiento es elevada, algunas microalgas duplican su biomasa en aproximadamente 24 h.
- Los periodos de cosecha son muy cortos (generalmente menores a 20 días dependiendo del proceso), permitiendo múltiples o continuas cosechas a diferencia de las plantas, que se cosechan una o dos veces por año.
- Son de fácil cultivo, pueden crecer en casi cualquier lugar y sólo requieren de luz solar y algunos nutrientes. Pueden cultivarse en zonas no

aptas para cultivos agrícolas por lo que no compiten con los productos de alimentación humana. También pueden utilizar agua no potable y su cultivo no requiere la adición de herbicidas o pesticidas. Incluso algunas microalgas crecen en ambientes salinos e hipersalinos.

- Son capaces de fijar grandes cantidades de CO_2 , su demanda estequiométrica de CO_2 es de aproximadamente 2kg de CO_2 /kg de biomasa seca, permitiendo acoplar su producción a una corriente de gases de combustión industrial y así, contribuir a la disminución de efecto invernadero.

Desde hace varios años se ha reportado la capacidad de las microalgas para remover metales pesados, fármacos y compuestos fenólicos. En este apartado se describen las especies de microalgas mayormente utilizados en procesos de fitorremediación.

Microalgas utilizadas para la remoción de metales pesados

La actividad industrial y minera arroja al ambiente metales tóxicos como plomo, mercurio, cadmio, arsénico, cromo, entre otros; se consideran elementos contaminantes de la atmósfera por su toxicidad y efectos nocivos sobre los seres vivos. La importancia de sus efectos está en función de la naturaleza del elemento, concentraciones ambientales y el grado de exposición.

Algunos organismos procariontes y eucariontes, entre ellos las microalgas, han desarrollado diversas estrategias para disminuir el efecto tóxico de los metales a formas inocuas. Entre las estrategias que presentan las microalgas se encuentran evitar el paso de los iones a través de la pared celular por medio de secreción de sustancias que producen uniones específicas con los iones metálicos del medio. El resultado de esta estrategia es formar complejos quelados que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimientos específicos en el interior de la célula. Un mecanismo común de detoxificación intracelular en microalgas es la formación de péptidos o proteínas, por ejemplo, malato, citrato o polifosfato, los cuales son algunos de los compuestos reportados como agentes quelantes intracelulares.

El proceso de bioabsorción de metales por microalgas es generalmente un proceso de dos fases que implican una adsorción extracelular (por ejemplo, con polisacáridos y mucílago), además de componentes celulares (con grupos car-

boxy e hidroxilo y sulfatos). Este proceso no metabólico y rápido que ocurre en células vivas y no vivas depende de parámetros como el pH, especies químicas del metal, tipo de alga y la concentración de biomasa. La segunda fase de absorción es la acumulación dentro de la célula, este es un proceso lento que implica transporte activo a través de la membrana y proteínas de unión en sitios intracelulares. Este proceso es dependiente del metabolismo y es inhibido por bajas temperaturas, ausencia de aporte de energía y sólo ocurre en células vivas.

Desde hace varias décadas se ha demostrado que las microalgas pueden acumular diversos metales entre los que se encuentran: cadmio, zinc, arsénico, plomo, mercurio, uranio, cromo, cobre, molibdeno, aluminio y oro.

La emisión global del cadmio hacia el ambiente proviene en su mayor parte de fuentes antropogénicas, estando asociado a la extracción del zinc y a desechos de las industrias de plásticos, pinturas, aleaciones metálicas y otras operaciones industriales. El cadmio ha sido reconocido como un agente peligroso de contaminación ambiental y es acumulado por el fitoplancton. En la literatura del área se menciona que las especies que acumulan cadmio son: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella regularis*, *Scenedesmus bijuga*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas angulosa*, *Scenedesmus choreloides* y *Dictyosphaerium chlorelloides*.

Las fuentes industriales o los reservorios para residuos tóxicos pueden ser la causa del zinc en el agua potable llegando a niveles que causan problemas de salud pública. Se ha reportado que microalgas tales como *Chaetomorpha brychagone*, *Enteromorpha crinita*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus obliquus* acumulan altas concentraciones de zinc proveniente de aguas contaminadas.

Chlorella vulgaris acumula altos niveles de arsénico, así como otros metales, lo cual es debido a que tiene mecanismos de detoxificación por medio de los cuales transforma el metal que está acumulando. Estas microalgas podrían ser utilizadas para controlar las concentraciones de arsénico en aguas naturales y en aguas de desecho industrial. Otros géneros de microalgas de agua dulce (*Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* y *Oscillatoria* sp.) y de agua de mar (*Phaeodactylum* sp. y *Skeletonema* sp.) también son capaces de acumular arsénico.

Algunas microalgas como *Eucheuma striatum*, *Euchena spinosum* y *Stigeoclonium tenue*, *Nannochloropsis salina*, *Spirulina platensis* *Pseudochlorococcum typicum* y *Scenedesmus quadricauda* absorben plomo de forma eficiente. En tanto que las microalgas que acumulan cantidades significati-

vas de mercurio son: *Carteria sp.*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nitzschia closterium*, *Pseudochlorococcum typicum*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.* Se ha reportado que algunas especies de microalgas, entre las que se encuentran *Chlorella regularis*, *Chlamydomonas sp.* y *Scenedesmus sp.* pueden absorber uranio (Sakaguchi, *et al.*, 1978). *Chlamydomonas sp.* aclimatada en altas concentraciones de cromo, muestra una gran habilidad para remover este metal. También, *Chlorella pyrenoidosa*, *Spirulina platensis* y *Scenedesmus obliquus* pueden acumular cromo proveniente de aguas residuales.

Varias especies de microalgas verdes pueden acumular cobre, debido a que presentan tolerancia a este ion metálico tales como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas angulosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus bijuga*, *Scenedesmus almeriensis*, *Scenedesmus obliquus* y *Tetraselmis marina*. Especies como *Scenedesmus chlorelloides*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella regularis*, *Scenedesmus bijuga*, *Chlamydomonas angulosa* y *Scenedesmus obliquus*, han resultado ser eficientes para la acumulación de molibdeno. Alrededor de 15 especies pertenecientes a 6 filo (*Chlorophyceae*, *Cryptophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae* y *Prasinophyceae*) acumulan aluminio del agua de mar artificial. *Chlorella vulgaris* tiene una alta afinidad con el oro, por lo que esta microalga puede acumular tanto oro (I) como oro (III) de soluciones acuosas.

Debido a que las microalgas presentan adaptaciones y mecanismos de tolerancia, pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales tal como se ha descrito, por lo que pueden ofrecer una alternativa o ayuda a las técnicas convencionales para la eliminación y/o recuperación de metales en lugares contaminados.

Microalgas utilizadas para la remoción de fármacos

Además de remover metales pesados, las microalgas han demostrado capacidad para eliminar compuestos emergentes. Los compuestos emergentes incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y los productos de la quimioterapia. La contaminación proviene no sólo de las excreciones, con las que una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos.

Desde principios de los años ochenta, diversos estudios han demostrado que los medicamentos y sus productos de transformación están presentes en el medio acuático en todo el mundo. La mayoría de los desechos de la industria farmacéutica son tratados mediante procesos de oxidación química, pero debido a las peligrosas condiciones de la reacción, la generación de compuestos tóxicos secundarios y los altos costos operacionales hacen que esta clase de tratamientos no resulte la mejor opción. Por el contrario, los tratamientos de biodegradación son alternativas amigables con el ambiente y a bajo costo. Algunos microorganismos poseen sistemas enzimáticos especializados y rutas metabólicas que les permiten utilizar los fármacos como fuente de carbono y convertirlos en sustratos fáciles de metabolizar.

Pocos son los estudios que se han enfocado en la remoción de fármacos por microalgas, por ejemplo, se ha reportado la capacidad de remoción de un estrógeno natural (β -estradiol) y un estrógeno sintético (17 α -etinilestradiol) por las cepas de microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Los resultados muestran que la remoción está directamente relacionada con la producción de biomasa. Las dos cepas mencionadas anteriormente fueron capaces de remover ambos estrógenos en los primeros 7 días alcanzando porcentajes finales de remoción de 88-100% por *S. capricornutum* y de entre 76 y 100% por *C. reinhardtii*.

La remoción de paracetamol y ácido salicílico por la microalga *Chlorella sorokiniana* también ha sido reportada, obteniendo eficiencias de remoción mayores a 67% de paracetamol y 73% de ácido salicílico en cultivo batch. En otro estudio se ha evaluado la remoción de diclofenaco por tres especies de microalgas, obteniendo eficiencias de remoción mayores a 65% en el tratamiento con *Chlorella sorokiniana*, de 69% con *Chlorella vulgaris* y de un 98% con *Scenedesmus obliquus* al final del cultivo batch. La biodegradación del ketoprofeno también se ha evaluado utilizando las cepas de microalgas *Chlorella sp.*, *Spirulina platensis* y *Artemia sp.* La combinación de un consorcio bacteriano definido y *Chlorella sp.* es capaz de degradar ketoprofeno en 7 días bajo un ciclo diurno de 12h de luz / 12h de oscuridad.

La eliminación de micro contaminantes en sistemas de tratamiento de algas alimentado con corrientes de aguas residuales también se ha reportado realizando experimentos en lotes con la microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada en orina, agua negra anaerobiamente tratada y orina sintética, en donde se ha evaluado la eliminación de seis fármacos (diclofenaco, ibuprofeno, para-

cetamol, metoprolol, carbamazepina y trimetoprim). Los resultados indicaron que los tratamientos tales como la biodegradación y la fotólisis conducen a una eliminación entre 60 y 100% de diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y metoprolol, mientras que la extracción de carbamazepina y trimetoprim fue incompleta y no superó el 30% y el 60%, respectivamente. Las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus obliquus* son capaces de remover diclofenaco entre el 59% y 92%, obteniendo el mayor porcentaje de remoción por *S. obliquus* en 25 días.

Aunque el mecanismo de detoxificación de xenobióticos no ha sido descrito en microalgas en detalle, estudios realizados en plantas indican que ocurren procesos similares en ambos organismos fotosintéticos. Así mismo, los resultados obtenidos a la fecha sugieren una aplicación promisoriosa de las microalgas en procesos de biorremediación para la eliminación de fármacos.

Microalgas utilizadas para la remoción de compuestos fenólicos

La presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos en el medio ambiente es el resultado de la actividad antropogénica. Estos compuestos penetran en los ecosistemas mediante el drenaje de aguas residuales municipales o industriales hacia las aguas superficiales.

El fenol se usa como intermediario en la industria química para la síntesis de compuestos más complejos. La toxicidad de los compuestos fenólicos se debe principalmente a su carácter hidrófobo y a su capacidad para formar radicales libres. Muchos microorganismos, entre ellos las microalgas, se han utilizado para la biodegradación de compuestos fenólicos. Varias especies de algas de agua dulce se han utilizado para la biodegradación de fenol y catecol desde hace varias décadas. Desde entonces, se han publicado una gran cantidad de estudios que demuestran que las microalgas son capaces de biodegradar compuestos fenólicos. Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este proceso son variados, por ejemplo, se ha reportado que la microalga verde *Ochromonas danika* biodegrada el fenol a través de la vía de la meta-escisión (meta-cleavage) a partir del catecol, mientras que en las especies de *Chlorella* hay participación del citocromo P450 en la biodegradación de estos compuestos. Además, se han reportado reacciones dependientes de

NADH durante la biodegradación de compuestos fenólicos por la diatomea marina *Thalassiosira sp.*

Varias publicaciones han demostrado que diversas especies de *Chlorella* son capaces de biodegradar una variedad de compuestos fenólicos, tales como fenol, bisfenol-A, 4-nitrofenol, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol y 2,4-dimetilfenol. Se ha demostrado también que varias especies de *Scenedesmus* son capaces de eliminar fenoles acilados y bisfenol-A. Las microalgas verdes, *Ankistrodesmus braunii* y *Scenedesmus quadricauda*, también han demostrado capacidad para biodegradar fenoles que se encuentran aguas residuales.

Chlamydomonas mexicana es capaz de eliminar el bisfenol-A, mientras que *Chlamydomonas reinhardtii* ha demostrado ser eficiente para biodegradar fenol. En estas microalgas la biodegradación ha demostrado ser un proceso bioenergético dinámico afectado por cambios en las condiciones de cultivo tales como la presencia o ausencia de una fuente de carbono alterna, intensidad de luz y disponibilidad de oxígeno.

De acuerdo con lo descrito en este capítulo, el uso de microalgas en ficorremediación ha demostrado ser efectivo y eficiente, sin embargo, es necesario la difusión de esta tecnología fuera del ámbito científico y aplicar este conocimiento en instalaciones a gran escala; este paso no es sencillo ya que existen ciertas limitaciones por superar, como aquellas relacionadas con el costo de producción de la biomasa y la posterior separación de esta del medio en que se encuentran. A nuestra consideración, la combinación de ficorremediación de aguas residuales junto con la recuperación de la biomasa para generación de biocombustibles o la obtención de otros productos con valor económico, permitirían reducir los costos, además, el proceso sería ambientalmente atractivo.

Abreviaturas:

CO₂: Dióxido de carbono

h: horas

kg: kilogramo

mM: milimolar

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

sp: especie no identificada

Glosario

- Adsorción:** Proceso por el que el agua o cuerpos disueltos, materiales dispersos o coloides son atraídos y se concentran sobre la superficie de un sólido por enlaces físicos y químicos.
- Antropogénico:** Pertenciente o relativo a lo que procede de los seres humanos que, en particular, tiene efectos sobre la naturaleza.
- Bioacumuladores:** Acumulación neta de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).
- Biocombustible:** Combustibles derivados de fuentes renovables.
- Biodegradación:** Descomposición de una sustancia en otras químicamente más sencillas mediante la acción microbiana.
- Biorremediación:** Proceso que utiliza microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medioambiente alterado por contaminantes a su condición natural.
- Compuestos emergentes:** Todo contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de este.
- Consorcio bacteriano:** Asociación natural de dos o más poblaciones bacterianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad, donde todos se benefician de las actividades de los demás.
- Citocromo P450:** Familia de enzimas de biotransformación de fase I que juegan un papel importante en el metabolismo y la eliminación de drogas, toxinas, carcinógenos y compuestos endógenos, como las hormonas esteroidales.
- Cultivo batch:** Cultivo discontinuo en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento.
- Ecosistema:** Sistema biológico constituido por una comunidad de seres vivos y el medio natural en que viven.
- Ficorremediación:** Empleo de uso de micro y macroalgas para remover contaminantes.

Fila (phylum): La más amplia categoría taxonómica dentro de los Reinos (plural: phyla).

Fotólisis: Descomposición o disociación química por la acción de energía luminosa.

Mucílago: Sustancia análoga a las gomas, con el agua se hincha o da soluciones viscosas con consistencia gelatinosa.

Polisacáridos: Carbohidratos complejos formados por un gran número de azúcares simples, los cuales se unen entre sí mediante los enlaces glucosídicos.

Radicales libres: Moléculas inestables elaboradas durante el metabolismo normal de las células.

Xenobiótico: Sustancia que no se encuentra de forma natural en el organismo.

