



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE NUTRICIÓN**

**Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano.**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el título de:

**LICENCIADO EN NUTRICIÓN**

**P R E S E N T A:**

**KARLA DENISSE TABOADA APAEZ**

Directora: Dra. América Ivette Barrera Molina

**SINODALES:**

Dr. Raúl Dávila Delgado

Mtra. Diana Rivera Bahena

Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena

Dr. Marcos Amed Salazar Blas

Mtra. Lourdes Peralta Flores

## Resumen

Existen alrededor de 31 especies de microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales. Entre estos microorganismos se encuentran diferentes especies de bacterias, el tratamiento para tratar estas enfermedades comprende el uso de antibióticos, un grupo de fármacos con diferentes mecanismos de acción dependiendo del tipo de bacteria causante de la infección. Sin embargo, con el paso del tiempo, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación, entre ellos la resistencia a los antibióticos. El uso irracional de estos fármacos también afecta de manera importante a la microbiota intestinal es decir al grupo de bacterias que viven en nuestro cuerpo sin afectar nuestra salud y que además cumplen diferentes funciones dentro del organismo. Cuando se altera en número y/o composición de la microbiota se le denomina disbiosis, la cual se ha observado tiene estrecha relación con la obesidad y otros problemas de salud. Por esta razón en el presente trabajo se analizó mediante el uso de herramientas computacionales las características fisicoquímicas y estructurales de la proteína Lactocina A de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* como posible agente antimicrobiano. Los datos arrojados en los diferentes programas predicen que la proteína presenta propiedades fisicoquímicas, que le confieren una posible función antimicrobiana. Así mismo, los resultados observados en el antibiograma demuestran su efecto inhibitorio en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. microorganismo de importancia clínica. Estudios futuros podrán evaluar su incorporación como aditivo en alimentos o su empaque para venta como fármaco sustituto con acción antimicrobiana. La producción de bacteriocinas de manera recombinante es crucial para el desarrollo de futuras terapias antimicrobianas que permitan disminuir la resistencia a los antibióticos.

## Contenido

1. Introducción.....	7
2. Antecedentes .....	8
2.1 Seguridad sanitaria de los alimentos.....	9
2.2 Microorganismos causantes de enfermedades transmitidas en los alimentos.....	9
2.3 Antibióticos.....	10
2.3.1 Mecanismo de acción de los antibióticos.....	11
2.3.2 Resistencia a los antibióticos.....	12
2.4 Bacterias ácido lácticas.....	13
2.4.1 Factores de crecimiento de las bacterias ácido lácticas.....	14
2.5 Definición y características de las bacteriocinas.....	15
2.5.1 Espectro de inhibición .....	16
2.5.2 Mecanismo bactericida.....	16
2.5.3 Clasificación de las bacteriocinas.....	17
2.5.4 Bacteriocina Lactococcina A.....	18
2.6 Técnicas que se pueden utilizar para la identificación de resistencia a los antimicrobianos .....	20
2.7 Herramientas Bioinformáticas.....	21
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos .....	23
6. Estrategia metodológica.....	24
6.1 Análisis in silico de la secuencia aminoacídica de LCN-A .....	24
7. Resultados .....	30
7.1 Análisis in silico .....	30
7.2 Predicción de péptido señal.....	31
7.3 Predicción de hidrofobicidad de la proteína Lactococcina-A.....	32
7.4 Predicción de la región transmembranal.....	32
7.5 Predicción de la estructura secundaria.....	33
7.6 Predicción de la estructura terciaria de la proteína LCN-A.....	34
7.7 Diseño de oligonucleótidos para el gen Lcn-A.....	34
7.8 Análisis de homología de secuencias.....	35
7.9. Amplificación por PCR In Silico .....	36
7.10 Antibiogramas.....	36
8. Discusión.....	37
9. Conclusiones.....	41
10. Perspectivas.....	42
11. Referencias .....	42

## Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATMs: Antimicrobianos

ATP: Adenosin trifosfato

BAL: Bacterias ácido lácticas

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

CODEX: Código alimentario

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la  
Agricultura

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

kDa: Kilodaltones

*LCN-A*: Lactococcin A

MH: Muller hinton

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica

OIE: Organización mundial de sanidad animal

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PBP: Proteínas fijadoras de penicilinas

### **Lista de tablas**

Tabla 1; Clasificación de bacteriocinas de acuerdo a su mecanismo de acción.

Tabla 2; Sitios empleados para las predicciones y análisis *in silico* de la proteína *Lactococcina A*.

Tabla 3; Secuencia del gen *LCN-A* y secuencia de los aminoácidos.

Tabla 4; Diseño de primers para la amplificación del fragmento de interés a partir del gen *LCN-A*.

figura 5; Alineación de las secuencias de *LCN-A* de *Lactococcus lactis subs. cremoris* y la Proteína J3NIW7\_GAET3,

Tabla 6; Medida de los halos de inhibición con la bacteriocina *LCN-A*.

### **Lista de figuras**

Figura 1; Mecanismo de acción de las bacteriocinas.

Figura 2. Representación esquemática del péptido señal

Figura 3; Predicción de las regiones hidrofóbicas de la proteína lactococcina A con base en el algoritmo de Kyte & Doolittle.

Figura 4; Predicción de regiones transmembranales con el programa TMHMM

Figura 5; Representación esquemática de la estructura secundaria de la proteína Lactococcina-A obtenida por el programa PSIPRED

Figura 6; Modelo de la estructura terciaria obtenido a través del servidor Swiss Model.

