



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO FLO PRODUCIDO EN
MICROALGAS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA EN *Nannochloropsis oculata*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

PRESENTA:

DÁVALOS GUZMÁN SARAÍ DAMARIS

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: AGOSTO 2023

PROYECTO REALIZADO EN:

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR DE CÉLULAS VEGETALES DE LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS Y LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al CONAHCYT, registro 0590.

CVU de la beca otorgada por CONAHCYT: 743365



CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO FLO PRODUCIDO EN MICROALGAS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA EN *Nannochloropsis oculata* por Saraí Damaris Dávalos Guzmán, se distribuye bajo una licencia [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Reporte de similitud

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma 'turnitin' (<https://www.turnitin.com/es>). CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO FLO PRODUCIDO EN MICROALGAS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA EN *Nannochloropsis oculata*.

ÍNDICE DE SIMILITUD

4%

Por: Saraí Damaris Dávalos Guzmán

A partir de: 6 ago 2023 3:21:43

18,920 words- 39 matches – 21 sources



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO FLO PRODUCIDO EN
MICROALGAS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA EN *Nannochloropsis oculata*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

PRESENTA:

MC. SARAÍ DAMARIS DÁVALOS GUZMÁN

SINODALES:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra _____

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado _____

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez _____

Dr. José Francisco Morales Domínguez _____

Dr. Omar González Ortega _____

Dra. Aida Jimena Velarde Salcedo _____

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: AGOSTO 2023

San Luis Potosí, S.L.P.
Julio 05, 2023

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente._**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Doctorado MCBP. Saraí Damaris Dávalos Guzman, titulada “CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO FLO PRODUCIDO EN MICROALGAS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA EN *Nannochloropsis oculata*.”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 07 de agosto del 2023 a las 11:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Director de Tesis
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

Dra. Teresita Paz Maldonado
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

Dr. José Francisco Morales
Domínguez
Asesor
Departamento de Química
UAA

Dra. Aida Jimena Velarde Salcedo
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

Dr. Omar González Ortega
Asesor
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP

DEDICATORIA

A mi gran amor y esposo Mauri, por cuidarme cuando no tenía fuerzas, por darme motivos cuando sentía que no tenía razón para seguir, y sobre todo por darme su amor incondicional en todo este proceso. Sin ti no hubiera llegado hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco principalmente a la Dra. Ruth Elena Soria Guerra quien ha puesto su esfuerzo y tiempo en mi formación académica permitiéndome ser parte de su grupo de trabajo, compartirme su conocimiento, y por impulsarme a desarrollar las habilidades necesarias para llegar hasta este día.

A mi comité tutorial, Dr. Francisco Morales, Dr. Omar Gonzales y Dra. Jimena Velarde por su apoyo en la evaluación y realización de distintas etapas del proyecto, y en especial al Dr. Fidel Martínez y Dra. Teresita Paz quienes me escucharon y animaron a continuar con cualquier proceso por más difícil que pareciera.

A mis compañeros de laboratorio que se han convertido en mis amigos: Dra Luzmila, Julieta P, José Juan T, Abner C, y Andrea L. Y también quienes ya no están, pero fueron parte de este camino, Adriana T, Montse A, Ilse S, Marcos T, Dánae S, y Ana Z, disfruté cada día compartido con ustedes en el laboratorio.

Al laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al laboratorio de Ingeniería de Biorreactores de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al laboratorio de Bioseparaciones de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Al departamento de Medicina, División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de British, Columbia, Vancouver, Canadá.

Al jefe del área de Microbiología del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Principalmente le doy gracias a Dios por la vida que me ha dado, por permitirme seguir avanzando, y por darme salud cuando más la necesitaba.

A mis papás Ángel Dávalos y Claudia Guzmán por ser los pilares de mi vida y apoyarme en cualquier decisión que tomara, gracias por motivarme a seguir.

A mis hermanos Ángel, Pilar, Manola, y Juanjo por darme ánimos para ser mejor cada día y alegrarme con sus propios logros. A mis sobrinos César y Velia por darme tantos buenos momentos y enseñarme a disfrutar como pequeña.

A mis suegros Jorge Palau y Rosario Ávila que siempre procuran brindarme su apoyo, escuchar, y animar los malos momentos.