Bibliografía

- Al-Homaidan, A.A., Al-Abbad, A.F., Al-Hazzani, A.A., Al-Ghanayem, A.A. & Alabdullatif, J.A. (2016). Lead removal by *Spirulina platensis* biomass. *International Journal of Phytoremediation*, 18,184189. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1073673>
- Bartolomé, M.C., Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, A., Garnica-Romo, M.G., Sánchez-Carrillo, S. & Sánchez-Fortún S. (2016). Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. *International Journal of Phytoremediation*, 18,1171-1177. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>
- Baselga-Cervera, B., Romero-López, J., García-Balboa, C., Costas, E. & López-Rodas V. (2018). Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChISP Strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Frontiers in Microbiology*, 9, e523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00523>
- Cameron, H., Mata, M.T. & Riquelme C. (2018). The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation. *PeerJ*, 6, e5295. <https://doi.org/10.7717/peerj.5295>

- Cho, D.Y., Lee, S.T., Park, S.W. & Chung A.S. (1994). Studies on the biosorption of heavy metals onto *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 29(2), 389-409. <https://doi.org/10.1080/10934529409376043>
- De Wilt, A., Butkovski, A., Tuantet, K., Hernández, L., Fernandes, T.V., Langenhoff, A. & Zeeman, G. (2016). Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal Hazardous Materials*, 304, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.033>
- Ellis, B.E. (1977). Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae. *Plant Science Letters*, 8, 213-216. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(77\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(77)90183-3) [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(77\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(77)90183-3)
- El-Sheekh, M., Farghl, A., Galal, H. & Bayoumi, H. (2015). Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rendiconti Lincei*, 27(2), 401-410. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0495-1>
- Escapa, C., Coimbra, R.N., Paniagua, S., García, A.I. & Otero M. (2015). Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 185, 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.004>
- Escapa, C., Coimbra, R.N., Paniagua, S., García, A.I. & Otero M. (2016). Comparative assessment of diclofenac removal from water by different microalgae strains. *Algal Research*, 18, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.008>
- Hansch, C., McKarns, S.C., Smith, C.J. & Doolittle, D.J. (2000). Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 127(1), 61-72. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00171-X)
- Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K. & Miyamoto K. (2003). Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2), 200-203. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80130-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80130-5) [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80130-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80130-5)
- Hom, A., Llorca, M., Rodríguez, S., Vicent, T., Barceló, D. & Blánquez, P. (2015). Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol degradation and transformation products

- identification. *Journal of Environmental Management*, 155,106-113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.003>
- Ismail, M.M., Essam, T.M., Ragab, Y.M. & Mourad, F.E. (2016). Biodegradation of ketoprofen using a microalgal–bacterial consortium. *Biotechnology Letters*, 38, 1493-1502. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2145-9>
- Jaromir, M., Ozadowicz, R. & Duda, W. (2005). Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of Lodz and in the Ner river in 1999-2000. *Water & Air Soil Pollution*, 164,205–222. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-3022-7> <https://doi.org/10.1007/s11270-005-3022-7>
- Ji, M.K., Kabra, A.N., Choi, J., Hwang, J.H., Kim, J.R., Abou-Shanab, R.A.I., Oh, Y.K. & Jeon, B.H. (2014). Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 73, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.070>
- Klekner, V. & Kosaric, N. (1992). Degradation of phenolic mixtures by *Chlorella*. *Environmental Technology*, 13, 503–506. <https://doi.org/10.1080/09593339209385177>
- Lima, S.A., Raposo, M.F., Castro, P.M. & Morais, R.M. (2004). Biodegradation of p-chlorophenol by a microalgae consortium. *Water Research*, 38(1), 97–102. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.27-1586>
- Lovell, C.R., Eriksen, N.T., Lewitus, A.J. & Chen, Y.P. (2002). Resistance of the marine diatom *Thalassiosira sp.* to toxicity of phenolic compounds. *Marine Ecology Progress Series*, 229, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.005> <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.005>
- Lunde, G. (1973). The synthesis of fat and water soluble arseno organic compounds in marine and limnetic algae. *Acta Chemica Scandinavica*, 27,1586-1594. <http://acta.chem.scand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.27-1586>
- Mar, C.C., Fan, Y., Li, F.L. & Hu, G.R. (2016). Bioremediation of wastewater from edible oil refinery factory using oleaginous microalga *Desmodesmus sp.* S1. *International Journal of Phytoremediation*, 18, 1195-1201. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1193466>
- Nakajima, A., Horikoshi, T. & Sakaguchi, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. Selective

- accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16, 88-91. [https://doi.org/0171-1741/81/0012/0076/\\$01.60](https://doi.org/0171-1741/81/0012/0076/$01.60) [https://doi.org/0171-1741/81/0012/0076/\\$01.60](https://doi.org/0171-1741/81/0012/0076/$01.60)
- Nakajima, N., Teramoto, T., Kasai, F., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H., Azumi, Y. & Saji, H. (2007). Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere*, 69, 934–941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.088>
- Nazos, T.T., Kokarakis, E.J. & Ghanotakis, D.F. (2017). Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 131, 31-40. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0294-2>
- Papazi, A. & Kotzabasis, K. (2007). Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds - Exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. *Journal Biotechnology*, 129(4), 706–716. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.021>
- Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L. & Temussi, F. (2002). Biodegradation of phenols by microalgae. *Biotechnology Letters*, 24, 2047–2051. <https://doi.org/10.1023/A:1021367304315>
- Quesada Peñate, I., Jáuregui Haza, U.J., Wilhelm, A. & Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmaceuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Ciencias Biológicas*, 40, 173-179. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181221662005>
- Rawat, I., Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2010). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M. & Bolado, S. (2018). Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*, 263, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101> <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
- Sakaguchi, T., Nakajima, A. & Horikoshi, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metals elements in biological system. Accumulation of molybdenum by green microalgae. *European Journal of Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 12, 84-89. <https://doi.org/10.1007/BF01970039> <https://doi.org/10.1007/BF01970039>
- Sánchez-Sandoval, D.S., González-Ortega, O., Navarro-Martínez, M.F., Castro-Tapia, J.M., García de la Cruz, R.F., & Soria-Guerra, R.E. (2021). Photodegradation and removal of diclofenac by the green alga *Nannochloropsis oculata*. *Phyton-International Journal of experimental Botany*, 90(5), 1519-1533. doi:10.32604/phyton.2021.015087
- Schmitt, M., Bartels, P., Adler, N. & Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1389–1396. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0825-3> <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0825-3>
- Semple, K.T. & Cain, R.B. (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 62, 1265–1273. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.4.1265-1273.1996>
- Shanab, S., Essa, A. & Shalaby, E. (2012). Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior*, 7, 392-399. <https://doi.org/10.4161/psb.19173>
- Shashirekha, V., Sridharan, M.R. & Swamy, M. (2008). Biosorption of trivalent chromium by free and immobilized blue green algae: kinetics and equilibrium studies. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43, 390-401. <https://doi.org/10.1080/10934520701795608>
- Shen, Y., Li, H., Zhu, W., Ho, S.H., Yuan, W., Chen, J. & Xie, Y. (2017). Microalgal-biochar immobilized complex: A novel efficient biosorbent for cadmium removal from aqueous solution. *Bioresource Technology*, 244, 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.085> <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.085>
- Suresh-Kumar, K., Dahms, H.U., Won, E.J., Lee, J.S. & Shin, K.H. (2015). Microalgae- A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329-352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019> <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B. & Grimme, L.H. (1996). Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae: Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiology*, 112(1), 361–370. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.361>

- Torres, E.M., Hess, D., McNeil, B.T., Guy, T. & Quinn, J.C. (2017). Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and biorremediation potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.034> <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.034>
- Varsha, Y.M., Naga Deepthi, CH. & Chenna, S. (2011). An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean-up. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 2, S11:001 <https://doi.org/10.4172/2155-6199.S11-001>
- Yoshida, K., Ishii, H., Ishihara, Y., Saito, H. & Okada Y. (2008). Bioremediation potential of formaldehyde by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3 strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 321-328. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-83140> <https://doi.org/10.1007/s12010-008-83140>
- Zarate, A., Florez, J., Angulo, E., Varela-Prieto, L., Infante, C., Barrios, F., Barraza, B., Gallardo, D.I. y Valdés J. (2017). *Burkholderia tropica* as a potential microalgal growth-promoting bacterium in the biosorption of mercury from aqueous solutions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1138-1149. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11059> <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11059>
- Zhang, J., Zhou, F., Liu, Y., Huang, F. & Zhang, C. (2020). Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Science and the Total Environment*, 704, e135368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135368> <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135368>
- Zhou, G.J., Peng, F.Q., Yang, B. & Ying, G.G. (2013). Cellular responses and bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.002>
- Zhou, G.J., Peng, F.Q., Zhang, L.J. y Ying, G.G. (2011). Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 19, 2918-2929. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0800-9>



Capítulo 17

Transformación genética de microalgas

Ruth Elena Soria Guerra
Saraí Damaris Dávalos Guzmán
Julieta Ponce Alonso
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Jesús Josafath Quezada Rivera
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Juárez del Estado de Durango

Resumen

En las últimas décadas las microalgas han surgido como biorreactores para la producción de proteínas heterólogas. *Chlamydomonas reinhardtii* es considerada la microalga modelo para los procesos de transformación genética; sin embargo, a la fecha se han logrado realizar transformaciones estables a nivel de núcleo y cloroplasto en otras microalgas utilizando técnicas de transformación tales como biobalística, electroporación, vía *Agrobacterium tumefaciens* y/o perlas de vidrio. Para realizar una transformación exitosa es necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de la proteína que se desea expresar y de esta manera elegir el mejor sistema de expresión. En este capítulo se presenta una descripción general del progreso en la ingeniería genética de microalgas, así como algunas estrategias que pueden afectar el rendimiento de la proteína tal como el

uso de diversos promotores y otros elementos regulatorios. Se analiza también la expresión de péptidos hipocolesterolémicos, antihipertensivos y antimicrobianos en microalgas. Finalmente se revisan algunos enfoques emergentes para la producción de proteínas recombinantes en este sistema de expresión.

Introducción

Al igual que las bacterias, levaduras, plantas y otros sistemas de expresión, las microalgas también pueden manipularse para expresar genes heterólogos para la producción de proteínas recombinantes que tienen un valor importante en aplicaciones farmacéuticas o industriales. Hasta la fecha, algunas proteínas de origen animal como anticuerpos, hormonas y vacunas se han expresado en microalgas a niveles económicamente viables.

Las microalgas presentan varias ventajas en comparación con otros sistemas de expresión, entre las que se pueden mencionar su rápida duplicación celular, crecimiento fotoautótrofo o heterótrofo, además, la expresión de proteínas recombinantes puede llevarse a cabo a nivel nuclear, cloroplástico o mitocondrial; así mismo, algunas especies de microalgas han sido catalogadas como GRAS (Generalmente Reconocidas Como Seguras) y a diferencia de las bacterias, las microalgas poseen vías complejas de modificaciones post-traduccionales, y por lo tanto pueden producir proteínas glicosiladas. Las microalgas modificadas genéticamente son adecuadas para el crecimiento en fotobiorreactores cerrados, en los que las condiciones de cultivo como luz, temperatura y nutrientes pueden controlarse eficazmente. El cultivo de microalgas transgénicas en fotobiorreactores también puede evitar que los transgénicos se escapen al medio ambiente, lo que potencialmente puede ocurrir en las plantas superiores por medio del polen. Las microalgas productoras de proteínas terapéuticas u otros compuestos valiosos pueden ser potencialmente administrados por vía oral como algas liofilizadas en polvo con poca o ninguna purificación. Estas ventajas hacen que los sistemas microalgales sean atractivos para la producción de proteínas recombinantes y otros compuestos de alto valor.

La introducción de ADN foráneo dentro del núcleo de la microalga puede conseguirse mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, electroporación o agitación en presencia de perlas de vidrio. Otro procedimiento que ha demostrado ser exitoso para la transformación de cloroplastos y mitocondrias

es la balística. En este capítulo se describen los fundamentos de estas técnicas y algunas aplicaciones.

Transformación nuclear

El fundamento de la transformación genética en algas es causar una permeabilización temporal mediante métodos físicos o químicos en la membrana o pared celular, según sea el caso, permitiendo que el ADN exógeno se integre en la célula. Una de las variables que deben tomarse en cuenta al momento de transformar genéticamente una microalga es su movilidad, forma y tamaño. Generalmente cuando las microalgas tienen un tamaño $<5 \mu\text{m}$ se requieren condiciones extremas para la transfección, en cambio cuando su tamaño es de 10-50 μm las condiciones de transformación son menos dañinas.

La expresión nuclear de transgenes en microalgas ofrece varias ventajas como la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales así como la secreción de las proteínas expresadas al medio. Sin embargo, este tipo de transformación presenta algunas desventajas respecto a otros métodos, por ejemplo, la frecuencia de expresión transgénica en el genoma nuclear de la microalga es extremadamente baja debido a mecanismos de silenciamiento génico, el cual se produce a nivel transcripcional o postranscripcional. Otros mecanismos involucrados en la limitación de la expresión del transgén nuclear para proteínas incluyen la transcripción ineficiente de promotores heterólogos, procesamiento inadecuado de ARN, inestabilidad de ARNm, e inestabilidad de los productos proteicos. Debido a lo anterior se han realizado mejoras significativas en la expresión mediante el uso de mejoras de promotores de genes de *Chlamydomonas*, la cual es considerada la microalga modelo para los procesos de transformación genética; estas mejoras incluyen también la optimización de codones del gen a insertar y la inclusión de intrones; sin embargo, la eficiencia de transformación comparada con otros métodos sigue siendo baja por lo que se necesita una mayor optimización del proceso.

Se han reportado transformaciones nucleares estables en solo tres grupos de microalgas eucariotas: clorófitas, diatomeas y dinoflagelados. La microalga modelo es *Chlamydomonas reinhardtii*, pues su genoma está completamente secuenciado y se ha reportado la transformación genética de su núcleo, mitocondria y cloroplasto. El genoma nuclear de *C. reinhardtii* contiene 100 Mb

distribuidos en 17 cromosomas, es inusualmente rico en el contenido de G+C (65%), sin embargo, a pesar de que se encuentra secuenciado su genoma, la función para la gran mayoría de los genes se desconoce.

En la Figura 17.1, se observan cuatro diferentes técnicas que se han utilizado para la transformación nuclear de *C. reinhardtii*, este apartado se centra en la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*, por electroporación y por cuentas de vidrio, aunque es posible transformar el núcleo por medio de biobalística esta técnica se ha utilizado mayormente para transformar el cloroplasto y mitocondrias de microalgas.

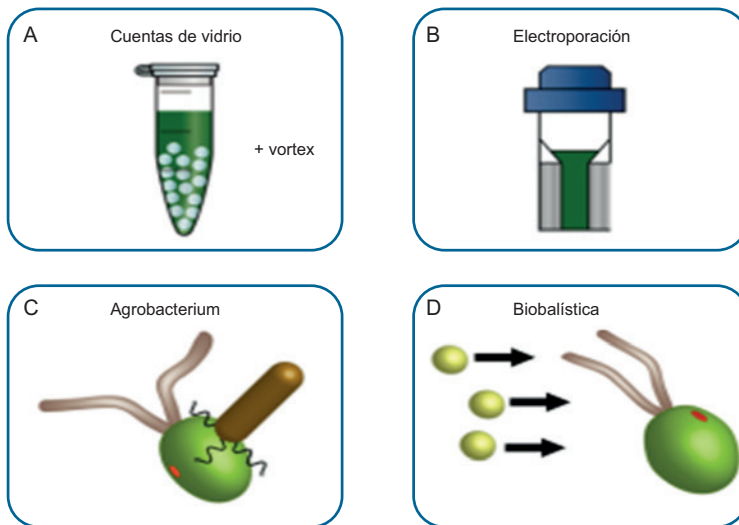


Figura 17.1. Técnicas de transformación nuclear que se han utilizado en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Modificado de Jinkerson y Jonikas, 2015. a) En este modelo se hace uso de perlas de vidrio en cepas deficientes de pared celular; b) se emplea un pulso eléctrico en cepas deficientes de pared celular; c) se utiliza a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; d) se usan nanopartículas de oro en una cámara de vacío.