Figura 7; Amplificación del gen *LCN-A*.

Figura 8; A) Antibiograma de *S. aureus* en presencia de *LCN-A*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se consideran un serio problema de salud pública, estas enfermedades son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o sustancias tóxicas, esto representan un problema a nivel mundial. Según registró en el año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA afectan a 1 de cada 10 personas en el mundo y 420.000 personas mueren al año. Siendo producidas por 31 agentes contaminantes (virus, bacterias, sustancias químicas, etc.) [1]. Entre estos agentes se encuentran algunas especies de bacterias, ejemplo de ellas son: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Brucella*, *Vibrio*, entre otras [2]. Es frecuente encontrar estos microorganismos en alimentos de origen animal, así como en procesos secundarios que involucran la producción, almacenamiento, distribución de estos alimentos. Sin embargo, las técnicas de preparación, se han considerado una alternativa importante como medidas preventivas de las ETA, ya que algunos factores intrínsecos y extrínsecos como el pH y la temperatura juegan un papel importante para el desarrollo de estos microorganismos [3]. Las patologías producidas por estos agentes etiológicos pueden diagnosticarse mediante diferentes métodos como los antibiogramas, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, microarreglos, biosensores, electroforesis, entre otras, las cuales permiten identificar cepas o serotipos y/o factores de virulencia [4]. En el caso de confirmar que las infecciones son producidas por bacterias, el tratamiento comprende el uso de los antibióticos, un grupo de fármacos con diferentes mecanismos de acción en la estructura bacteriana. Sin embargo, con el paso del

tiempo, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación, entre ellos la resistencia a los antibióticos, fenómeno originado principalmente por el uso irracional de estos fármacos, lo que ha generado un problema muy serio a nivel mundial, esto ha incrementado la colonización de bacterias patógenas en el hospedero, comprometiendo el equilibrio entre el ser humano y su ambiente microbiológico, provocando una pérdida de la homeostasis y en muchos casos la muerte. Por otro lado, la modificación de la microbiota intestinal, impacta de manera negativa en el sistema inmune, provocando enfermedades inflamatorias crónicas como el síndrome de intestino irritable. Además, el desequilibrio conocido como disbiosis, participa en el desarrollo y mantenimiento de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes, entre otras [5]. Por esta razón, en los últimos años se han buscado nuevas alternativas para combatir estas bacterias resistentes a antibióticos, una de ellas es el uso de bacteriocinas, proteínas producidas por bacterias que tienen actividad antimicrobiana [6].

Se ha descubierto que al combinar diferentes tipos de bacteriocinas se reduce la capacidad con la que los microorganismos desarrollan resistencia y mejora su potencial antimicrobiano. Esto ha vuelto necesario el uso de otro tipo de bacteriocinas que puedan ser útiles. Una forma de conocer las propiedades de estas proteínas es el uso de herramientas bioinformáticas, que mediante algoritmos computacionales pueden predecir diferentes características importantes de su estructura y composición.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Seguridad sanitaria de los alimentos**

La seguridad alimentaria se encarga de asegurar la inocuidad de los productos alimentarios, esto debido a que existe una gran cantidad de microorganismos patógenos causantes de más de 200 enfermedades [7]. Por lo que se ha vuelto un problema de salud pública importante. Existen instituciones que se encargan de controlar la seguridad alimentaria, desde su producción hasta el consumo, tomando en cuenta los posibles riesgos de contaminación a los que están expuestos los alimentos. Una de estas instituciones es la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en inglés) que se encarga de recibir la información de las enfermedades transmitidas por los animales de consumo a los seres humanos y transmite esta información, para que se puedan tomar medidas necesarias ante estas situaciones. También se encarga de elaborar reglas sanitarias en los intercambios internacionales de animales y productos derivados [7]. Por otro lado, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se encarga de regular los aspectos de nutrición y calidad mediante proyectos dirigidos a la agricultura. Además, se encarga de implementar tratados internacionales y normas oficiales del Código alimentario (CODEX) para garantizar el valor nutritivo, la inocuidad y calidad de los alimentos [8]. Estas instituciones trabajan en conjunto para disminuir los casos de infecciones por ETA, que a su vez pueden ser producidas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que contaminan los alimentos o el agua [7].



## 2.2 Microorganismos causantes de enfermedades transmitidas en los alimentos

Existen muchos microorganismos que pueden causar enfermedades al contaminar los alimentos, por esta razón hay muchos tipos de infecciones distintas que se pueden contraer al consumir estos alimentos. Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) cada año 48 millones de personas enferman por una patología transmitida por los alimentos, de esas, 128,000 son hospitalizadas y 3000 mueren. La CDC registró que en los Estados Unidos, los principales microorganismos que causan enfermedades a través del consumo de alimentos son: *Norovirus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter* y *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Escherichia*. Sin embargo, la lista de microorganismos presentes en alimentos es mayor, por lo que el número de enfermedades también y con ellas el riesgo de padecer alguna de estas patologías con sus respectivas complicaciones [9]. Algunas de estas especies con el paso del tiempo se han vuelto resistentes a diferentes antibióticos, por ejemplo: *Salmonella typhi* una bacteria gramnegativa que ha sido clasificada de acuerdo a los serotipos patógenos, ha presentado resistencia a ciprofloxacina, cefixima y cloranfenicol, las alternativas son el uso de ampicilina, amoxicilina y sulfametoxazol [10.] En el caso de la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* se ha demostrado que ha disminuido la sensibilidad en los antibióticos: trimetoprim sulfametoxazol, ciprofloxacina y ampicilina, los cuales han perdido entre el 21.59% al 61.44% de su efectividad. [11].