A mis amigos y familia Saraí Armendáriz y Gerardo Berrones por ser mis guías en muchos aspectos, los guardo en mi corazón, y sé que su apoyo fue clave para llegar a este día. A mi prima Andrea Berrones por convertirse en mi familia, escucharme, y estar siempre pendiente de mí. A mi gran amigo Juan Torres y su familia, tu amistad siempre fue y seguirá siendo una luz en los días oscuros.

Resumen

Existe una creciente preocupación por la falta de tratamientos efectivos para infecciones causadas por bacterias resistentes, ya que la resistencia microbiana está en aumento a nivel mundial. Los PAM tienen múltiples mecanismos de acción que los vuelven efectivos contra bacterias resistentes, lo que los convierte en una opción efectiva contra infecciones causadas por estos microorganismos. El péptido antimicrobiano Flo, derivado del árbol *Moringa oleifera*, ha sido ampliamente estudiado por su mecanismo de acción contra bacterias. En este proyecto, se utilizaron las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* para producir el péptido Flo de forma recombinante. Se demostró que la transformación genética de las microalgas con el gen *flo* fue exitosa, y se identificaron líneas transplastómicas en las tres cepas.

La identificación y cuantificación del péptido Flo se realizó por ensayo de ELISA, en *N. oculata* y *S. acutus*. Posteriormente fue posible identificar por Western blot el péptido en *N. oculata*. Los ensayos antimicrobianos utilizando la proteína total soluble (PTS) de la cepa transplastómica y silvestre de *N. oculata*, demostraron tener actividad atribuible al péptido contra las cepas ATCC *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, no se demostró actividad antimicrobiana para el caso de *Enterococcus faecalis*. Se analizó la actividad en cepas bacterianas resistentes a antibióticos de uso clínico, donde se demostró la inhibición de *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae*, mientras que para *E. coli* solo se observó disminución del crecimiento bacteriano. La respuesta inflamatoria de la línea transplastómica fue analizada por el ensayo de secreción de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α).

Palabras clave: Bacterias, bio-balística, multi-resistentes, antibacteriana, cloroplasto.

Abstract

There is a growing concern about the lack of effective treatments for infections caused by resistant bacteria, as microbial resistance is on the rise worldwide. Antimicrobial peptides (AMPs) have multiple mechanisms of action that make them effective against resistant bacteria, making them a viable option for combating infections caused by these microorganisms. The antimicrobial peptide Flo, derived from the *Moringa oleifera* tree, has been extensively studied for its mechanism of action against bacteria. In this project, the microalgae *Scenedesmus acutus*, *Nannochloropsis oculata*, and *Chlorella vulgaris* were used to produce recombinant Flo peptide. Successful genetic transformation of the microalgae with the *flo* gene was demonstrated, and transplastomic lines were identified in all three strains.

Identification and quantification of the Flo peptide were conducted using an ELISA assay, in *N. oculata* and *S. acutus*, respectively. Subsequently, the peptide was identified in *N. oculata* through Western blot analysis. Antimicrobial assays using the soluble total protein (PTS) from the transplastomic and wild strains of *N. oculata* showed activity attributed to the peptide against ATCC strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*; however, no antimicrobial activity was demonstrated against *Enterococcus faecalis*. The activity against clinically used antibiotic-resistant bacterial strains was analyzed, revealing inhibition of *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis*, and *K. pneumoniae*, while only a reduction in bacterial growth was observed for *E. coli*. The inflammatory response of the transplastomic line was analyzed using interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).

Keywords: Bacteria, biolistic, multi-resistant, antibacterial, chloroplast.