Los promotores más utilizados para llevar a cabo la transformación nuclear son los de los genes HSP70A (Proteína de choque térmico 70 A, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein 70 A), psaD (Proteína D del fotosistema I, por sus siglas en inglés photosystem I protein D) y RSCBS2 (Subunidad pequeña 2 de la RUBISCO, por sus siglas en inglés Ribulose bisphosphate carboxylase small su-

bunit 2). Así mismo también se ha demostrado que los promotores quiméricos tienen altos niveles de transcripción y expresión, un ejemplo de este tipo de promotores y uno de los más utilizados en la transformación nuclear es HSP70A/RSCB2. Por otra parte, se ha reportado que las secuencias intrónicas en los genes heterólogos mejoran la expresión independientemente de la orientación o posición. En el núcleo, la expresión génica también puede ser inducida por una serie de factores, incluidos el choque térmico (HSP70A) o por adición de metales utilizando promotores que induzcan la expresión de genes en presencia de estos, como por ejemplo el promotor inducible *CYC6* (por sus siglas en inglés Cytochrome C6) que se induce en presencia de níquel y cobalto.

En la Tabla 17.1 se presentan algunos ejemplos de genes reporteros y marcadores que se han expresado en la microalga modelo y que han sido base para transformar otras microalgas.

Tabla 17.1. Ejemplos de marcadores y genes reporteros utilizados en microalgas (Modificado de León y Fernández, 2007).

Gen	Descripción	Fuente del gen
<i>aadA</i>	Adenil transferasa (resistencia a espectinomicina)	Eubacteria
<i>als</i>	Acetolactato sintasa (resistencia a herbicidas con sulfonilurea)	<i>Chlamydomonas</i>
<i>aphvIII</i>	Aminoglucósido 3' fosfotransferasa (resistencia a paramomicina)	<i>Streptomyces rimosus</i>
<i>ble</i>	Proteína de unión a bleomicina (resistencia a zeocina)	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa (resistencia a cloranfenicol)	Transposon T9
<i>gfp</i>	Proteína verde fluorescente (gen reportero)	<i>Aequorea Victoria</i>
<i>gus</i>	B-glucoronidasa (gen reportero)	<i>Escherichia coli</i>
<i>hpt</i>	Higromicina B fosfotransferasa (gen de resistencia a higromicina)	<i>Escherichia coli</i>
<i>luc</i>	Luciferasa (gen reportero)	<i>Horatia parvula</i>
<i>nptII</i>	Neomicin fosfotransferasa II (gen de resistencia a neomicina)	<i>Escherichia coli</i>

Las microalgas han llamado la atención como una plataforma potencial de bajo costo para la producción de una amplia gama de productos comerciales. Productos que incluyen biocombustibles, nutracéuticos, terapéuticos, industriales, productos químicos y alimentos para animales. En la Tabla 17.2, se presentan algunas proteínas terapéuticas producidas en microalgas a nivel nuclear.

Tabla 17. 2. Proteínas terapéuticas producidas en microalgas
(Modificado de Dehghani *et al.*, 2019).

Proteína terapéutica	Hospedero	Evaluación de funcionalidad
Anticuerpo monoclonal contra hepatitis (CL4) con y sin señal de retención al retículo endoplásmico	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Anticuerpo IgA contra el virus de Marburg	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Hormona de crecimiento de pescado	<i>Chlorella sp.</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Factor Oostático Modulador de la Tripsina	<i>Chlorella sp.</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Eritropoyetina humana	<i>C. reinhardtii</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Antígeno P24 del HIV-1	<i>Chlamydomonas sp.</i>	No reportado
Proteína VP2 del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV)	<i>Chlorella sp.</i>	No reportado

Vía *Agrobacterium tumefaciens*

El sistema de transformación nuclear de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) fue adaptado para transformar microalgas utilizando el vector de expresión p-CAMBIA 1301, se ha demostrado que este tipo de transformación es uno de los métodos más eficientes para transformar genéticamente las microalgas marinas y de agua dulce. Este método ofrece varias ventajas como alta eficiencia, aplicación simple e integración preferencial en regiones transcripcionalmente activas.

Algunas de las microalgas que se han transformado mediante este método son *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus acutus* TISTR8447, *Chlorella vulgaris*, *S. acutus* y *N. oculata*. El fundamento de la transformación de microalgas por *A. tumefaciens* es parecido al propuesto al de agro-infección en plantas, en donde la agrobacteria transfiere un segmento de ADN de su

plásmido Ti (del inglés Tumor Inducing, inductor de tumores) (Fig.17.2) conocido como ADN-T, para que se integre al azar en el núcleo del organismo hospedero. El proceso de transformación comprende seis grandes pasos que son resumidos en la Figura 17.3.

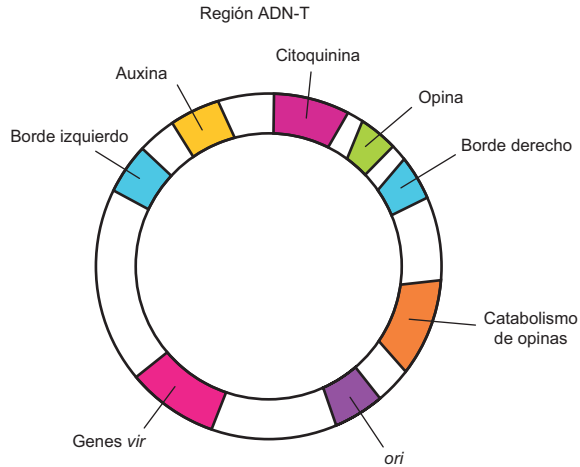


Figura 17.2. Plásmido Ti. Genes *vir*: genes de virulencia; *ori*: origen de replicación (Tomado de Hernández-Esquivel, 2015).

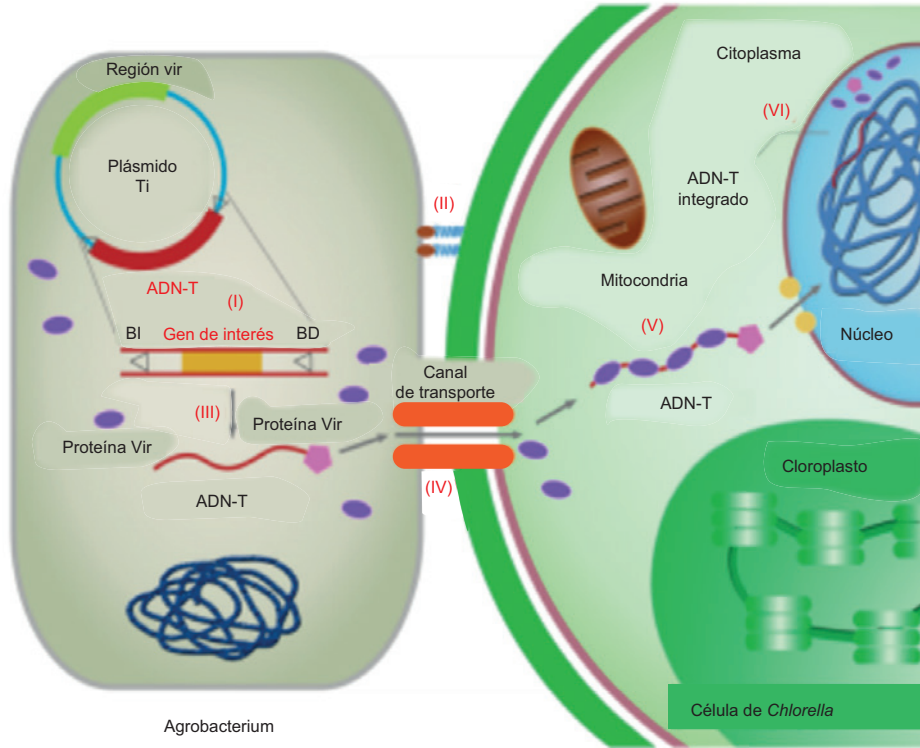


Figura 17.3. Modelo putativo de transformación nuclear de *Chlorella* vía *Agrobacterium* (modificado de Yang *et al.*, 2016). El proceso de transformación comprende seis grandes pasos. (I) El gen de interés se clona entre el borde izquierdo (BI) y el borde derecho (BD) del ADN-T, este plásmido recombinante se introduce a *Agrobacterium*. (II) Ocurre el reconocimiento célula-célula y fijación de *Agrobacterium* a las células huésped de *Chlorella*. (III) Con la activación de la región de genes *vir*, ocasionada productos químicos de respuesta, tal como la acetosiringona, el ADN-T es generada por ciertas proteínas *Vir*. (IV) el ADN-T viaja a través del citoplasma de células de *Chlorella* (V) y es directamente importado a su núcleo. (VI) Una vez en el núcleo, el ADN-T es despojado de las proteínas de acompañamiento innecesarias e integrado en el genoma de *Chlorella*.

Los genes alojados en el ADN-T pueden expresarse en las células huésped de manera transitoria o estable. El pico de expresión que ocurre dentro de 2 a 4 días después de la infección de los tejidos del huésped generalmente se define como expresión transitoria. La expresión transitoria ocurre antes de la

integración del ADN-T en el genoma del huésped y, por lo tanto, no se puede transmitir de forma estable a la progenie. La expresión estable requiere más tiempo para integrar el ADN-T en el genoma del huésped y por lo tanto ocurre de 10-14 días después de la transformación.

Para llevar a cabo este tipo de transformación no es necesario realizar una lesión en la célula como suele realizarse en plantas, únicamente se añade un compuesto fenólico que induzca la activación de las proteínas *vir* del plásmido Ti de *Agrobacterium*. El compuesto más utilizado es acetosiringona (AS), más no es el único. Por otra parte, se ha demostrado que algunas microalgas pueden ser transformadas sin la presencia de AS, como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Haematococcus pluvialis* sin embargo hay microalgas que solo se transforman en presencia de AS como *Chlorella vulgaris* que requiere de 50-300 μM de acetosiringona.

El pH es un factor importante que debe considerarse al momento de realizar una transformación vía *Agrobacterium*, un pH ácido generalmente se considera adecuado para la transformación, ya que un pH ácido puede inducir la virulencia de *Agrobacterium*. Sin embargo, el pH óptimo depende de la microalga y la cepa de *Agrobacterium* que se utilice, ya que los requisitos de pH para la inducción óptima de los genes *vir* son diferentes para diferentes cepas de *Agrobacterium*.

Para lograr una transformación estable es necesario optimizar los codones del gen exógeno ya que esto promueve de manera significativa la expresión de la proteína deseada, además es necesario elegir un adecuado marcador de selección. Esto incluye genes que confieran resistencia a antibióticos, herbicidas o varias enzimas metabólicas que controlen el crecimiento bajo condiciones específicas. Además, la expresión del gen endógeno podría ser eliminado si las clonas transgénicas no se mantienen bajo condiciones de selección constantes.

Protocolos

Protocolo para la transformación genética vía *Agrobacterium*

A continuación, se describe un protocolo para transformar microalgas (particularmente *N. oculata* CCAP 849/7, *C. vulgaris* OW-01 y *S. acutus* UTEX 72) vía *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 17.4).

1. Cultivar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 conteniendo la construcción de interés en medio agar para levaduras y mohos (Yeast Mold Agar, YM, por sus siglas en inglés) hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) de 0.5 (a 600 nm).
2. Cultivar las microalgas hasta que alcancen una DO de 0.2 (a 750 nm), posteriormente, cosechar la biomasa por centrifugación y sembrarla en medio Tris Acetato Fosfato (TAP) sólido.
3. En condiciones estériles adicionar 200 μL de la *A. tumefaciens* y 200 μL de acetosiringona 100 μM . Con ayuda de un asa de vidrio estéril realizar un estriado en ángulo recto.
4. Incubar este co-cultivo durante 48 horas en obscuridad a 25 °C.
5. Posterior al co-cultivo recuperar las microalgas y resembrarlas en medio TAP con agente de selección (de acuerdo con el vector que se esté utilizando) y un bacteriostático (250 mg/L de cefotaxima) para eliminar la bacteria.
6. Cultivar a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Las colonias resistentes al agente de selección se resembrarán cada dos semanas.
7. Después de tres resiembras corroborar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) la presencia del gen de interés utilizando oligonucleótidos específicos.

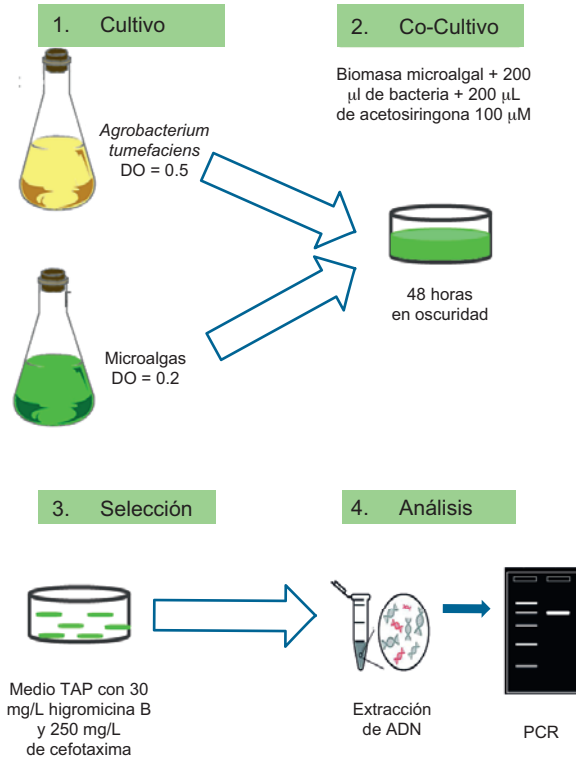


Figura 17.4. Protocolo de transformación de microalgas vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Electroporación

La electroporación es un método físico que se basa en la electropermeabilización mediante la aplicación de un campo eléctrico externo fuerte (medido como $V\text{ cm}^{-1}$) a través de un par de electrodos en una cubeta de electroporación o celda generando microporos temporales en la membrana celular permitiendo el paso de moléculas hacia las células. Los parámetros de electroporación, como el campo fuerza, duración del pulso y tiempos de pulso; así como la temperatura, ósmosis y estado celular; y la concentración de plásmido de ADN, se han considerado esenciales para la efectividad de la electroporación.

La transferencia del material genético exógeno hacia la célula puede ser obstruido por la pared celular, o la forma y el tamaño de las células, debido a lo anterior las condiciones de electroporación deben optimizarse indivi-

dualmente para cada especie. Al momento de estandarizar la técnica para la electro-transformación debe considerarse que la resistencia del buffer de electroporación debe superar los 600 Ω , ya que la intensidad del voltaje pudiera superar la capacitancia del equipo. La concentración de sales o de buffer amortiguador incide directamente en la resistencia del mismo, a mayor concentración de éstas, menor es la resistencia y viceversa.

Esta técnica ha sido utilizada para transformar protoplastos de microalgas, mutantes deficientes de pared celular y otras células de algas con paredes delgadas. Sin embargo, se ha reportado la transformación exitosa de microalgas sin usar cepas mutantes de pared celular, como es el caso de *Phaeodactylum tricornutum*, ya sea por electroporación o electroporación de pulsos múltiples. En este caso, las células se cultivaron sin sílice, que probablemente influyó en la estructura de la pared celular. En general, reduciendo el grosor de la pared celular mejora la transformación de la microalga por electroporación.

La formación de poros hidrofílicos estables o inestables depende principalmente de la intensidad del campo eléctrico, el número de pulsos, el tiempo entre los pulsos, etc. Después de la aplicación del campo eléctrico externo que rodea el medio celular, los iones pueden moverse y acumularse como cargas en la superficie de la membrana celular. Esta acumulación de cargas puede crear un campo eléctrico dentro de la membrana celular. Como resultado, la intensidad del campo eléctrico generado dentro de la membrana celular es completamente diferente del exterior de la membrana celular. Esta diferencia de potencial se denomina potencial transmembrana (TMP), que es linealmente proporcional al campo eléctrico externo y al diámetro de la celda.

Es importante elegir apropiadamente los promotores, terminadores y optimizar los codones, pues esto puede aumentar la eficiencia de la transformación. Existen reportes en los que se ha demostrado que las bajas concentraciones celulares, las bajas intensidades de luz y la transferencia de pequeños fragmentos de ADN producen mayor eficiencia de transformación, lo cual podría deberse a que las altas intensidades de luz reducen la funcionalidad del antibiótico y a que una alta concentración celular podría reducir el contacto de las células con las placas selectivas resultando en falsos positivos.