Por su parte, la CDC informó que *Staphylococcus aureus* ha aumentado su resistencia a la metilina, y que entre el año 2012 al 2017 hubo un incremento del 4 por ciento en cada año [12], por mencionar algunos ejemplos.

Es por esta razón que la selección adecuada de medicamentos es uno de los principios fundamentales de una para evitar el incremento de la resistencia [13].

### **2.3 Antibióticos**

Los antibióticos forman parte de un grupo de medicamentos de acción específica que afecta directamente a la parte estructural o funcional de las bacterias, son bastante eficaces contra la mayoría de estos microorganismos [14], De acuerdo con la manera en la que actúan a nivel de pared celular, membrana citoplasmática, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y antimetabolitos. Estos fármacos se dividen en bactericidas, los cuales tienen un método de acción que permite destruir a la bacteria, y también están los bacteriostáticos, que a pesar de no eliminar a la bacteria impiden su desarrollo y multiplicación mientras da tiempo a que actúe el sistema inmune [15]. El efecto del antibiótico sobre el organismo depende del tipo de antibiótico y la dosis administrada, así como al grupo de bacterias gramnegativas o grampositivas sobre el cual va a actuar. En casos específicos como son los pacientes inmunocomprometidos o con infecciones severas es preferible el uso de antibióticos bactericidas según sea el caso [16], Entre los antibióticos bacteriostáticos se encuentran: cloranfenicol, macrólidos,

sulfonamidas, trimetoprima, tetraciclinas, nitrofurantoína, por otra parte, algunos de los antibióticos con actividad bactericida son: los betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, metronidazol, rifampicina, polimixina, vancomicina, rifampicina, fosfomicina y carbapenemes [18].

### **2.3.1 Mecanismo de acción de los antibióticos**

La acción de los antibióticos se mide por la magnitud de su espectro bacteriano. Se les llama de amplio espectro cuando actúa con varias especies de bacterias grampositivas y gramnegativas, cuando la magnitud es menor se les denomina de espectro selectivo [20].

Los antibióticos actúan a nivel de pared celular, ribosomas, membrana citoplasmática, ácidos nucleicos y como antimetabolito, ya que sus blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada [19].

Los antibióticos que actúan en la pared de la bacteria bloquean la síntesis de esta, específicamente del peptidoglicano, lo que produce la lisis de la bacteria, por ejemplo: los betalactámicos, glucopéptidos, bacitracina y estreptograminas. Los antibióticos con acción en la membrana destruyen a los fosfolípidos gracias a su acción detergente, entre ellas se encuentran las polimixinas. Otros antibióticos actúan sobre los ribosomas bacterianos impidiendo la síntesis proteica. Otros antibióticos son las fluoroquinolonas y la novobiocina que inhiben una topoisomerasa lo que impide el superenrollamiento del ADN. Los nitroimidazoles, rompen las cadenas del ADN, y evitan la reparación de estas. Los nitrofuranos, evitan la correcta lectura de codones durante la transcripción [21].

### **2.3.2 Resistencia a los antibióticos**

Según la (OMS), la resistencia a los antimicrobianos “Es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos (como antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas” [22]. La resistencia bacteriana frente a los antibióticos se ha convertido en un problema que afecta la salud pública y animal en el mundo. Una de las principales causas de la resistencia bacteriana es el uso incorrecto de los antibióticos, por lo que la OMS [19] menciona que tiene una disminución de la efectividad en su función [19]. Las prácticas inapropiadas de control de infecciones propician la propagación de la resistencia bacteriana por su capacidad de intercambiar plásmidos de bacterias con genes resistentes a otras bacterias no resistentes. La resistencia produce incremento en la duración de la infección, altos costos al sector salud y el riesgo de complicaciones que pueden ocasionar la muerte [20].

De acuerdo con datos de la OMS anualmente, 480 000 personas presentan enfermedades con cuadros de multirresistencia a los antibióticos, esta farmacorresistencia puede complicar la resolución de las infecciones. Se han registrado nuevos mecanismos de resistencia, lo que provoca la disminución de efectividad en el tratamiento, inclusive en enfermedades infecciosas comunes al igual que procedimientos de trasplante de órganos, el cáncer, entre otras.

Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse entre personas, de personas a los animales y de animales a personas por medio del consumo de alimentos de origen animal, debido a que el ganado ha sido tratado con antibióticos.

Es importante mencionar que en las personas infectadas con bacterias resistentes hay un incremento en el porcentaje de mortalidad, a diferencia de las personas con infecciones a bacterias no resistentes [24].

#### **2.4 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas. Estas bacterias producen ácido láctico, una sustancia resultante del proceso metabólico de la fermentación de los hidratos de carbono. Son anaerobias facultativas, catalasa y oxidasa negativas, sin motilidad, con forma de cocos o bacilos, producen ATP, no formadoras de esporas. Se clasifican en homofermentativas siendo estas productoras únicamente de ácido láctico y las heterofermentativas, que además del ácido láctico producen etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. [26].

Las especies de bacterias ácido lácticas que más se usan en la industria alimentaria como conservadores de alimentos son; *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Estas bacterias se pueden encontrar en productos lácteos como son el yogurt y la crema, también en algunas plantas, productos cárnicos, en procesos de fermentación, en el intestino de humanos y algunos animales [27].