Índice general

1. **Introducción** _____ Error! Bookmark not defined.
2. **Antecedentes** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.1 **Péptidos antimicrobianos** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.2 **Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.2.1 **Mecanismo dirigido a la pared celular** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.2.2 **Mecanismo dirigido a la membrana celular** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.2.2.1 **Modelo de poro transmembranal** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.2.2.2 **Modelo de poro no membranaral** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.5 **Resistencia antimicrobiana** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.5.1 **Patogenicidad de bacterias resistentes con importancia clínica** ____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.5.1 **Mecanismos de la resistencia microbiana** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.6 **Aplicación de los péptidos antimicrobianos** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.7 **Plataformas de expresión para la producción de proteínas recombinantes** Error! Bookmark not defined.
 - 2.8 **Características y aplicación de las microalgas en biotecnología** Error! Bookmark not defined.
 - 2.9 **Péptido antimicrobiano Flo** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 2.10 **Antecedentes directos** _____ Error! Bookmark not defined.
3. **Justificación** _____ Error! Bookmark not defined.
4. **Hipótesis** _____ Error! Bookmark not defined.
5. **Objetivo general** _____ Error! Bookmark not defined.
6. **Objetivos particulares** _____ Error! Bookmark not defined.
7. **Materiales y Métodos** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 7.1 **Extracción y análisis de cepas de microalgas transformadas con la construcción p464-Flo**
Error! Bookmark not defined.
 - 7.2 **Extracción de proteínas en microalgas** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 7.3 **Cuantificación del péptido Flo por ensayo de ELISA** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 7.4 **Identificación del péptido Flo por Western Blot** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 7.5 **Actividad antimicrobiana de la PTS de *N. oculata* transplastómica contra cepas ATCC** Error!
Bookmark not defined.
 - 7.6 **Estandarización del método de conteo de unidades formadoras de colonia con cepas
patógenas aisladas de pacientes hospitalizados** _____ Error! Bookmark not defined.
 - 7.7 **Actividad antimicrobiana de la PTS de *N. oculata* transplastómica contra cepas patógenas
aisladas de pacientes hospitalizados** _____ Error! Bookmark not defined.

7.8	Ensayo de citotoxicidad _____	Error! Bookmark not defined.
7.9	Ensayo de respuesta inflamatoria _____	Error! Bookmark not defined.
7.10	Análisis estadístico _____	Error! Bookmark not defined.
8.	Resultados _____	Error! Bookmark not defined.
8.1	Análisis por PCR para la identificación del gen <i>flo</i> en las microalgas transgénicas ____	Error! Bookmark not defined.
8.2	Detección y cuantificación del péptido Flo en <i>N. oculata</i> y <i>S. acutus</i> ____	Error! Bookmark not defined.
8.3	Actividad antimicrobiana de la PTS de <i>N. oculata</i> transplastómica contra cepas ATCC	Error! Bookmark not defined.
8.4	Actividad antimicrobiana de la PTS de <i>N. oculata</i> transplastómica contra cepas patógenas aisladas de pacientes hospitalizados _____	Error! Bookmark not defined.
9.	Discusión _____	Error! Bookmark not defined.
10.	Conclusiones _____	12
11.	Perspectivas _____	12
12.	Bibliografía _____	Error! Bookmark not defined.
13.	Anexos _____	Error! Bookmark not defined.
13.1	Resumen de antibiograma _____	Error! Bookmark not defined.
13.2	Preparación de soluciones y medios de cultivo _____	Error! Bookmark not defined.
13.3	Productividad académica _____	Error! Bookmark not defined.
13.3.1	Publicación artículo científico _____	Error! Bookmark not defined.
13.3.2	Publicación capítulo de libro _____	Error! Bookmark not defined.
13.3.3	Divulgación científica _____	Error! Bookmark not defined.
14.	Glosario _____	13

10. Conclusiones

La transformación del cloroplasto de las microalgas con la construcción p464-Flo, es estable por lo que se considera este organelo un productor potencial para el péptido Flo.

Es posible la cuantificación del péptido Flo producido en la cepa transformada con la construcción p464-Flo de *N. oculata* utilizando el ensayo de ELISA, así mismo identificarlo por Western blot.

La inhibición bacteriana es variable y observable entre cada cepa dependiente de la cantidad y tiempo de exposición, además se destaca que el péptido contenido en la PTS tiene actividad contra bacterias productoras de BLEE, las cuales son resistentes a múltiples antibióticos y bacterias Gram positivas de importancia clínica.

La PTS transplastómica no es citotóxica, y es posible la reducción de la respuesta inflamatoria, lo cual aumenta su potencial como posible coadyuvante o sustituto de la terapia antibiótica.