Usualmente el sistema básico de electroporación (Fig. 17.5) utiliza una gran cantidad de células (típicamente del orden de millones) que se colocan en una celda entre un par de electrodos (escala de mm a cm) en una cámara de aislamiento y se aplica un alto voltaje (de 50 a 1000 V cm^{-1}). La desventaja

de este método es que una gran cantidad de células podrían dañarse o lisarse gravemente debido al estrés sometido, como calentamiento, generación de burbujas, cambio de valor de pH causado por un campo eléctrico ultra alto; todo esto provoca una baja viabilidad celular y baja eficiencia de transfección.

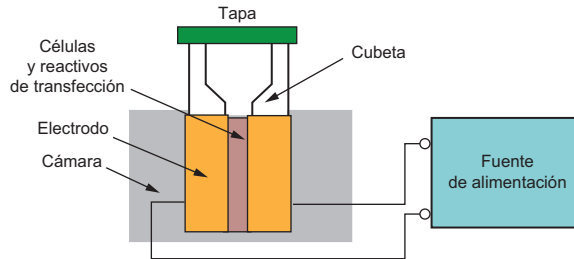


Figura 17.5. Sistema de electroporación (Modificado de Chang, 2018).

Recientemente en una investigación se transformó el núcleo de *Euglena gracilis* mediante electroporación obteniendo la mayor cantidad de transformantes usando un voltaje de pulso de 3 kV y 20 μ g de ADN plasmídico por transformación. Sin embargo, la frecuencia de transformación fue baja en comparación con la electroporación realizada con otras algas como *Nannochloropsis gaditana* y *Scenedesmus obliquus*, lo cual puede deberse a que en estas últimas microalgas se utilizaron enzimas digestivas y proteolíticas para degradar la pared celular y hacerlas más permeables.

Lo anterior demuestra que para tener una mayor eficiencia de transformación es necesario pre-tratar la pared celular de las microalgas antes de realizar la electro-permeabilización; sin embargo, esto puede complicarse pues no todas las microalgas están caracterizadas y por lo tanto no se tiene la información completa de la composición de la pared celular por lo que las enzimas a utilizar para degradar esta serían diferentes según la especie. Por ejemplo, para *C. reinhardtii* se ha reportado el uso de lisina y para *Chlorella vulgaris* se ha utilizado lizosima. A pesar de las desventajas anteriormente mencionadas, la electroporación es uno de los métodos más eficientes, produciendo hasta 100 veces más transformantes comparado con el método de transformación por cuentas de vidrio.

Protocolo para la transformación genética por electroporación

A continuación, se presenta un protocolo para la electroporación de la microalga *Neochloris oleabundans*.

1. Crecer un cultivo de *N. oleabundans* hasta una DO de 0.4-0.5 (a 750 nm).
2. Centrifugar las células a 1,000 g por 10 min, retirar el medio de cultivo hasta dejar un volumen máximo de 5 mL. Transferir 500 μ L del cultivo concentrado a un tubo de 1.5 mL.
3. Centrifugar a 14,000xg por 10 min. Decantar el exceso de medio de cultivo y lavar la pastilla celular con 500 μ L de buffer de electroporación (500 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 200 mM Manitol, 200 mM Sorbitol, pH 7.6).
4. Resuspender las células con vortex. Centrifugar nuevamente el cultivo y decantar el exceso de buffer. Resuspender la pastilla celular en 60 μ L de buffer de electroporación.
5. Agregar de 5 a 20 μ g de ADN plasmídico a la pastilla celular del paso anterior.
6. Transferir el volumen total de las células junto con el ADN plasmídico a las celdas de electroporación y dejar incubar en hielo por 5 min.
7. Configurar el electroporador a 0.7 kV cm⁻¹ y 2 ms de duración, colocar la celda en el electroporador y dar el pulso eléctrico.
8. Incubar la celda en hielo durante 5 min, posteriormente agregar 350 μ L de caldo nutritivo (Nutrient Broth, NB, por sus siglas en inglés) y mezclar.
8. Transferir el cultivo a un tubo de 1.5 mL y dejar incubando al menos 30 min en agitación constante a 27°C.
9. Tomar 25 μ L del cultivo y sembrar en medio NB con antibiótico.
10. Dejar incubando a 27°C con fotoperíodo de 16:8 h luz: oscuridad hasta el desarrollo de colonias.
11. Después de varias resiembras corroborar mediante PCR la presencia del gen de interés.

Transformación utilizando cuentas de vidrio

Otro de los métodos para transferir material genético a una microalga es mediante la agitación por perlas o cuentas de vidrio. Se considera un proceso simple, de bajo costo y no es necesario el uso de equipos especializados. La permeabilización de las células es obtenida mediante la agitación en presencia de ADN, perlas de vidrio y Polietilenglicol (PEG) pues se ha demostrado que el PEG mejora la eficiencia de transformación de 5 a 12 veces más en células de *Chlamydomonas* deficientes de pared celular. Esta técnica fue desarrollada originalmente para levaduras, sin embargo, ha sido utilizada para la transformación de mutantes deficientes en la pared celular o células de tipo silvestre de *Chlamydomonas* después de la degradación enzimática de la pared celular. Los métodos de agitación generalmente emplean de 30-100 millones de células microalgales en un volumen de 0.4 mL, 300 mg de perlas de vidrio (500 μm de diámetro), un 5-13% de solución de PEG (peso molecular 4,000-8,000 kDa) y ADN del plásmido de interés (25-50 μg). Se ha demostrado que el método de perlas de vidrio es más eficiente para transformar el núcleo de *Dunaliella salina* obteniendo un 5.9% de eficiencia de transformación comparado con el método de electroporación (cerca del 2%) y por balística (menos del 1%). Además, se ha observado que el número de transformantes depende de las concentraciones de PEG variando entre 3.5 y 5%.

El método de perlas de vidrio también puede combinarse con el de electroporación, en la figura 17.6 se muestra el uso de perlas de vidrio como pre-tratamiento de la pared celular y posteriormente electroporación de las células de *Thraustochytrid*.

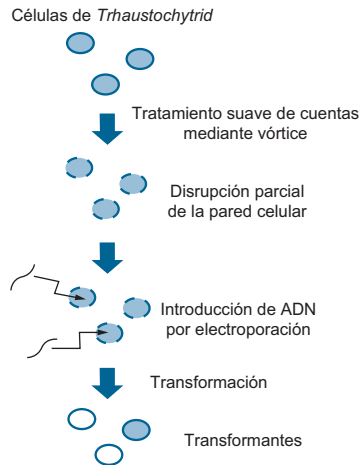


Figura 17.6. Método de transformación con cuentas de vidrio y electroporación.

Un protocolo similar, utilizando carburo de silicio (SiC) en lugar de cuentas de vidrio para perforar células ha tenido éxito en microalgas con pared celular en cepas de *C. reinhardtii*, produciendo una eficiencia de hasta 10^{-5} microalgas transformantes con pared celular y hasta 10^{-4} transformantes en cepas sin pared celular. A diferencia de la agitación de las células con perlas de vidrio, agitando con SiC durante 10 minutos dan como resultado poca pérdida en la viabilidad celular. Sin embargo, a pesar de que la viabilidad celular después de la agitación es mejor, debido a la baja eficiencia de transformación, alto costo de materiales y problemas de salud asociados con el manejo del SiC generalmente se prefiere el uso de las cuentas de vidrio.

Protocolo para la transformación genética utilizando cuentas de vidrio

Se presenta un protocolo para transformar el núcleo de *C. reinhardtii* mediante cuentas de vidrio.

1. Crecer las células de *Chlamydomonas* en medio mínimo (HS) hasta una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/mL.
2. Recolectar las células por centrifugación a 5000 rpm por 5 min.
3. Resuspender las células en medio sin nitrógeno a una relación v/v 1/100.
4. Añadir en un tubo 300 μ L de células, 100 μ L de polietilenglicol al 20%, 1-2 μ g ADN linealizado y 300 mg de perlas de vidrio estériles.
5. Agitar vigorosamente en vórtex 15-30 segundos.
6. Plaquear en medio selectivo e incubar a 25 °C, con un fotoperiodo de 16h luz/ 8h oscuridad.
7. Las colonias transformantes aparecerán a los 6 días de su cultivo.
8. Corroborar mediante PCR la presencia del gen de interés.

Transformación de cloroplastos

Es generalmente aceptado que el cloroplasto de las células vegetales y de algas, evolucionó de una bacteria fotosintética que se estableció por endosimbiosis dentro de una célula huésped eucariota no fotosintética hace más de mil millones de años. Desde entonces, el genoma de esta bacteria ha experimentado una reducción en la complejidad, ya sea por la pérdida de genes o la transferencia de genes al núcleo del huésped, de modo que los cloroplastos modernos poseen múltiples copias de un genoma circular pequeño (120-200 kb) que comprende unos 100-250 genes. La mayoría de estos genes codifican componentes del aparato de transcripción-traducción del cloroplasto o componentes centrales del aparato fotosintético. Estos productos genéticos son homólogos a los que se encuentran en las cianobacterias actuales, también así la disposición y la expresión de los genes también reflejan la ascendencia procariota del cloroplasto.

Estas características convierten al cloroplasto en un objetivo atractivo para la ingeniería genética ya que el nivel de ploidía es extremadamente alto. La inserción de genes en el cloroplasto posibilita la expresión de estos a niveles elevados, dando como resultado la obtención de proteína recombinante en mayor cantidad. Un dato importante de esta transformación es que los transgenes se integran en los genomas del cloroplasto por recombinación homóloga y no se ven afectados por el silenciamiento génico, también es importante mencionar que no existe “efecto de posición” un fenómeno muy común en la transformación nuclear. El cloroplasto tiene la capacidad de expresar múltiples transgenes a partir de un solo operón como resultado de la traducción

eficiente de ARN mensajero policistrónico (ARNm) en el plástido. A la fecha, la balística y la captación de ADN inducida por polietilenglicol (PEG) producen una transformación estable de plastidios.

La primera transformación exitosa de cloroplasto se reportó en *Chlamydomonas reinhardtii*; su cloroplasto abarca el 40% del volumen de toda la célula. La transformación de cloroplasto tiene numerosas aplicaciones como la producción de proteínas terapéuticas, vacunas y sobreexpresión de enzimas.

Para la transformación del cloroplasto es de gran ayuda la elección de un gen reportero o un agente selectivo pues indica probables transformantes, lo cual reduce la búsqueda de clonas transplastómicas. Los genes de resistencia mayormente utilizados son el gen *aadA* (aminoglucósido adeniltransferasa) que confiere resistencia a la espectinomicina y la estreptomycinina, los genes *nptII* y *aphA-6* (aminoglucósidos- fosfotransferasa) resistencia a kanamicina y el gen *badh* (betaína aldehído deshidrogenasa) en combinación con betaína aldehído también es utilizada como agente de selección.

Los vectores de transformación de cloroplasto se desarrollan de manera que se logre la expresión del gen de interés mediante recombinación homóloga, en una ubicación determinada y precisa en el plastóma o ADN de cloroplasto. Cuando el ADN que contiene la secuencia de interés se inserta a los plásmidos, solo se transforman unas pocas copias del plastóma, lo que resulta en una transformación heteroplasmática; sin embargo, mediante el subcultivo de las células bombardeadas *in vitro* bajo selección, todas las copias del plastóma contendrán

el transgén que conduce al estado de homoplastía, donde todos los plastómas del cloroplasto presentes en la célula estarán transformados (Figura 17.7).

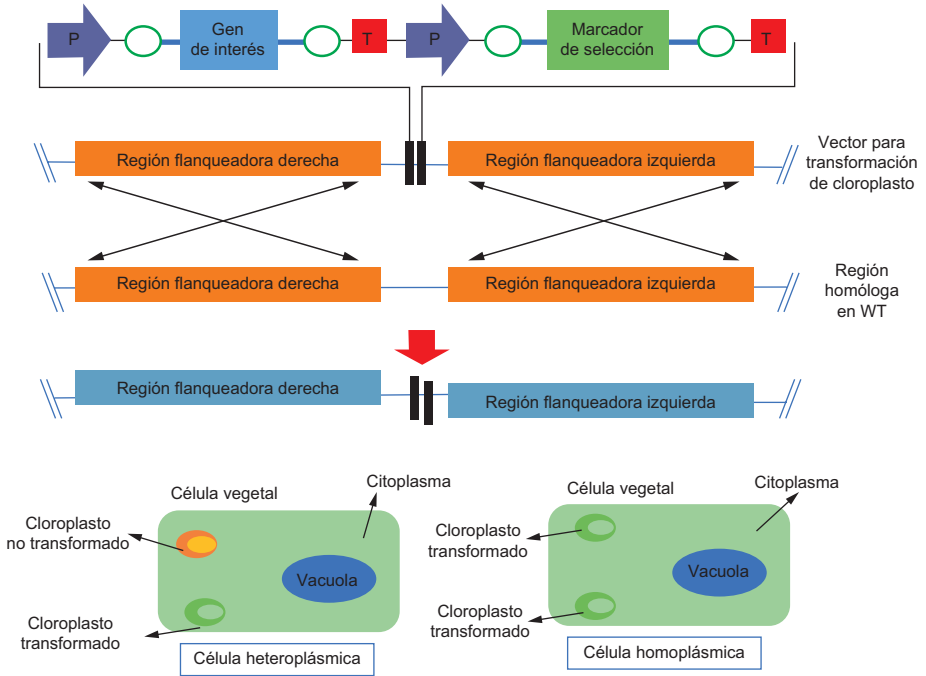


Figura 17.7. Diagrama representativo de la transformación de cloroplasto. Diseño simple de un vector de transformación para cloroplasto, donde el casete de selección y de expresión se coloca entre dos regiones específicas del plástido. Estas regiones se toman de plástidos WT (no transformados) cuyo plastóma será manipulado, esto permitirá un evento cruzado que integrará las secuencias de ADN entre ellas. Las flechas moradas en el vector de expresión de cloroplasto representan promotores (P) y la dirección de la transcripción; los recuadros rojos corresponden a los terminadores (T). Las regiones no traducidas (UTRs) están representadas por círculos blancos y las líneas delgadas entrecruzadas simbolizan la recombinación homóloga. Al final se observan dos células vegetales, una heteroplásmica y otra homoplásmica (Adaptado de Adem *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente el organismo pionero para la clonación exitosa en el cloroplasto fue la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* dando lugar a una gran cantidad de publicaciones reportando la producción de

diferentes proteínas recombinantes (Tabla 17.3). Debido a los resultados satisfactorios se ha observado un creciente interés en otras especies de microalgas como potenciales productores de proteínas recombinantes, un ejemplo de ello es la microalga *Chlorella vulgaris* utilizado como alimento en la acuicultura debido a su alto contenido proteico y de ácidos grasos. Debido a su rápido crecimiento y bajo costo es un candidato prometedor para su uso como bio-reactor para la producción a gran escala de proteínas de alto valor agregado.

Otra microalga de interés biotecnológico es *Scenedesmus* ya que se ha reportado que la transformación del cloroplasto de *S. obliquus* y *S. acutus* es un blanco potencial para la modificación genética. *Nannochloropsis oculata* es una microalga unicelular utilizada como alimento para peces, la cual presenta un solo cloroplasto; en esta microalga se han realizado modificaciones genéticas para producir bactericidas para que los peces se protejan de patógenos sin necesidad de utilizar antibióticos.

Tabla 17.3. Proteínas recombinantes expresadas en microalgas
(Tomado y modificado de Barrera y Mayfield, 2013).