### **2.4.1 Factores de crecimiento de las bacterias ácido lácticas**

Las BAL crecen bajo condiciones específicas en medios ácidos, su pH puede variar inicialmente entre 6.4 a 4.5 y alcanzando su fase exponencial en un medio con un pH de 5.5 a 6.2. Para culminar con su crecimiento deben de alcanzar un pH de entre 4 y 3.6, esto puede variar al estar en contacto con otras especies de bacterias. Al producir el ácido láctico, el medio en el que se encuentra puede disminuir hasta niveles de pH menores a 4 esto con el fin de eliminar la mayoría de otros microorganismos que puedan presentar competencia de alimento, a excepción de otras especies de BAL, las cuales son en su mayoría anaerobias, pero toleran el oxígeno, sin embargo, su mayor crecimiento se presenta en ambientes microaerófilos. Crecen en ambientes mesófilos a una temperatura de entre 30 a 40 °C aproximadamente. Algunas especies especialmente las que crecen en alimentos cárnicos, pueden soportar temperaturas menores a los 15 °C [27].

Las BAL a su vez tienen la capacidad de producir proteínas pequeñas con características antimicrobianas, así como la formación de sustancias como el ácido acético y el ácido láctico resultado de su metabolismo lo que provoca la disminución del pH que a su vez es un factor de protección contra otras bacterias patógenas. A estas proteínas se les denomina bacteriocinas, las cuales pueden lisar a las bacterias, mediante diferentes mecanismos según su especie, su producción se incrementa durante la fase de liberación logarítmica y algunas en su fase estacionaria, dependiendo el tipo de bacteriocina.

## 2.5 Definición y características de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos bioactivos que generan un mecanismo de defensa y participan en el reconocimiento de patógenos particularmente activos. Al ser proteínas, se originan en los ribosomas de algunas bacterias como parte de un mecanismo de defensa y de competencia cuando se detectan microorganismos patógenos [28]. La bacteria crea proteínas que protegen a la propia bacteriocina, mediante un operon que codifica una proteína de inmunidad específica. La producción puede ocurrir de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de esta, guardando relación directa con la biomasa producida. Son consideradas GRAS (Generalmente reconocido como seguro) por La Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration, FDA*), ya que su consumo no es considerado un riesgo para la salud [26].

Las bacteriocinas tienen una carga neta positiva que interactúa con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas. La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno que interaccione con la membrana. A pesar de que estas características varían de molécula a molécula, todas son relevantes para la actividad antimicrobiana [29].

Las bacteriocinas se mantienen estables al ser sometidas a temperaturas altas y un pH ácido, ya que el incremento de pH reduce la estabilidad al calor [30].

### **2.5.1 Espectro de inhibición**

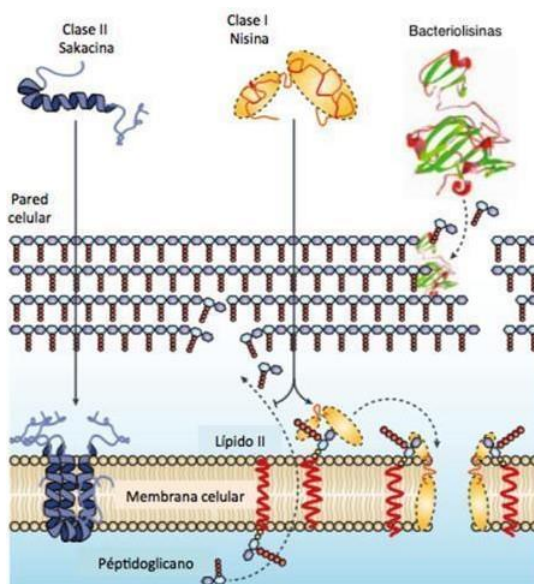
Las bacteriocinas pueden actuar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Algunas bacterias patógenas con las que se ha visto mayor sensibilidad son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella spp.* Los antibióticos en la mayoría de los casos presentan un espectro antimicrobiano mayor a otras bacteriocinas de BAL, en especial contra bacterias Gram-positivas. Estudios recientes también manifiestan actividad antagónica de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas contra microorganismos Gram negativos. La magnitud de este espectro antimicrobiano puede variar dependiendo de la persona por su exposición a tratamientos con antibióticos. De manera *in vitro*, factores como el tiempo y la concentración de las bacteriocinas y su purificación también pueden afectar su efecto. Por lo general a mayor concentración tiene un mejor efecto sin embargo otros factores como la temperatura a la que se someten estas bacteriocinas, puede modificar el efecto sobre las bacterias patógenas disminuyendo su actividad y termo tolerancia. El espectro puede aumentar al combinar diferentes especies de bacteriocinas [31].

### **2.5.2 Mecanismo bactericida**

Los mecanismos de inhibición de los péptidos, corresponden a la unión de las bacteriocinas a la membrana citoplasmática hacia las cargas negativas de los fosfolípidos, así como la unión mediada por factores tales como el pH, la composición de la membrana y la carga de esta produce la formación de poros, lo que provoca un desbalance de iones, una pérdida de ATP, aminoácidos y



electrolitos (ver figura 1). Estas alteraciones afectan el transporte activo y el movimiento bacteriano, lo que evita la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular. A pesar de que la formación de poros en la membrana es muy común en las bacteriocinas, existe una clasificación según el modo de acción de cada clase [32].