11. Perspectivas

A fin de poder obtener mayores concentraciones del péptido Flo en la microalga es necesario optimizar su crecimiento mediante la modificación de la intensidad de luz, elección de los nutrientes en el medio de cultivo, regulación de temperaturas durante el crecimiento, mantenimiento de un pH adecuado y estable durante el cultivo y/o uso de biorreactores. El control adecuado de las condiciones de crecimiento permitiría profundizar en la evaluación del péptido Flo, ya que es importante realizar nuevos ensayos antimicrobianos con mayor cantidad de PTS transplastómica y silvestre en las bacterias que no mostraron inhibición, y probar la actividad contra otras bacterias multirresistentes aisladas de pacientes hospitalizados, también son necesarios nuevos ensayos proinflamatorios y antiinflamatorios.

Algunas perspectivas a largo plazo del uso de la PTS transplastómica incluyen su uso como sustituto o coadyuvante de antibióticos convencionales en la terapia contra infecciones de organismos multirresistentes, lo cual podría generar múltiples ventajas en el combate contra la resistencia antimicrobiana, por lo que la propuesta de su uso para

el recubrimiento de equipo de venoclisis debe ser evaluada, ya que se podría evitar la adhesión de bacterias formadoras de biopelículas, sin embargo, son necesarios estudios en estas estructuras complejas para que esta alternativa siga avanzando. Por otro lado, la generación de fármacos a partir del uso de la PTS transplastómica para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, se plantea como una opción atractiva debido a que la microalga *N. oculata* es un organismo GRAS. No obstante, se requieren estudios concluyentes respecto a su actividad citotóxica, antiinflamatoria y proinflamatoria.

14. Glosario

Actividad anti-inflamatoria: Capacidad de reducir o inhibir la inflamación en el cuerpo.

Adaptación: Capacidad de los organismos para ajustarse a nuevas condiciones o ambientes.

Alergenos: Sustancias que pueden desencadenar una reacción alérgica en ciertas personas.

Alergias: Respuesta inmunitaria exagerada ante una sustancia normalmente inofensiva para la mayoría de las personas

Amplio espectro: Capacidad de actuar contra una amplia variedad de microorganismos.

Anfipáticos: Moléculas que tienen una parte hidrófila (afín al agua) y una parte hidrófoba (repelente al agua).

Antibióticos: Sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos o los destruyen.

Antihelmínticos: Medicamentos utilizados para tratar infecciones causadas por helmintos o gusanos parásitos.

Antimicrobianos: Sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos o los destruyen.

Antipalúdicos: Medicamentos utilizados para tratar la malaria.

Antivíricos: Medicamentos utilizados para tratar infecciones virales.

Bacterias multirresistentes (BMR): Bacterias que han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos.

Biopelícula: Estructura compleja formada por un consorcio de microorganismos en una matriz extracelular, responsable de muchas infecciones clínicas.

Capacidad inmunomoduladora: Habilidad para modular o regular la respuesta inmune.

Célula: Unidad básica de los organismos vivos.

Citocininas: Familia de citocinas que incluye las interleucinas.

Citocinas: Proteínas liberadas por las células del sistema inmunitario para regular y coordinar la respuesta inmune.

Citotoxicidad: Capacidad de una sustancia para ser tóxica para las células.

Consortio: Grupo de organismos que trabajan juntos o interactúan en beneficio mutuo.

Daño tisular: Lesión o destrucción de tejido corporal.

Endocitosis: Proceso mediante el cual una célula captura moléculas o partículas del entorno al envolverlas con su membrana.

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α): Citocina inflamatoria producida principalmente por los macrófagos, con un papel importante en la respuesta inflamatoria y la apoptosis celular.

Inflamación: Proceso biológico de respuesta del organismo ante lesiones, infecciones o irritaciones.

Interleucinas (IL): Tipo de citocinas que actúan como mensajeros químicos entre las células del sistema inmunitario.

Patógenos: Microorganismos capaces de causar enfermedades.

Péptidos: Moléculas formadas por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Propiedades antimicrobianas: Capacidad de un agente para inhibir o matar microorganismos como bacterias, virus o hongos.

Reacción inflamatoria: Respuesta del sistema inmunitario que involucra inflamación como parte de la defensa del organismo.

Respuesta inmune: Reacción del sistema inmunológico ante la presencia de agentes patógenos o daño tisular.

Sepsis: Infección grave y potencialmente mortal que se propaga por todo el cuerpo.

Toxinas: Sustancias venenosas producidas por organismos vivos, como bacterias o plantas.