Proteína	Fuente original del gen	Plataforma de expresión
Dominio C-terminal del antígeno principal apical AMA1 fusionado a una almidón sintasa (GBSS)	<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Dominio C-terminal de la proteína principal de superficie (MSP1) fusionada con una almidón sintasa (GBSS)	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Dominio de unión D2 de fibronectina de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionado con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB-D2)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Anticuerpo IgG1 (83K7C)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Ácido glutámico descarboxilasa 65 (hGAD65)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Proteína	Fuente original del gen	Plataforma de expresión
Proteína amiloide A sérica bovina (M-SAA)	<i>Bos taurus</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Proteína E2 del virus de la peste porcina (CSVF-E2)	Virus de la peste porcina clásica	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Metalotioneína-2 (hMT-2)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Anticuerpo monoclonal HSV8-lsc	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Subunidad B de la toxina del cólera fusionada con la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (CTBVP1)	<i>Vibrio cholerae</i> , virus de la fiebre aftosa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Protocolo para la transformación de cloroplastos de microalgas por el método de biobalística.

La transformación por balística se realiza mediante el uso de una pistola de partículas (genes) en una cámara de vacío, utilizando procesos físicos para transferir el ADN a las células vivas. Debido a la ausencia de restricciones biológicas, la transformación por balística no se limita a tipos celulares, especies o genotipos específicos, tampoco existen limitaciones en los vectores o en el tamaño de ADN a insertar, secuencia o conformación. El principio físico en el que se basa este tipo de transformación representa una tecnología de transformación genética universal y se ha utilizado con éxito en casi todos los grupos de organismos. La balística (también llamada biobalística) brinda la oportunidad de transformar de manera estable los genomas pequeños de los dos orgánulos celulares que contienen ADN, mitocondrias y plástidos.

El método de biobalística se basa en la utilización de microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos con el ADN que se desea transferir y que son disparados sobre los cultivos a altas velocidades, atraviesan la pared y la membrana celular y llevan al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma. En esta sección se describen los diferentes pasos de un protocolo de biobalística para la transformación de microalgas .

Preparación de cultivos para la balística

La cepa que se desea transformar deberá ser cultivada en medio líquido de acuerdo con las necesidades nutrimentales de la microalga seleccionada. El

cultivo debe encontrarse en fase exponencial el día que se llevará a cabo el disparo con el equipo de balística.

Preparación de la suspensión de micropartículas de oro

Las partículas de oro que se utilizan para el bombardeo deben ser preparadas por lo menos con un día de anticipación.

1. Pesar 50 mg de partículas de oro $0.6\mu\text{m}$ (Bio-Rad) en un tubo de 1.5 mL.
2. Agregar 1 mL de etanol grado reactivo al 100% y mezclar en vortex durante 3 minutos, centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
3. Descartar el sobrenadante y añadir 1 mL de etanol grado reactivo al 70%, mezclar con vortex durante 2 min.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 min, agitando cada 5 min.
5. Centrifugar por 3 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 1 mL de agua estéril, y mezclar con vortex durante 1 min, hasta que las partículas queden suspendidas completamente.
7. Dejar a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que las partículas sedimenten en el fondo.
8. Centrifugar durante 2 min a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
9. Repetir el lavado cinco veces, o hasta que la pastilla se suspenda con facilidad.
10. Finalmente agregar 850 μL de glicerol al 50%. La suspensión de partículas de oro preparadas se almacena a -20°C hasta el momento de usarlas.

Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés

1. Mezclar en vortex la suspensión de partículas de oro previamente preparadas
2. Tomar 50 μL de estas partículas y en estricto orden agregar: 10 μL de ADN plasmídico (a una concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 50 μL de CaCl_2 2.5M recién preparado y 20 μL de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución agitar con vortex durante 5 segundos, posteriormente mezclar con vortex durante 20 min a 4°C .
3. Agregar 200 μL de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar en vortex durante 5 s.

4. Centrifugar durante 30 s a 13,000 rpm.
5. Desechar el sobrenadante y repetir los lavados con etanol 5 veces.
6. Suspender las partículas en 35µL de etanol al 100% y dejar en hielo hasta su uso.

NOTA: Este material es suficiente para 6 bombardeos y debe ser preparado el mismo día que se realizará el experimento. Macro y micro acarreadores, así como los discos de ruptura se esterilizan con etanol absoluto por 10 minutos. Dejar secar antes de usar (Figura 17.8).

Condiciones de biobalística para microalgas

- Discos de ruptura: 1100 psi
- Distancia: 9 cm
- Vacío: 15 pulgadas Hg
- Partículas de oro: 1 µm de diámetro

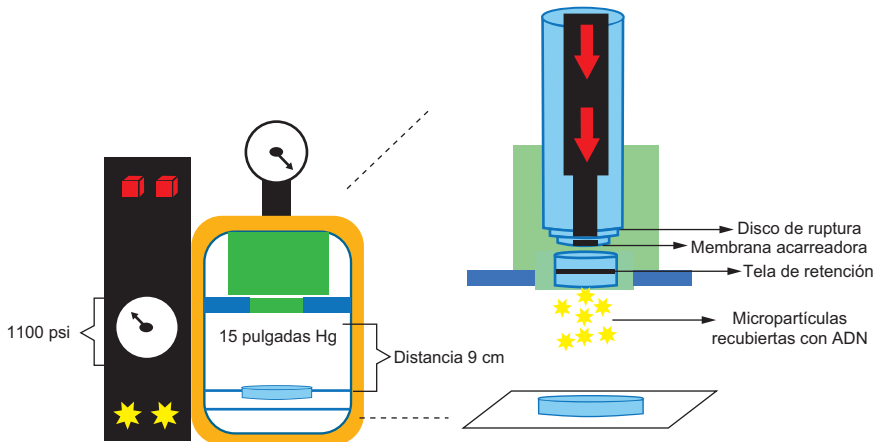


Figura 17.8. Esquema del equipo de biobalística, el diseño permite modificar las condiciones de disparo.

Resultados esperados de la técnica de balística.

Posterior al bombardeo es necesario esperar 3 días para resembrar las microalgas en medio selectivo, después de la segunda resiembra se podrá empezar a descartar las clonas no resistentes, pues estas no sobrevivirán a la exposición del agente de selección. Las resiembras deben llevarse cada 15 días, después de la resiembra número 5 las cepas resistentes se crecen en medio líquido para comenzar con la caracterización molecular de las transformantes. Un primer análisis consiste en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Debido a que se conoce la longitud y la secuencia de nucleótidos que se insertó en el genoma del cloroplasto, es posible diseñar oligonucleótidos específicos que ayudarán a amplificar el transgén, comprobando de esta manera la presencia del gen de interés (Fig. 17.9).

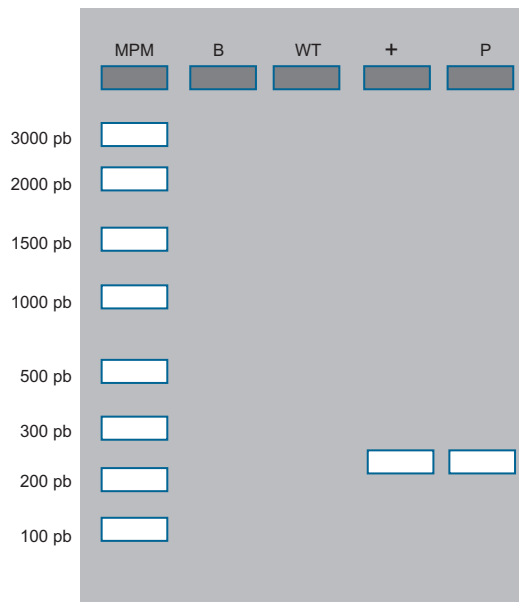


Figura 17.9. Esquema del análisis de un gel por electroforesis para la identificación de un fragmento de 230 pb donde MPM: marcador de peso molecular; B: blanco de reacción; WT: cepas no transformadas de la microalga de elección; +: Plásmido utilizado para la transformación; P: Muestra problema.

Obtención de clonas homoplásticas

Cuando ocurre la transformación en los plástidos, solo algunas copias en el ADN del cloroplasto contienen la secuencia objetivo, a lo que se le conoce como transformación heteroplásmica. Eventualmente todas las copias de ADN del plastóma con las resiembras consecutivas en medio selectivo adquirirán el transgén en todas las copias del plastóma, esto permitirá la obtención de clonas homoplásticas.

Esta identificación puede llevarse a cabo también mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que hibriden en genes constitutivos localizados río arriba y río abajo del sitio de inserción esperado (Fig. 17.10).

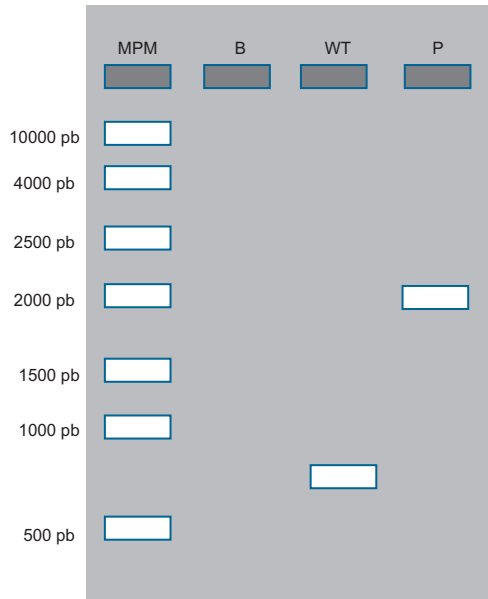


Figura 17.10. Esquema del análisis de homoplasia de la microalga de elección, se muestra en la imagen MPM: marcador de peso molecular; B: blanco de reacción; WT (cepa no transformada de la microalga de elección); P: cepa transformada y homoplástica.

Proteínas recombinantes producidas en microalgas

Péptidos hipocolesterolémicos

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un problema de salud pública por su alta prevalencia y constituyen la principal causa de muerte de la población adulta en la mayoría de los países. Aunque las tasas de mortalidad cardiovasculares han disminuido en países altamente desarrollados en las últimas décadas, las muertes y las enfermedades cardiovasculares han aumentado a un ritmo acelerado en los países subdesarrollados y en desarrollo. Entre otros factores, las enfermedades cardiovasculares se correlacionan principalmente con hipercolesterolemia.

Las hipercolesterolemias o también llamadas “dislipidemias” son una serie de enfermedades que se caracterizan por una alteración en los niveles sanguíneos del colesterol total, y/o del colesterol HDL (High Density Lipoprotein) y/o del colesterol LDL (Low Density Lipoprotein), y que algunas veces se acompaña, además, de niveles altos de triglicéridos. Las hipercolesterolemias pueden ser genéticas y se caracterizan por niveles especialmente elevados de colesterol y/o triglicéridos. También pueden ser secundarias a dietas inadecuadas, altas en grasas, especialmente saturadas y ácidos grasos trans; estos últimos están presentes en los denominados aceites animales o hidrogenados. Además, las personas con hipotiroidismo no tratado, enfermedades renales y diabetes mellitus pueden presentar dislipidemias. El tratamiento contra la hipercolesterolemia generalmente implica costos debido a la medicación continua y a las restricciones dietéticas a largo plazo. Durante mucho tiempo se ha trabajado en el desarrollo de nuevos medicamentos o en la explotación de los péptidos bioactivos presentes en los alimentos, que puedan ayudar en la prevención de las enfermedades.

Las proteínas presentes en la dieta son tradicionalmente conocidas como fuentes de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de diversas funciones corporales. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han adquirido un valor agregado debido al conocimiento de la actividad de los péptidos fisiológicamente activos. La actividad de dichos péptidos está basada en la composición de sus aminoácidos y su secuencia. De manera particular, las proteínas que se encuentran en la leche son consideradas la mayor fuente de péptidos bioactivos y son los más estudiados, dentro de los

péptidos derivados de la leche se encuentran los péptidos identificados como hipercolesterolémicos tales como lactostatina (IIAEK), enterostatina (VPDPR), DPR y LPYP; cada uno con mecanismos de acción diferente (Tabla 17.4).

Tabla 17.4: Secuencias de aminoácidos de péptidos reportados con actividad hipocolesterolémica (Modificado de González-Ortega *et al.*, 2014).

Secuencia	Referencia
VPDPR	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
GLDIQK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
VYVEEKPTPEGDLEILLQK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
ALPMH	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
IIAEK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
LPLPR	Takenaka <i>et al.</i> , 2001
LPYP	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
WGAPSL	Zhong <i>et al.</i> , 2007

La lactostatina (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys: IIAEK) fue el primer pentapéptido identificado como hipocolesterolémico y es derivado de la beta-lactoglobulina de la leche bovina. Actúa disminuyendo en suero lipoproteínas de baja densidad y tiene una mayor actividad hipocolesterolémica que el β -sitosterol, un fármaco conocido para el tratamiento de la hipocolesterolemia. Se ha propuesto que el mecanismo de acción es el siguiente: cuando el péptido lactostatina llega al hígado, regula la concentración de calcio intracelular, esta concentración está relacionada con la señalización de las MAPK; un grupo de ubiquitinas quinasas que al ser fosforiladas activan la enzima colesterol-7-hidroxilasa, involucrada en la ruta de síntesis del colesterol, dando como resultado el aumento de su actividad, oxidándose para formar sales biliares. Las sales biliares se secretan al intestino y se conjugan con los lípidos que se encuentran en él para formar micelas, éstas se absorben a través de las células de las mucosas intestinales por difusión pasiva para formar quilomicrones, en el sistema linfático estos quilomicrones permiten la captura del colesterol, principalmente el colesterol LDL.

Debido a que la síntesis química de péptidos es muy cara y difícil de escalar y a que se ha demostrado que la lactostatina es una molécula prometedora

para la prevención de la hipercolesterolemia, se ha planteado que las microalgas son un enfoque prometedor alternativo para ser utilizadas como fábricas de péptidos mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Además de la lactostatina, otros péptidos hipocolesterolémicos se han expresado en diversas plataformas (Tabla 17.5).

Tabla 17.5: Péptidos hipocolesterolémicos producidos en diferentes sistemas de expresión (Modificado de González-Ortega *et al.*, 2015).

Péptido	Sistema de expresión	Producción	Prueba de funcionalidad	Referencia
IIAEK	Arroz	2 mg/g de semilla seca	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratas a una dosis de 300 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Cabanos <i>et al.</i> , 2013
IIAEK	Arroz	1.6 mg/g de semilla seca	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratas a una dosis de 300 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Wakasa <i>et al.</i> , 2011
IIAEK	<i>E. coli</i>	29.9% de Proteína Total Celular	No reportado	Prak y Utsumi, 2009
VPDPR	<i>E. coli</i>	20% Proteína Total Celular	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratones a una dosis de 100 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Takenaka <i>et al.</i> , 2000, 2003
LPYPR	Soya	0.2 % Proteína Total Soluble	No reportado	Nishizawa <i>et al.</i> , 2008
LPLPR	<i>E. coli</i>	20% Proteína Total Celular	Contracción del íleo en cerdos	Takenaka <i>et al.</i> , 2001
LPYPR	<i>E. coli</i>	15% Proteína Total Celular	No reportado	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
DPR	<i>E. coli</i>	15% Proteína Total Celular	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratones a una dosis de 50 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Takenaka <i>et al.</i> , 2004, 2003
IIAEK	<i>C. reinhardtii</i>	2.2 a 5.5% Proteína Total Soluble	No reportado	López-Limón <i>et al.</i> , 2014

Se ha publicado el diseño de un gen sintético optimizado para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*, el cual contiene nueve repeticiones en tándem del péptido lactostatina y una etiqueta de histidina para facilitar su caracterización. Dicho gen fue clonado en los vectores p463 y p464, los cuales son específicos para el cloroplasto de *C. reinhardtii*. El vector p463 contiene el promotor *rbcL* mientras que el vector p464 contiene el promotor *atpA*. Las construcciones obtenidas fueron confirmadas por PCR, perfil de restricción y secuenciación. Estas construcciones fueron utilizadas para transformar el cloroplasto de la microalga mediante biobalística. Las posibles transformantes fueron seleccionadas después de 5 rondas de selección en medio con espectinomicina (100 mg/L). Después de la extracción de ADN genómico, las transformantes se identificaron por PCR y se cuantificó la proteína recombinante por ensayo de ELISA obteniendo una producción de entre 2.2 a 5.5% de proteína total soluble recombinante utilizando el vector p463 y p464, respectivamente. También fue posible identificar a la proteína por ensayos de Western blot. Para aumentar la presión de selección, en cada resiembra de las microalgas transformadas se fue incrementando la concentración de espectinomicina, siendo capaces de crecer hasta en 1500 mg/L de este antibiótico. Estos resultados demuestran que el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* puede servir como una plataforma de expresión para la producción de péptidos con actividad hipocolesterolemica. Sin embargo, aún no se reporta la funcionalidad de dicho péptido.

Péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo de alta prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV). Se estima que cerca de 1.13 billones de personas padecen hipertensión. El término “hipertensión arterial” se refiere a la elevación crónica de la presión sanguínea sistólica, se produce cuando el corazón se contrae; la presión diastólica, se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro; cuanto más alta se mantiene la presión (sistólica o diastólica) mayores son la morbilidad y la mortalidad de las enfermedades cardiovasculares.

Los valores normales de ambas presiones, sistólica y diastólica, son particularmente importantes para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro o los riñones y para la salud, y el bienestar en

general. La HTA se está convirtiendo en un problema de salud cada vez más común debido al aumento de la longevidad y la prevalencia de los factores que contribuyen a su desarrollo como la obesidad, la inactividad física y la dieta poco saludable. Dentro de las estrategias que se siguen para el tratamiento de la HTA se encuentran una variedad de modificaciones en el estilo de vida del paciente que incluyen la pérdida de peso en personas con sobrepeso, la actividad física, la moderación de la ingesta de alcohol, en el consumo de frutas y hortalizas frescas y la reducción de la ingesta de grasa saturada y sodio en la dieta. La decisión de iniciar un tratamiento farmacológico depende de los niveles de la presión arterial y del riesgo cardiovascular global del paciente.

Los principales medicamentos utilizados para el tratamiento de reducción de la presión arterial son los siguientes: diuréticos, betabloqueantes, antagonistas del calcio, inhibidores de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina), antagonistas de la angiotensina II y bloqueadores alfa adrenérgicos. Algunos de estos medicamentos poseen ciertas contraindicaciones o se deben utilizar con precaución en ciertas condiciones (Tabla 17.6).

Tabla 17.6.- Contraindicaciones y precauciones de fármacos antihipertensivos (Modificado de WHO, Hypertension guidelines; 2019)

Fármaco	Contraindicaciones	Fármaco	Precauciones
IECA	Embarazo Hipertensión Estenosis bilateral de arteria renal	α - bloqueadores Clonidina	Insuficiencia cardíaca congestiva Síndrome de abstinencia
β bloqueadores	Bloqueo auriculoventricular de alto grado Bradicardia severa Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El fenómeno de Raynaud	Metildopa Reserpina Bloqueadores de canales de calcio	Hepatotoxicidad Depresión Úlcera péptica Insuficiencia cardíaca congestiva

Además de los fármacos, en varios estudios se ha reportado que ciertos péptidos bioactivos presentan actividad antihipertensiva, los cuales se han obtenido a partir de las proteínas de distintos alimentos, tanto de origen animal como vegetal. Los principales péptidos antihipertensivos son aquellos que provienen de las proteínas derivadas de la leche y del huevo.

El primer péptido antihipertensivos reportado en el huevo fue un octapéptido con la secuencia de aminoácidos Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL). Esta secuencia está presente en la ovoalbúmina, que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo. El péptido en cuestión mostró actividad vasodilatadora parcialmente dependiente de endotelio en arterias mesentéricas caninas y se denominó ovokinina. La ovokinina mostró efectos antihipertensivos cuando se administró en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en dosis altas. El efecto antihipertensivo de este péptido se potenciaba cuando el péptido se administraba oralmente a las ratas emulsionado en yema de huevo. Se postuló que los fosfolípidos de la yema de huevo aumentaban la disponibilidad oral de la ovokinina porque mejoraban su absorción intestinal y porque protegían al péptido de la digestión por las peptidasas intestinales.

El segundo péptido aislado de las proteínas del huevo fue un hexapéptido con actividad relajante vascular que se caracterizó como el fragmento 2-7 de la ovokinina; su secuencia es: Arg-Ala-Asp-His-Phe-Leu (RADHPF). Esta secuencia se purificó a partir de un hidrolizado de ovoalbúmina con quimiotripsina. Este péptido causa relajación del endotelio de las arterias mesentéricas de las ratas espontáneamente hipertensas. Esta relajación esta principalmente mediada por óxido nítrico. Se demostró que la presión arterial de las ratas SHR disminuía cuando se administraba por vía oral dosis de ovokinina (2-7) diez veces inferiores a las dosis eficaces de ovokinina. Se comprobó que la administración intravenosa de ovokinina (2-7) no causaba cambios significativos en la presión arterial de las ratas SHR. La administración a concentraciones muy elevadas del péptido por esta vía sólo ocasionaba, paradójicamente, una leve disminución de esta variable.

Se ha intentado mejorar la actividad de los péptidos antihipertensivos administrados por vía oral mediante modificaciones estructurales. Se han sintetizado, por ejemplo, algunos derivados de la ovokinina (2-7), entre ellos, podemos destacar el péptido Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp (RPLKPW) denominado novokinina. Esta secuencia ha mostrado mayor actividad que la ovokinina (2-7) tras su administración oral a las ratas SHR. Las sustituciones de aminoácidos realizadas a este péptido le confieren, probablemente, mayor resistencia a las proteasas del tracto digestivo.

También se han reportado péptidos antihipertensivos en bacterias ácido-lácticas tales como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* o *Lactococcus lactis* subs. *cremoris*) en los que la

acción antihipertensiva se debe a la presencia de los péptidos formados por Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) los cuales han demostrado su efectividad para disminuir la presión arterial en ratas hipertensas alimentadas con estos péptidos por 5 días.

A pesar de las ventajas que representan los péptidos antihipertensivos, la principal limitante que muestran es la baja concentración a la que se encuentran en los alimentos y dificultades en los procesos de purificación debido a su bajo peso molecular. Estas limitantes han planteado la necesidad de desarrollar nuevos enfoques haciendo uso de la tecnología del ADN recombinante.

Se han producido en *Chlamydomonas reinhardtii* péptidos antihipertensivos mediante el diseño de un gen sintético con repeticiones en tándem del péptido VLPVP. Se confirmó por PCR la presencia del transgén en las cepas de *C. reinhardtii* modificadas genéticamente. Mediante análisis por ELISA, usando un anticuerpo anti-VLPVP, se determinó que la cantidad de péptido recombinante en las microalgas fue entre 0.87 a 1.58 mg/ mL de proteína total soluble. Después de liofilizar la biomasa resultante se encontró que la producción más alta fue de 0.292 mg de proteína recombinante por mg de biomasa. Con dicha biomasa se simuló una digestión intestinal utilizando tres proteasas (pepsina, tripsina y quimiotripsina); el hidrolizado resultante se analizó por HPLC y se logró identificar al péptido VLVPV por comparación de los tiempos de retención con un estándar obtenido por síntesis química. Además, se demostró que la administración intragástrica de la biomasa de la cepa modificada genéticamente a ratas espontáneas hipertensas a una dosis de 30 mg/Kg de peso de proteína recombinante redujo significativamente la presión arterial sistólica en 6h. De igual manera, a la misma dosis, la proteína recombinante mostró un efecto inhibitorio de la ECA en ensayos *in vitro* en plasma y pulmón macerado, lo que explicaría el mecanismo de acción de este péptido antihipertensivo. Este fue el primer estudio que mostró el potencial de *C. reinhardtii* para producir un péptido antihipertensivo como suplemento alimenticio para pacientes con hipertensión. Cabe señalar, además, que no se requirió un proceso de purificación del péptido para obtener una disminución en la presión arterial.

En *C. reinhardtii* se han expresado los péptidos RPLKPW, LKPNM, y AINPSK, los cuales han demostrado actividad antihipertensiva. En este trabajo se diseñó una proteína de fusión conteniendo los tres péptidos mencionados, unidos por varios aminoácidos correspondientes a los sitios de corte de las proteasas gastrointestinales más comunes. El gen que codifica para di-

cha proteína de fusión se optimizó para su expresión en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Los análisis moleculares confirmaron la presencia del transgén insertado en el genoma del cloroplasto de la microalga. De los 3 péptidos incluidos en la proteína de fusión, solo los péptidos RPLKPW y AINPSK fueron identificados por HPLC después de una digestión gastrointestinal *in vitro* usando la biomasa liofilizada. Se propone que el péptido LKPNM que no se identificó pudo ser degradado por proteasas. La actividad antihipertensiva fue evaluada usando el modelo de ratas espontáneamente hipertensas mediante administración intragástrica de la biomasa resuspendida en agua usando 10 mg de proteína recombinante/ kg de peso. La mayor disminución de la presión arterial se observó a esta dosis después de 6h de administración.

Estos resultados sugieren que estas cepas transplastómicas podrían usarse para obtener una gran cantidad de péptidos antihipertensivos que podrían ser útiles para la producción de alimentos funcionales.

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) forman parte importante del sistema inmune innato y se encuentran en distintos organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Se conocen como sustancias polifacéticas que presentan complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción del patógeno a través de su membrana, o afectando puntos específicos internos, como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas, incluso interactuando con el huésped con funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización.

Estos péptidos se singularizan por ser pequeños (entre 5 y 50 residuos de aminoácidos), altamente catiónicos y anfipáticos. Tienen amplio espectro y sus mecanismos de acción se caracterizaron en términos de interacciones péptido-membrana, induciendo la destrucción de la membrana a través de poros. Algunos PAM actúan solo contra las bacterias planctónicas, y otros que solo atacan a las bacterias que están organizadas en una estructura compleja, conocida como biofilm, que es responsable de la mayoría de las infecciones clínicas. Algunos péptidos tienen propiedades antivirales o antifúngicas, e incluso actividad anticancerígena.

La generación de resistencia a los péptidos antimicrobianos es mucho menor si se compara con la generada con los antibióticos convencionales, existen

mecanismos de resistencia de los PAM ya descritos, como la degradación de proteasas, la liberación de proteínas inhibitoras o los cambios de conformación de la membrana externa del patógeno. El estudio de estas sustancias ha permitido evidenciar su uso potencial en el ámbito clínico para contrarrestar los inconvenientes de la resistencia a los antibióticos. Los péptidos antimicrobianos muestran grandes expectativas para abordar el problema de resistencia a los antibióticos y antimicrobianos ya que es un motivo de preocupación mundial según datos y cifras de la OMS (Organización Mundial de la Salud), debido a que esta se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos). Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Esto supone un gran riesgo de salud y una preocupación que requiere de medidas inmediatas pues al aparecer nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad, la prolongación de la enfermedad y la muerte, esto supone un aumento en el costo de la atención sanitaria por la mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva.

Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.

Las bacterias son los patógenos más estudiado para reconocer los mecanismos de acción y son responsables de infecciones clínicas frecuentes; actualmente hay un gran énfasis en las cepas ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter species*), y otras especies multirresistentes. Las bacterias gram negativas tienen una membrana lipídica externa rica en lipopolisacáridos (LPS), una región intermedia compuesta de peptidoglicanos y una membrana lipídica interna que contiene cardiolipina en las regiones apicales. Las bacterias gram positivas tienen una gruesa matriz de peptidoglicanos, enriquecidos en ácidos teicoicos y teicurónicos.

Biológicamente, al inicio, los PAM interactúan con los fosfolípidos de la membrana de la célula huésped (Figura 17.11).

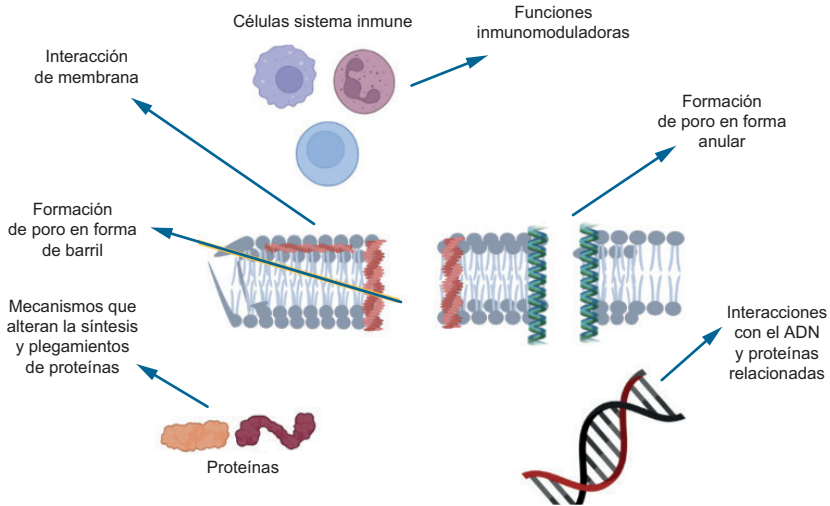


Figura 17.11. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.
(Tomado y modificado de Téllez y Castaño, 2010).

A continuación, se enuncian los pasos de esta interacción primaria:

a) Interacciones peptídicas iniciales con la membrana diana. Los PAM inicialmente atacan a los microorganismos a través de interacciones electrostáticas. Los PAM cargados positivamente y las membranas lipídicas de las bacterias cargadas negativamente forman un enlace mutuo y fuerte. En las bacterias gram negativas, la interacción implica un mecanismo llamado captación autopromocionada. Inicialmente reemplazan los cationes divalentes asociados con LPS y luego desestabilizan la membrana microbiana. Para los PAM, algunos estudios han sugerido que la afinidad de unión a LPS es tres veces mayor en comparación con los cationes divalentes. En bacterias gram positivas, la presencia de ácido teicoico cargado negativamente y el ácido teicurónico en la pared celular los sensibiliza a la capacidad de destrucción del PAM con carga positiva. El modelo de membranas ha demostrado el requisito de un gradiente electroquímico mínimo para la actividad óptima de los PAM.

b) Eventos en membrana. Los PAM crean poros en la membrana del hospedador que conducen a la filtración de iones y metabolitos, lo que causa la despolarización y la pérdida de la respiración acoplada a la membrana y la síntesis de biopolímeros. Estos eventos conducen a la muerte celular. En algunos casos, la membrana del huésped sufre perturbaciones mínimas, pero los procesos intracelulares se interrumpen.

c) Disfunción de membrana. Los mecanismos reconocidos por los cuales los PAM rompen la membrana de la bicapa lipídica de sus objetivos se describen a continuación (Figura 17.12):

- i. Poro en forma de barril. Los péptidos son lo suficientemente largos como para penetrar perpendicularmente en la membrana y formar un poro en forma de barril a través de la bicapa lipídica. El lumen central está compuesto por regiones hidrófobas del péptido rodeadas por la región media de la bicapa de fosfolípidos y la parte interior del canal está compuesta por regiones hidrófilas del péptido.
- ii. Poro en forma anular. El poro está compuesto en parte de péptido y fosfolípido ya que los PAM causan que los fosfolípidos de las dos capas formen una curvatura. Después de la acumulación de los péptidos, se dobla alrededor de un canal central que finalmente comprende el poro transmembrana.
- iii. Modelo de alfombra. Los PAM se unen electrostáticamente a la membrana en una orientación paralela. Después de su acumulación, forman una estructura similar a una alfombra en la membrana de fosfolípido. Cuando alcanzan un umbral de concentración, se desintegran y permeabilizan la membrana mediante un proceso similar al detergente y forman micelas.

d) Inhibición de la síntesis de biopolímeros extracelulares. La inhibición de la biosíntesis de algunos compuestos macromoleculares, incluyendo peptidoglicanos (PGN) (en bacterias grampositivas) y LPS (en bacterias gramnegativas) como el componente principal de su pared celular y membrana externa, es un importante mecanismo de acción de los PAM. La biosíntesis de PGN está relacionada estructuralmente con la integridad y la función de la membrana. Los PAM se unen a los precursores de PGN en lugar de a las enzimas que ayudan

en su síntesis e interfieren con otros procesos de formación de PGN al obstruir estéricamente la actividad de la enzima en lugar de afectar directamente la enzima. El objetivo deseado para los PAM es el lípido II, un importante precursor de la PGN, el PAM se une al lípido II por diferentes motivos de unión y, por consiguiente, inhibe la biosíntesis de la pared celular.

e) Inhibición de las funciones intracelulares. La inhibición de algunos procesos intracelulares clave, como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la interacción con ATP y la inhibición directa de las acciones de ciertas enzimas dependientes de ATP son otros mecanismos utilizados por las PAM para causar la muerte celular.