**Figura 1.** Mecanismo de acción de las bacteriocinas.  
Fuente: (Bauza et al., 2012).

### 2.5.3 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido clasificadas en cinco clases dependiendo sus características como lo son; el tamaño y peso molecular de la bacteriocina, su microorganismo productor, propiedades físico-químicas, así como su mecanismo de acción [33]. Las cuales se dividen en cinco clases, la clase I o lantibióticos son péptidos pequeños que actúan sobre la membrana y son termolábiles, la clase II, que incluye péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones

post traduccionales, cuya principal característica es la actividad antilisterial y que a su vez se divide en subclases IIa, IIb, IIc, IId y IIe (Tabla 1). La subclase IIa son metabolitos que actúan sobre *Listeria*, la subclase IIb, está conformado por bacteriocinas con dos péptidos y requiere de ambos para desarrollar su capacidad antimicrobiana; La subclase IIc son bacteriocinas que no comparten homología con ninguna otra bacteriocina y se transportan mediante péptidos líder [34]. La clase IId, son péptidos lineales; dentro de la clase IIe se encuentran las bacteriocinas que se formaron por la degradación específica de proteínas más grandes [35]. En la clase III el mecanismo de acción se realiza por una hidrólisis de la pared celular de las células sensibles. Los de la clase IV se asocian a lípidos (lipoproteínas) y a hidratos de carbono (glicoproteínas). La clase V son péptidos de estructura cíclica sin modificaciones *post-traduccionales*, [33]

**Tabla 1.** Clasificación de bacteriocinas de acuerdo a su mecanismo de acción.

CLASIFICACIÓN LAS BACTERIOCINAS			
Clasificación	Característica	Subcategoría	Ejemplo
Clase I (lantibióticos)	- Péptidos que contienen aminoácidos modificados (lantionina, $\beta$ -lantioninato).	- Tipo A (moléculas lineales)	- Nisina, subtilina, epidermina.
		- Tipo B (moléculas globulares)	- Mersacidina.
Clase II	- Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños.	- Subclase IIa (pediocina-antilisteria)	- Pediocina, enterocina, sakacina.
		- Subclase IIb (compuesto de dos péptidos)	- Plantaricina, lacticina F.
		- Subclase IIc (otras bacteriocinas)	- Lactococcina.
	- Grupo de péptidos lineales	- Subclase IId	- Lacticina Q.
- Degradación de proteínas grandes.	- Subclase IIe	- Propionicina F.	
Clase III	- Péptidos grandes termolábiles.		- Helveticina J, millericina B.
Clase IV	- Péptidos cíclicos*		- Reuterina 6.
Clase V	- Péptidos de estructura circular.		- Enterocina AS-48, gasericina A.

\* Asociados con lípidos o carbohidratos.  
Adaptado de (Nes *et al.*, 2007), Monroy *et al.* (2009) y Balciunas *et al.* (2013).

## 2.5.4 Bacteriocina Lactococcina A

Dentro de las bacteriocinas que provienen de las BAL se encuentra la lactococcina A que pertenece a la clase IIc (de acuerdo a la clasificación anterior). Es una proteína hidrofóbica pequeña, sintetizada como un precursor de 75 aminoácidos,

tiene un péptido señal de 21 aminoácidos, presenta un extremo N terminal con carga positiva, seguido de un fragmento hidrófobo típico de las bacterias gram positivas. El mecanismo de acción de esta bacteriocina consiste en que la lactococcina A aumenta específicamente la permeabilidad de la membrana citoplasmática de células patógenas, formando poros que permiten el paso incontrolado de sustancias dentro y fuera de la célula, provocando su lisis [35]. Van Belkum et al [36] realizó un estudio sobre el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, mediante la inhibición del transporte secundario, disipando el potencial de la membrana citoplasmática, inhibiendo la captación de aminoácidos acumulados. Para estos experimentos incubó cepas de células de bacterias junto con una concentración sensible de la proteína LCN-A (0,029 microgramos / mg de proteína), los resultados revelaron una disminución considerable de la absorción de glutamato y la expulsión de aminoácidos acumulados dentro de la célula. Posteriormente se aumentó la concentración de LCN-A durante la pre-incubación de las células, lo cual inhibió por completo su absorción. Éste procedimiento se repitió, pero en este caso con antibióticos como la Valinomicina y Nigericina, dando como resultado, un efecto similar entre ambos, sin embargo, la velocidad de eflujo de los aminoácidos acumulados fue mayor con LCN-A en comparación a los antibióticos. Esto confirmó el mecanismo de acción de ésta bacteriocina sobre la membrana celular de bacterias sensibles [36].

## **2.6 Técnicas moleculares que se pueden utilizar para la identificación de resistencia a los antimicrobianos**

Existen diferentes técnicas moleculares, que entre sus funciones se encuentran la detección de genes en forma de ADN y ARN. Una de las técnicas más usadas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con ésta herramienta se puede identificar genotipos de resistencia y virulencia. Otro método que permite detectar resistencia bacteriana es por medio de antibiogramas ya que permite determinar la sensibilidad bacteriana en relación con un grupo de antibióticos, siendo una de las técnicas más utilizadas en el área clínica [36].