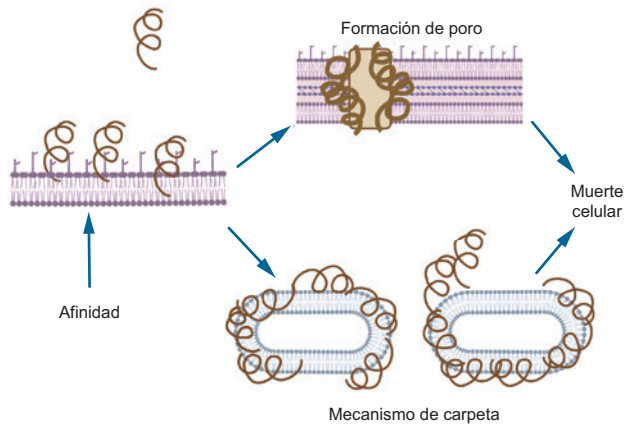


Figura 17.12. La interacción péptido-membrana desemboca en la muerte del patógeno blanco. Modificado de Ciurac *et al.*, 2019.

Clasificación de los péptidos antimicrobianos.

Los PAM son un grupo único y diverso de moléculas, que está dividido en 4 subgrupos dado por su contenido de aminoácidos y estructura.

Grupo 1. Contiene péptidos antimicrobianos aniónicos y son muy pequeños. Se encuentran en extractos surfactantes, fluidos de lavados bronquial alveolares y células epiteliales del tracto respiratorio. Son activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Grupo 2. Lo forman alrededor de 290 péptidos catiónicos y tienen un tamaño de 40 aminoácidos (PM aproximado de 4,000 Da); carecen de residuos de cisteína y algunas veces tienen una bisagra en el centro. En solución acuosa, muchos de estos péptidos no tienen estructura definida, pero en presencia de trifenetanol, SDS, micelas, vesículas fosfolipídicas, liposomas o lípido A, toda la molécula o una parte de ésta adopta una estructura de α -hélice.

Grupo 3. Dentro de esta categoría se encuentran aproximadamente 44 péptidos catiónicos. Estos péptidos carecen de residuos de cisteína y son lineares, aunque algunos pueden formar estructuras de giros extendidos.

Grupo 4. Está formado por péptidos catiónicos y aniónicos, consta de 380 péptidos los cuales contienen residuos de cisteína, forman enlaces disulfuro y estructuras β -plegadas estables. Estos fragmentos tienen actividad antimicrobiana, sin embargo, su papel en la inmunidad innata no es claro.

Otra clasificación para los péptidos antimicrobianos está en relación con los patógenos contra los cuales tienen mayor acción, dentro de esta clasificación están los antibacteriales, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios. La acción de estos antimicrobianos es proporcional a sus mecanismos de acción.

El péptido antimicrobiano Flo, proveniente del árbol de *Moringa oleifera* se ha expresado en el cloroplasto de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*, después de la transformación por biobalística se verificó la inserción del transgén por PCR y se comprobó la homoplasia en las líneas resistentes a espectinomicina. Los ensayos antimicrobianos demostraron que la proteína total soluble e insoluble de la cepa de *N. oculata* transformada es capaz de inhibir el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Aunque la meta de utilizar nuevas alternativas para la producción de péptidos antimicrobianos que puedan ser útiles como coadyuvantes en la terapia con antibióticos o su completa sustitución para reducir la multi-resistencia aún es lejana; estos resultados son prometedores y demuestran que la transformación del cloroplasto de estas 3 especies de microalgas funciona como una plataforma de expresión estable para la producción del péptido Flo con potencial para ser utilizado como antibacteriano.

Enfoques emergentes sobre la producción de proteínas recombinantes en microalgas

El uso de microalgas como biofábricas de proteínas recombinantes es una aplicación industrial novedosa y prometedora. Sin embargo, existen ciertos puntos que dificultan la producción recombinante y sobre los cuales se está trabajando. Actualmente, la velocidad a la que se pueden producir y probar nuevas líneas transgénicas de microalgas es un punto de inflexión ya que la gran mayoría de la investigación referente a la expresión recombinante en el cloroplasto implica construcciones de un solo gen utilizando enfoques convencionales de clonación basados en enzimas de restricción, lo cual incrementa el tiempo de obtención de transformantes. Con los nuevos avances sobre la aplicación de los principios de la biología sintética a la ingeniería de plastómas, en un futuro cercano se podrán contar con estrategias de diseño más ambiciosas que implican un rediseño *in silico* extenso del plastóma. Con este rediseño se podría editar el genoma del plastóma en diversas formas como: eliminación de porciones de ADN no esenciales, la refactorización o reestructuración de los genes endógenos esenciales en grupos funcionales y manipulación de múltiples transgenes en diferentes loci. El ensamblaje y la entrega de tales genomas sintéticos es técnicamente factible, lo cual se demostró al trabajar con el plastóma de *C. reinhardtii*, que fue ensamblado en una levadura para posteriormente transformar células de *C. reinhardtii* mediante bombardeo con micropartículas. Este sistema permite la generación de modificaciones genéticas simultáneas, sistemáticas y complejas en múltiples loci *in vivo*. Ahora bien, el desafío es desarrollar estrategias de selección que permitan el reemplazo limpio del plastoma endógeno con la versión sintética sin eventos de recombinación indeseables.

Otro desafío es mejorar significativamente el rendimiento del producto mediante el uso de elementos *cis* sintéticos para impulsar la expresión. Actualmente, los promotores y las UTR 5' utilizados para expresar transgenes se derivan de genes fotosintéticos endógenos. En algunos casos, los niveles de expresión pueden mejorarse utilizando el promotor más fuerte del gen para el RNA ribosómico 16S fusionado a la UTR 5' de un gen fotosintético. Incrementar los estudios sobre el diseño de promotores sintéticos y UTR, además de un mejor conocimiento de las reglas de optimización de codones, incrementarán el rendimiento promedio de proteína recombinante desde el valor actual de ~

1% TSP al nivel >10% requerido para una plataforma comercial. Este aumento en el rendimiento debe ir acompañado de mejoras en la producción de biomasa de algas fototróficas para que la plataforma sea comercialmente competitiva. Dichas mejoras serán el resultado de una combinación de optimización de medios de cultivo, mejoras en el diseño del fotobiorreactor (PBR) y domesticación de la cepa, por ejemplo, la selección de mutantes con un tamaño reducido de antenas cosechadoras de luz que muestran una mayor productividad en PBR como consecuencia de una mayor penetración de la luz.

Por otra parte, el uso de antibióticos para recuperar líneas transgénicas se considera un cuello de botella hacia la comercialización, ya que además de las preocupaciones de seguridad, la expresión de genes desintoxicantes de antibióticos consume recursos celulares para su expresión, lo que resulta en una carga metabólica en la maquinaria celular. Sin embargo, se han desarrollado estrategias para obtener células transformadas de *C. reinhardtii* sin utilizar marcadores de selección. Las microalgas han demostrado su utilidad y potencial como plataformas de producción de proteínas y péptidos terapéuticos, y ahora parecen estar preparadas para convertirse en la alternativa “verde” de los sistemas actuales de producción de proteínas recombinantes tradicionales.

Abreviaturas

aadA: Aminoglucósido adeniltransferasa
 ADN: Ácido Desoxirribonucleico
 ADN-T: Ácido Desoxirribonucleico de Transferencia
aphA-6: aminoglucósidos fosfotransferasa
 ARN: Ácido Ribonucleico
 ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero
 ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosomal
 ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo
 ATP: Adenosín Trifosfato
atpA: Promotor de ATP sintasa
badh: betaína aldehído deshidrogenasa
 CL4: Anticuerpo monoclonal contra hepatitis
 CYC6: Citocromo C6
 DO: Densidad Óptica

ECV: Enfermedades Cardiovasculares
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina
ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter espe-*
cies
GRAS: Generalmente Reconocidas Como Seguras
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HEPES: Ácido Hidroxietil Piperazina Etanosulfónico
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSP70A: Proteína de choque térmico 70 A
HTA: Hipertensión arterial
LDL: Lipoproteína de baja densidad
LPS: lipopolisacáridos
MPM: Marcador Peso Molecular
NB: Caldo Nutritivo
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAM: Péptido Antimicrobiano
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG: Polietilenglicol
PGN: Peptidoglicanos
pH: Potencial de Hidrógeno
PM: Peso Molecular
RUBISCO: Unidad Pequeña de la Ribulosa Bifosfato Carboxilasa
RSCBS2: Subunidad pequeña 2 de la RUBISCO
SHR: Ratas Espontáneamente Hipertensas
SiC: Carburo de Silicio
TAP: Tris acetato fosfato
TMP: Potencial Transmembrana
UTR: Región no Traducida
WT: Tipo Silvestre
YM: Agar para levaduras y mohos

Glosario

Acarreadores: Molécula que transporta o traslada a otra.

Ácidos nucleicos: Biomoléculas que cumplen funciones esenciales en todas las células y virus.

Antihipertensivos: Medicamentos utilizados para disminuir el riesgo cardiovascular en los pacientes con hipertensión arterial controlando la presión.

Beta-globulina: Es un conjunto de proteínas presentes en la sangre que sirven para el transporte de diferentes sustancias.

Biotecnología: Agrupa todo el conjunto de técnicas, procesos y métodos que utilizan organismos vivos, como las bacterias, hongos y virus, partes de ellos o sistemas biológicos derivados de los mismos. Esto con la finalidad de generar y/o mejorar bienes y/o procesos que sean de interés para el ser humano.

Cepa: Población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular.

Clonas: Réplica genética de otra célula, tejido u organismo.

Clorófitas: División de algas verdes que incluye especies de organismos eucariotas en su mayoría acuáticos fotosintéticos.

Cloroplasto: Organelo encargado de llevar a cabo la fotosíntesis en plantas; estos evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas.

Diatomeas: Grupo de algas unicelulares que constituyen uno de los tipos más comunes de fitoplancton.

Dinoflagelados: Extenso grupo de protistas flagelados.

Endosimbiosis: Describe el paso de las células procariotas a células eucariotas mediante incorporaciones simbiogénicas de bacterias.

Espermidina: Poliamina estable e higroscópica encargada de modular la actividad enzimática de la lisozima y de la fosfatasa alcalina, mantiene el potencial de membrana, y controla el volumen y el pH intracelular.

Expresión transitoria: Proceso por el cual la información codificada por un gen se encuentra de forma variable y limitada en tiempo.

Fotoautótrofo: Organismos fotótrofos capaces de tomar fotones de la luz solar como fuente de energía.

Fotosíntesis: Proceso químico que se produce en las plantas, las algas y algunos tipos de bacterias cuando se exponen a la luz del sol.

Genes: Es la unidad física y funcional básica de la herencia. Los genes están formados por ADN.

Genoma: Conjunto formado por el material genético del ADN.

Heterólogos: Genes que tienen diferente origen y función.

Heteroplastia: Presencia de más de un tipo de genoma dentro de una célula vegetal.

Heterótrofo: Organismo que no puede producir su propio alimento, sino que se nutre de otras fuentes de carbono orgánico, principalmente materia vegetal o animal

Homología: Estudio comparativo de los seres vivos, la homología es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes de dos organismos distintos cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Homoplastia: Presencia de un único tipo de ADN en el plástido.

Ingeniería Genética: Es un proceso que emplea tecnologías de laboratorio para alterar la composición del ADN.

Marcador de selección: Es un segmento de ADN con una ubicación física conocida en un cromosoma.

Nucleótidos: Estructura fundamental básica de los ácidos nucleicos (ARN y ADN).

Nutracéuticos: Producto presentado como una alternativa farmacéutica que dice tener beneficios fisiológicos.

Oligonucleótidos: Segmentos cortos monocatenarios o bicatenarios de ácidos nucleicos que se unen entre sí para formar polímeros biológicos monocatenarios.

Péptido: Molécula formada por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Plásmidos: Molécula de ADN circular que se encuentra en las bacterias y algunos otros organismos microscópicos.

Plástidos: Orgánulos celulares eucarióticos, propios de las plantas y algas.

Plastoma: Es el genoma cloroplástico, también llamado ADN cloroplástico, es el material genético de los cloroplastos, los orgánulos citoplasmáticos característicos de los organismos autótrofos fotosintéticos, tales como las plantas y las algas.

Promotores: Es una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN al ARN.

Proteínas: Moléculas complejas que desempeñan muchas funciones críticas en distintos organismos.

Proteínas glicosiladas: Proteínas a las que se le ha añadido una cadena de glúcidos.

Recombinación Homóloga: Es un tipo de recombinación genética en la que las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN.

Secuencias Intrónicas: Secuencia de ADN que forma parte de un gen pero no codifica ninguna secuencia de aminoácidos de la proteína respectiva.

Suspensión: Mezcla heterogénea de sustancias compuesta por un sólido fino disperso en un líquido.

Transgén: Gen o material genético que ha sido transferido de un organismo a otro, ya sea de forma natural, o artificial.

Vector de transformación: Son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante.

Vortex: Mezclador de vórtice, dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos.

Bibliografía

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. & Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3131-138. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75878-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75878-3)

Adachi, T., Sahara, T., Okuyama, H., & Morita, N. (2017). Glassb-based genetic transformation: An efficient method for transformation of *Thraustochytrid* Microorganisms. *Journal of Oleo Science*, 795(7), 791-795. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17084>

Adem, M., Beyene, D., & Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 13(30). <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0179-1>

Arce-Montoya, M., Fernández-González, J. A., Rojas-Arzaluz, M., Palacios-López, O.A., Garza-Avelar, H.D. & Gómez-Anduro, G.A. (2017). Transformación genética de microalgas. En Arredondo-Vega, B.O., Vol-

- tolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. & Gómez-Anduro, G.A. (Eds.) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 130-143). La Paz, B.C.S.: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Barrera, D. J., y Mayfield, S. P. (2013). High-value Recombinant Protein Production in Microalgae. En A. Richmond y Q. Hu (Eds.) *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 532–544). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118567166.ch27>
- Beltran, J., Aguilera-Mendoza, L., & Brizuela, C. (2018). Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification: an evolutionary feature weighting approach. *BMC Genomics*, *19*(677), 79-102. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5030-1>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H. & Martin, C. (2018). Familial Hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Science*, *19*(11), 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Bertalan, I., Munder, M.C., WeiB, C., Kopf, J., Fischer, D. & Johanningmeier, U. (2015). A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, *195*, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.017>
- Cabanos, C., Ekyo, A., Amari, Y., Kato, N., Kuroda, M., Nagaoka, S., Takaiwa, F., Utsumi, S. & Maruyama N., (2013). High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. *Transgenic Research*, *22*(3), 629–621. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9672-5>.
- Carrizalez-López, C., González-Ortega, O., Ochoa-Méndez, C. E., Galván-Moreno, F. U., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., Bañuelos-Hernández, B., Paz-Maldonado, L. M. T., Castro-Moreno, P., Ibarra-Barajas, M., & Soria-Guerra, R. E. (2018). Expression of multiple antihypertensive peptides as a fusion protein in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, *30*(3), 1701-1709. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1339-4>
- Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S., & Bassi, R. (2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor.