Por otra parte, la metodología para la técnica de microarreglos, un conjunto de genes acomodados en una superficie pequeña de manera ordenada, (aproximadamente 40,000 genes diferentes por cada centímetro cuadrado de espacio), con esta técnica se puede obtener datos de expresión de distintos microorganismos y sus mecanismos de resistencia en un grupo de genes simultáneamente, bajo diferentes condiciones.

Primero se realiza la extracción del material genético, después se sintetiza y se marca el ADN complementario (ADNc), de hibridan sus ácidos nucleicos para después leerse, cuantificarse y por último se analizan los datos de expresión génica obtenidos (37).

Existen técnicas inmunocromatográficas, que detectan enzimas bacterianas que actúan sobre los antibióticos hidrolizándolos, esta es una técnica sensible, sin embargo, cuando los resultados son negativos es necesario realizar medios de cultivo para confirmar los resultados. (38)

## 2.7 Herramientas Bioinformáticas

Existen diversas bases de datos como NCBI, EMBL, DDBJ, en las cuales se puede acceder a secuencias de ADN o aminoácidos. Utilizan algoritmos para el análisis de secuencias similares, tanto de ADN como de proteínas; así como la predicción de la localización de proteínas celulares. También se pueden encontrar bases de datos con los dominios de familias de proteínas generadas de la comparación global de todas las secuencias de proteínas disponibles. [37].

Las bases de datos permiten la obtención de información genética y permite la predicción del comportamiento de material genético, nucleótidos, proteínas entre otras moléculas [38]. Existen bases de datos como el NCBI en el cual se encuentra la secuencia del gen *LCN-A* en el genoma de *Lactococcus lactis subsp Cremoris*; ExPASy protParam y ProtScale los cuales colaboran en la obtención de propiedades fisicoquímicas y predicción de regiones hidrofóbicas; CBS para la predicción de péptido señal de la bacteriocina, TMHMM SERVER V. 2.0. para predicción de regiones transmembranales y sus características, PSIPRED predice la estructura secundaria, el programa SWISS-MODEL realiza un modelado automático comparativo de estructuras de proteínas tridimensionales (3D). Para la simulación de la producción de las proteínas de manera recombinante se pueden usar los siguientes programas: Clustal Omegal, el cual permite hacer alineamientos múltiples de secuencias homólogas, SNAPGENE permite realizar el diseño de oligonucleótidos para la simulación de PCR y electroforesis en gel de agarosa, así como la inserción de los amplicones en un vector de clonación.

La mayoría de estos programas son gratuitos y están en constante actualización. Las características de estas herramientas computacionales de predicciones genéticas son útiles para deducir, en este caso el comportamiento de estas bacteriocinas, simulando procesos complejos que de manera *in vitro* requieren de mayor tiempo y recursos en la investigación [39].

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema importante a nivel mundial. Estas enfermedades son provocadas por diferentes microorganismos un ejemplo de estos son las bacterias patógenas. El tratamiento para estas enfermedades es el uso de antibióticos, sin embargo, con el tiempo las bacterias han generado mecanismos de resistencia, lo que impide que estos medicamentos actúen de manera correcta, por esta razón se ha buscado crear nuevas alternativas que disminuyan la cantidad de estos microorganismos patógenos. Una de estas alternativas es el uso de bacteriocinas, proteínas provenientes de diferentes tipos de bacterias, como son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son inocuas y pueden provenir de diferentes alimentos como la leche, así como los lácteos fermentados, como el yogurt y los quesos maduros. Estas bacteriocinas son péptidos bioactivos que generan mecanismos de defensa y participan en el reconocimiento de patógenos particularmente activos. Este proyecto pretende utilizar la bioinformática, una disciplina que proporciona herramientas computacionales para entender y apreciar datos biológicos,

almacenar, recuperar, manipular y correlacionar información de diversas fuentes. Identificando desde los genes hasta estructuras moleculares, sus funciones bioquímicas y cómo se comportan biológicamente, así como su relación con diferentes enfermedades. En este trabajo se analizarán las características de la proteína Lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* mediante el uso de estas herramientas para predecir su posible actividad antimicrobiana.

#### **4. HIPÓTESIS**

La proteína *Lactococcina A* de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* cuenta con características fisicoquímicas y estructurales que le permiten ser un posible candidato antimicrobiano.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general.**

1. Analizar mediante programas bioinformáticos las características antimicrobianas de la proteína LCN-A de *Lactococcus lactis subs. cremoris*. para su futura replicación en vectores de propagación.

##### **Objetivos específicos.**

1. Obtener la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína LCN-A en la base de datos del GenBank.

2. Identificar mediante herramientas computacionales las características fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos que codifican para la proteína LCN-A
3. Simular, mediante el programa SnapGene la clonación del gen en vectores de propagación comerciales para su eventual obtención de manera recombinante.
4. Realizar antibiogramas con LCN-A como inhibidor de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

## 6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.

Para iniciar con el análisis bioinformático, se Identificó el genoma de *LCN-A* de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. La secuencia nucleotídica y aminoacídica se obtuvo del GenBank: **NZ\_AP018500.1**, **WP\_015081786.1** del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

### 6.1 Análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de *LCN-A*.

#### Protparam

La herramienta Protparam se utilizó para obtener, mediante la secuencia proteica las características fisicoquímicas mediante herramientas computacionales de la proteína (ver tabla 2), como el punto isoeléctrico (pI), es decir el pH al que la proteína tiene carga neta de cero, también calcula el peso molecular, el tipo de aminoácidos por el que está compuesta la proteína, el índice de estabilidad (IE), el índice alifático, que es considerado un factor positivo para el aumento de la



termoestabilidad de las proteínas, el tiempo de vida media, una predicción del tiempo promedio que tarda una proteína para desaparecer después de ser sintetizada en la célula, además calcula el promedio general de hidropatía, la cual es una medida de la energía que se usa para representar las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas de su cadena lateral [40]

### **SignalP**

Este programa se utilizó ya que permite la predicción del péptido señal, el sitio real de escisión de la proteína y la forma en la que el péptido es liberado durante la translocación sobre la membrana para generar un péptido señal libre que va a dirigirlo hacia su destino al convertirse en una proteína madura, por lo tanto, el programa también indica si se trata de una proteína secretada o no [41].