- Biotechnology for biofuels*, 7(157). <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0157-z>
- Cha, T. S., Yee, W. & Aziz, A. (2012). Assessment of factors affecting *Agrobacterium* -mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1771–1779. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0991-0>
- Cha, T.S., Yee, W., & Azis, B.A. (2011). Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of microalgae. *Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow*, 633–637.
- Chang, L. (2018). *3D Nanochannel Array Platform for High-throughput Cell Manipulation and Nano-electroporation*. Tesis de doctorado. Universidad del estado de Ohio.
- Cheng, R., Ma, R., Li, K., Rong, H., Lin, X., Wang, Z. Yang, S. & Ma, Y. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological Research*, 167, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.003>
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X. & Lu, J. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
- Coll, J. M. (2006). Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(4), 316–330.
- Dávalos-Guzmán, S. (2019). *Expresión del péptido antimicrobiano Flo en microalgas*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- de Moura, R. S., Viana, F. S. C., Souza, M. A. V, Kovary, K., Guedes, D. C., Oliveira, E. P. B., Rubenich, L. M. S., Carvalho, L. C. R. M., Oliveira, R. M., Tano, T. & Correia, M. L. G. (2002). Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(11), 1515–1520. <https://doi.org/10.1211/002235702153>.
- Dehghani, J., Adibkia, K., Movafeghi, A., Maleki-kakelar, H., & Saeedi, N. (2020). Towards a new avenue for producing therapeutic proteins: Microalgae as a tempting green biofactory. *Biotechnology Advances*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107499>
- Domingues M.M., Felício M.R. & Gonçalves S. (2019). Antimicrobial peptides: *Effect on Bacterial Cells*. En Santos N., Carvalho F. (Eds.) *Atomic Force Microscopy*. (pp. 233-242). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_13

- Doron, L., Segal, N., & Shapira, M. (2016). Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications. *Frontiers in Plant Science*, 7(505), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>
- Dunahay, T.G., Adler, S.A. & Jarvik, J.W. (1997). Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers. En Tuan R.S. (Eds.), *Recombinant Gene Expression Protocols*. (pp. 503-509). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:503>
- Dyo, Y.M. & Purton, S. (2018). The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology*, 164(2), 113-121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000599>
- Elghabi, Z., Ruf, S. & Bock, R. (2011). Biolistic co-transformation of the nuclear and plastid genomes. *The Plant Journal*, 67, 941-948. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04631.x>
- Feng, S., Xue, L., Liu, H. & Lu, P. (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1433–1439. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9333-1>
- Fuentes, P., Armarego-Marriott, T. & Bock, R. (2018). Plastid transformation and its application in metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.004>.
- Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K., & Yoshikawa, M. (1995a). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16(5), 785-790. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)00054-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)00054-N)
- Fujita, H., Yamagami, T. & Ohshima, K. (2001). Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*, 21(8), 1149-1158. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00333-5).
- Galván, A., González-Ballester D. & Fernández, E. (2007). Insertional Mutagenesis as a Tool to Study Genes/Functions in *Chlamydomonas*. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds.), *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 77-89). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_7

- Gerken, H.G., Donohoe, B. & Knoshaug, E.P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237, 239–253. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>
- Gimpel J.A., Nour-Eldin H.H., Scranton M.A., Li D. & Mayfield S.P. (2016). Refactoring the six-gene Photosystem II core in the chloroplast of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 589–596. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00076>.
- Gómez-Espinoza, O; Garro-Monge, G; Peraza, J; NúñezMontero, K; Meneses-Montero, K. & Guerrero-Barrantes, M. (2018). Transformación genética de *Chlorella sorokiniana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Tecnología en Marcha*, 31(1), 160-166. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3505>
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. & Gao H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1879-1890. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1032-6>
- González-Martínez, L. (2016). *Análisis inmunológico de epítomos relevantes del virus sincicial respiratorio producidos en plantas*. Tesis de doctorado, Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología. Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología.
- González-Ortega, O., López-Limón, A. R., Morales-Domínguez, J. F., & Soria-Guerra, R. E. (2015). Production and purification of recombinant hypocholesterolemic peptides. *Biotechnology Letters*, 37(1), 41-54. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1657-4>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). *Agrobacterium* -mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances*, 37(1), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Guo, S. L., Zhao, X. Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, Md. A., Ho, S. H., Bai, F. W., & Chang, J.S. (2013). Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.020>

- Gupta, P.L., Lee, S.M., & Choi, H.J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World journal of microbiology and biotechnology*, 31(9), 1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
- Hancock, R. E. W., & Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(1), 79-83. <https://doi.org/10.2174/1568005024605855>
- Hernández-Esquivel, A.K. (2015). *Modificación genética de plantas mediante cisgénesis e intragénesis. ¿Un reto regulatorio?*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Imam, S. H., & Snell, W. J. (1988). The *Chlamydomonas* cell wall degrading enzyme, lysin, acts on two substrates within the framework of the wall. *Journal of Cell Biology*, 106, 2211–2221. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.6.2211>
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193-210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Jayant, P. R., Rajendra, M. G., Darasing, R. R. & Mahendra, D. (2017). A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3191–3207. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.373>
- Jinkerson, R. E., & Jonikas, M. C. (2015). Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *The Plant Journal*, 82, 393–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.12801>
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, volvocales). *Phycological Society of America*, 45, 642–649. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00688.x>
- Khatiwada, B., Kautto, L., Sunna, A., Sun, A., & Nevalainen, H. (2019). Nuclear transformation of the versatile microalga *Euglena gracilis*. *Algal Research*, 37, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.022>
- Kilian, O., Benemann, C.S., Niyogi, K.K., & Vick, B. (2014). High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21265-21269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105861108>
- Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), 1228-1232. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1228>
- Koo, J., Park, D. & Kim, H. (2013). Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae*, 28(4), 379-383 <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.4.379>.
- Kumar, A., Falcao, V. R., & Sayre, R. T. (2013). Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*, 2, 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.002>
- León, R., & Fernández, E. (2007). Nuclear Transformation of Eukaryotic Microalgae. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds) *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 1-11). Advances in Experimental Medicine and Biology. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_1
- Li, S. S., & Tsai, H. J. (2009). Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(2), 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.004>
- Lindholm, L.H., Ibsen, H., Dahlöf, B., Devereux, R. B., Beevers, G., Faire, U., Fyhrquist, F., Julius, S., Kjeldsen, S. E., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Nieminen, M.S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H., Aurup, P., Edelman, J., & Snapinn, S. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomized trial against Atenolol. *The Lancet*; 359(9311), 995-1003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08090-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08090-X)
- López-Limón A. R. (2014). *Producción de lactostatina en cloroplastos de Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Lu X.M., Yin W.B., & Hu Z.M. (2006). Chloroplast transformation. En: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 285-304). Methods in Molecular Biology™. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:285>.

- Maruyama, N., Mikami, B., & Utsumi S. (2011). The development of transgenic crops to improve human health by advanced utilization of seed storage proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 823-828. <https://doi.org/10.1271/bbb.100924>
- Matoba, N., Usui, H., Fujita, H. & Yoshikawa, M. (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxidemediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters*, 452(3), 181-84. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00587-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00587-6)
- Matoba, N., Yamada, Y., Usui, H., Nakagiri, R. & Yoshikawa M. (2001). Designing potent derivatives of Ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 65(3), 636-39. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.736>
- Mayfield, S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. & Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2), 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Meisel, H., Walsh, D.J., Murray, B.A., & FitzGerald, R.J. (2006). ACE inhibitory peptides. En Mine V, Shahidi F Taylor y Francis (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. (pp. 269-315). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028836.sec3>
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., & Ifuku, K. (2013). Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* by multi-pulse electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 874-876. <https://doi.org/10.1271/bbb.120936>
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747-767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>
- Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y., & Nagaoka, S. (2007). A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3), 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.090>.
- Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2-3), 99-101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01503-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01503-7)

- Muñoz, C. F., de Jaeger, L., Sturme, M. H. J., Lip, K. Y. F., Olijslager, J. W. J., Springer, J., Wolbert, E. J. H., Martens, D. E., Eggink, G., Weusthuis, R. A. & Wijffels, R. H. (2018). Improved DNA / protein delivery in microalgae – A simple and reliable method for the prediction of optimal electroporation settings. *Algal Research*, 33, 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.021>
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi K, Kanamaru Y, Taandashi K, & Kuwata T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 11-17. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4298>.
- Nimmo, I. C., Barbrook, A. C., Lassadi, I., Chen, J. E., Geisler, K., Smith, A. G., Aranda, M., Purton, S., Waller, R. F., Nisbet, R., & Howe, C. J. (2019). Genetic transformation of the dinoflagellate chloroplast. *eLife*, 8, e45292. <https://doi.org/10.7554/eLife.45292>
- Nishizawa, K., Kita, A., Doi, C., Yamada, Y., Ohinata, K., Yoshikawa, M., & Ishimoto, M. (2008). Accumulation of the bioactive peptides, novokinin, LPYPR and rubiscolin, in seeds of genetically modified soybean. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3301-3305. <https://doi.org/10.1271/bbb.80468>
- Niu, Y. F., Yang, Z. K., Zhang, M. H., Zhu, C. C., Yang, W. D., Liu, J. S., & Li, H-J. (2012). Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *Biotechniques*, 52(6), 1–3. <https://doi.org/10.2144/000113881>
- O'Neill, B.M., Mikkelsen, K.L., Gutierrez, N.M., Cunningham, J.L., Wolff, K.L., Szyjka, S.J., Yohn, C.B., Redding, K.E. & Mendez, M.J. (2012). An exogenous chloroplast genome for complex sequence manipulation in algae. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2782–2792. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1008>
- Ochoa-Méndez, C., Lara-Hernández, I., Aguirre-Bañuelos, P., Ibarra-Barajas, M., Castro-Moreno, P., González-Ortega, O., & Soria-Guerra, R. E. (2016). Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 240, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.001>.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *La resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>

- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine b-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526(2), 131-140. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00116-7).
- Ponce-Alonso, J. (2019). *Expresión del péptido antimicrobiano nisina en microalgas* [Tesis de maestría no publicada, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]
- Potvin, G., & Zhang, Z. (2010). Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.006>
- Prak, K., & Utsumi, S. (2009). Production of a Bioactive Peptide (IIAEK) in *Escherichia coli* using soybean proglycinin A1aB1b as a Carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3792-3799. <https://doi.org/10.1021/jf8034258>.
- Preza, A. M., Jaramillo, M. E., Puebla, A. M., Mateos, J. C., Hernández, R., & Lugo, E. (2010). Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds in relation with *in vitro* antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 61. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-61>
- Purton S. (2007). Tools and Techniques for Chloroplast Transformation of *Chlamydomonas*. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds.) *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 34-45). Advances in Experimental Medicine and Biology. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_4
- Radzun, K. A., Wolf, J., Jakob G., Zhang, E., Stephens, E., Ross, I., & Hankamer, B. (2015). Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 8-65. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0238-7>
- Rasala, B. A., Chao, S-S., Pier, M., Barrera, D. J., & Mayfield, S. P. (2014). Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *Plos One* 9(4), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094028>
- Rasala, B. A., Muto, M., Sullivan, J. & Mayfield, S.P. (2011). Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization. *Plant Biotechnology Journal*, 9(6), 674-683. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00620.x>

- Rochaix, J.D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual review of genetics*, 29, 209-230. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001233>
- Run, C., Fang, L., Fan, J., Fan, C., Luo, Y., Hu, Z. & Li, Y. (2016). Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research*, 17, 196–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.002>
- Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Rysz-Górzyńska, M., & Franczyk, B. (2020). The role and function of HDL in patients with chronic kidney disease and the risk of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 601. <https://doi.org/10.3390/ijms21020601>
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-440. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2).
- Santra, T. S. & Tseng, F. G. (2013). Recent trends on micro/nanofluidic single cell electroporation. *Micromachines*, 4, 333-356. <https://doi.org/10.3390/mi4030333>
- Scharff, L. B. & Bock, R. (2014). Synthetic biology in plastids. *Plant Journal*, 78(5), 783-798. <https://doi.org/10.1111/tpj.12356>
- Siddiqui, A., Wei, Z., Boehm, M. & Ahmad, N. (2020). Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/bab.1823>
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., & Mayfield, S. (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32(10), 1373–1383. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>
- Spence, J. D., Barnett, P. A., Linden, W., Ramsden, V., & Taenzer, P. (1999). Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. Recommendations on stress management. *Canadian Medical Association Journal*, 160(9). S46-S50.
- Stevens, G., Dias, R.H., Thomas, K. J. A., Rivera, J. A., Carvalho, N., Barquera, S., Hill, K., & Ezzati, M. (2008). Correction: Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLOS Medicine*, 5(7), e163. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050163>

- Suttangkakul, A., Sirikhachornkit, A., Juntawong, P., Puangtame, W., Chomtong, T., Srifa, S. Sathitnaitham, S., Dumrongthawatchai, W., Jariyachawalid, K., & Vuttipongchaikij, S. (2019). Evaluation of strategies for improving the transgene expression in an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus*. *BMC Biotechnology*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0497-z>
- Takenaka, Y., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2001). Introduction of a low molecular weight against peptide for complement C3a receptor into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(5), 1202-1205. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1202>
- Takenaka, Y., Doyama, N., Maruyama, N., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2004). Introduction of DPR, an enterostatin fragment peptide, into soybean beta-conglycinin alpha' subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *68*(1), 253-256. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.253>
- Takenaka, Y., Nakamura, F., Yamamoto, T., & Yoshikawa, M. (2003). Enterostatin (VPDPR) and its peptide fragment DPR reduce serum cholesterol levels after oral administration in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *67*(7), 1620-1622. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1620>
- Takenaka, Y., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2000). Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *64*(12), 2731-2733. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2731>
- Tandang-Silvas, M. R., Tecson-Mendoza, E. M., Mikami B., Utsumi S. & Maruyama N. (2011). Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 59-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133718>
- Taunt, H. N., Stoffels, L., & Purton, S. (2018). Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered*, *9*(1), 48–54. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1377867>
- Téllez, G., & Castaño, J. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, *14*(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Vinod, S., William, R., Siva, V., Jagadeeswar, B., & Venkat, M. (2004). Genetic transformation of the green alga — *Chlamydomonas reinhardtii*

- by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.012>
- Wakasa, Y., Tamakoshi, C., Ohno, T., Hirose, S., Goto, T., Nagaoka, S., & Takaiwa, F. (2011). The hypocholesterolemic activity of transgenic rice seed accumulating lactostatin, a bioactive peptide derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3845-3850. <https://doi.org/10.1021/jf200044j>
- Wani, S.H., Sah, S.K., Sági, L., & Solymosi, K. (2015). Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1391-1430. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0310-5>
- World Health Organization (2019). *Hypertension*. <https://www.who.int/health-topics/hypertension/>
- World Health Organization (2019). *Conducting systematic reviews to inform WHO Guidelines for the pharmacological treatment of hypertension* https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_2
- Wu, J., & Ding, X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 501-506. <https://doi.org/10.1021/jf000695n>.
- Yamada, Y., Matoba, N., Usiu, H., Onishi, K., & Yoshikawa, M. (2002). Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on Ovinin (2-7). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1213-1217. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1213>
- Yamaguchi, N., Kawaguchi, K. & Yamamoto N. (2009). Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *European Journal Pharmacology*, 620, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.005>
- Yang, B., Liu, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2016). *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective. *Biotechnology Journal*, 11, 1244–1261. <https://doi.org/10.1002/biot.201500617>
- Yusuf, S., Reddy, S., Ôunpuu, S., & Anand, S. (2001). Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*, 104(22), 2746-2753. <https://doi.org/10.1161/hc4601.099487>.

- Zhang, C., & Hu, H. (2014). High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Marine genomics* 16, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.10.003>
- Zhong, F., Zhang, X., Ma, J., & Shoemaker, C. F. (2007). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates. *Food Research International*, 40(6), 756-762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.005>.

Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas

Primera edición 2022

El cuidado y diseño de la edición estuvieron
a cargo del Departamento Editorial
de la Dirección General de Difusión y Vinculación
de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.