### **TMHMM**

Se obtuvo la predicción de regiones transmembranales de la proteína a partir del programa TMHMM, esta herramienta se usa para conocer la probabilidad de que alguna porción de la proteína atraviese la membrana celular, comparando la secuencia de aminoácidos de interés en una base de datos de modelos ocultos de Markov o "HMM" (una técnica probabilística de modelado de datos secuenciales) es decir, los compara con secuencias de aminoácidos, las cuales se ha demostrado que forman estructuras secundarias helicoidales que atraviesan las membranas celulares. Dentro de los resultados se encuentra la predicción de segmentos peptídicos, internos al citoplasma, transmembranales y externos a la membrana plasmática [42].

### **ProtScale**

Para la determinación de hidrofobicidad, se utilizó el programa “ProtScale” del servidor ExPASy. Los perfiles de hidrofobicidad se obtienen por medio del algoritmo de Kyte-Doolittle, se utiliza una escala que mide la hidrofobicidad de cada aminoácido que compone a la proteína. Si la proteína es hidrofóbica y por lo tanto apolar, tendrá la capacidad de atravesar la membrana fosfolipídica de las células. De igual forma nos ayuda a conocer propiedades importantes como la manera en la que se pliega la proteína [40].

### **PSIPRED**

PSIPRED es un programa bioinformático de predicción de estructura secundaria, tiene un algoritmo que utiliza métodos de aprendizaje automático de redes neuronales artificiales. Este programa puede predecir la estructura secundaria de una proteína (láminas beta, hélices alfa y bobinas) a partir de la secuencia introducida al servidor en forma de estructura primaria [42].

### **UniProt**

UniProt es un repositorio de datos, y funciona como el almacén de secuencias de proteínas y anotaciones. Esta plataforma contiene varias herramientas para el análisis de proteínas, entre las que se encuentran las modificaciones post-traduccionales, dominios transmembrana y topología, la identificación de dominios funcionales, y clasificación de las familias de proteínas. La herramienta BLAST es una herramienta básica de búsqueda de alineación local, esta nos permite encontrar regiones de similitud entre secuencias, con las cuales es posible inferir

relaciones funcionales y evolutivas, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes [44].

### **SNAPGENE**

Se utilizó el programa SnapGene para realizar la clonación *in silico*, este es un Software mediante el diseño de oligonucleótidos, se visualizó las secuencias de ADN y sus sitios enzimáticos, inserciones, supresiones, sustituciones y para la simulación de la amplificación de secuencias por PCR, así como la inserción de genes en vectores de clonación y finalmente la simulación de electroforesis en geles de agarosa [45].

### **Oligo Analyzer**

El programa Oligo analyzer se utilizó para analizar la secuencia de entrada de los oligonucleótidos, además se obtiene información importante como: contenido de GC, peso molecular, secuencia complementaria, posibles formaciones de horquillas, homodímeros y heterodímeros, formación de estructuras de las secuencias de cebadores y otras características útiles para conocer la viabilidad de los cebadores, esto con el fin de mejorar las posibilidades de una amplificación adecuada [46].

### **SWISS-MODEL**

Swiss Model es un servidor bioinformático que se utilizó para realizar modelados por homología de estructuras de proteínas tridimensionales. Esto mediante el uso de estructuras de proteínas tridimensionales, algunas de sus aplicaciones se

basan en diferentes niveles del modelado de las secuencias y puede aplicarse para identificar posibles interacciones de las proteínas [47].

En la tabla 2 se muestran los programas utilizados para el análisis bioinformático.

**Tabla 2.** Sitios web y programas empleados para las predicciones y análisis *in silico* de la proteína *Lactococcina A*.

Función	Programa	Sitio Web
Predicción de propiedades fisicoquímicas	Protparam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
Péptido Señal	SignalP	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>
Región Transmembranal	TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
Hidrofobicidad	ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>
Estructura secundaria	PSIPRED	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>
Blast	UniProt	<a href="https://www.uniprot.org/blast/">https://www.uniprot.org/blast/</a>
Primers, PCR y Electroforesis	SNAPGEN E	<a href="https://www.snapgene.com/try-snapgene/">https://www.snapgene.com/try-snapgene/</a>
	Oligo Analyzer	<a href="https://www.idtdna.com/calc/analyzer/">https://www.idtdna.com/calc/analyzer/</a>
Estructura terciaria	SWISS-MODEL	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>
	RasMol 2.7.5	<a href="http://www.openrasmol.org/">http://www.openrasmol.org/</a>

## Antibiogramas

Como técnica *in vitro* se realizaron antibiogramas usando el método de Kirby Bauer, los cuales se realizaron en cajas Petri con agar Mueller Hinton (MH). Para preparar el pasto de bacterias se utilizaron las cepas *S. aureus* y se colocaron en medio peptonado a 37°C durante 2 horas, para obtener fase exponencial de las cepas. Se utilizaron bacterias *Lactococcus lactis subsp. cremoris* liofilizadas, las cuales se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante 18-24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos para obtener el sobrenadante, donde se colocaron los discos durante 20 minutos en 3 diferentes concentraciones de cultivo con bacterias (25 ul, 50 ul y 100 ul. respectivamente) y este procedimiento se realizó por duplicado. Para la inoculación del medio sólido, se utilizó un hisopo estéril con el que se frotó las cepas de las bacterias patógenas, de manera suave sobre la placa de agar Mueller-Hinton de manera uniforme, este procedimiento se repitió tres veces sucesivas rotando la placa en toda la superficie de la caja formando una especie de pasto bacteriano. Después se dejó secar el inóculo por 3 a 5 minutos. Pasado este tiempo se colocaron los discos con las cepas de *Lactococcus lactis sub esp. cremoris* sobre el agar con ayuda de pinzas estériles presionando los discos suavemente sobre el medio de cultivo. Se colocaron los antibiogramas a 37°C y se midió su crecimiento en 2, 4, 6 y 8 horas después.

## 7. RESULTADOS

### Secuencias nucleotídicas y aminoácídicas del gen *LcnA*

La base de datos de NCBI nos permitió identificar que la secuencia nucleotídica del gen *LCN-A* es de 228 pares de bases como se observa en la tabla 3. Y el programa ProtParam predijo que el peso molecular de la secuencia aminoacídica es de 5631.19 DA.

**Tabla 3.** a) Secuencia del gen *LCN-A*. b) secuencia de aminoácidos 1.- péptido precursor de 75 aa. 2.- Péptido maduro de 54 aa.

a) Secuencia nucleótidos (228 pares de bases)	<p>&gt;NZ_AP018500.1:35095-35322 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris plasmid pC41 C4 DNA, complete genome</p> <p>ATGAAAAATCAATTAAATTTTAATATTGTTTCAGATGAAGAACTTT            CAGAAGCTAACGGAGGAAAATTAACATTTATTCAATCGACAGCGG            CTGGAGATTTATATTACAATACTAATACACACAAATATGTTTACC            AACAAACTCAAACGCTTTTGGGGCTGCTGCTAATACCATTGTTA            ATGGATGGATGGGTGGCGCTGCTGGAGGTTTCGGGTTGCACCATT            GA</p>
b) Secuencia aminoácidos 1.- (75 aa.)	<p>&gt;WP_015081786.1 lactococcin family bacteriocin [<i>Lactococcus lactis</i>]</p> <p>MKNQLNFNIVSDEELSEANGGKLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKYVYQ            QTQNAFGAAANTIVNGWMGGAAGGFGLHH</p>
2.- (54 aa.)	<p>KLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKTVYQQTQNAFGAAANTIVNGTMG            GAAGGFGLHH</p>

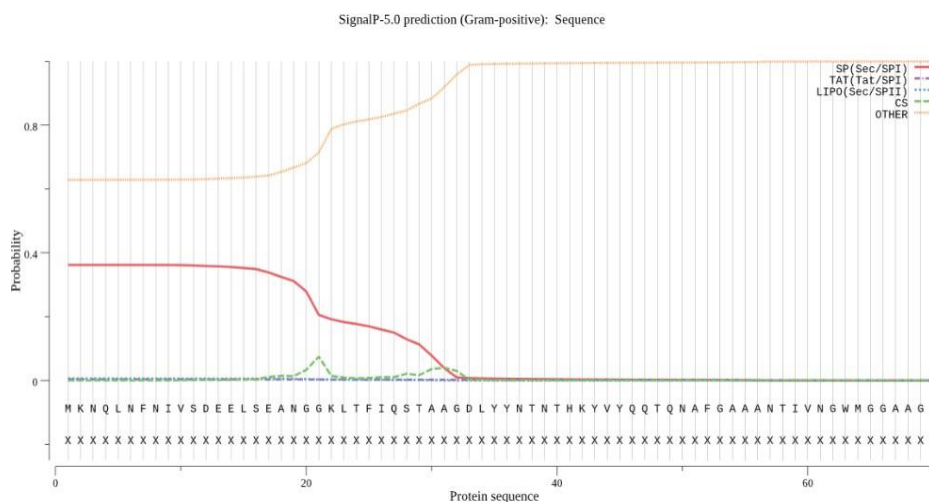
#### 7.1 Análisis *in silico*

De acuerdo a lo establecido para las propiedades fisicoquímicas a través del programa ProtParam la secuencia aminoacídica mostró tener un índice de

inestabilidad de 14.11, un tiempo medio de vida mayor a 20 h; un punto isoeléctrico de 5.76, un índice alifático de 65.20 y un índice de hidropatía de -0.376.

## 7.2 Predicción de péptido señal

La presencia de péptido señal se analizó con el programa SignalP 5.0 en donde se predijo que tiene un Sec/SPI o péptidos señal secretores "estándar" transportados por el translocón Sec y escindidos por la péptido señal I en la secuencia de aminoácidos de la bacteriocina *Lactococcin-A* (Figura 2). Ya que *LCN-A* se sintetiza como un precursor de 75 aminoácidos. El péptido líder de 21 aminoácidos de *LCN-A* tiene un extremo N con carga positiva seguido de un estiramiento hidrófobo típico de péptidos señal de bacterias gram positivas.

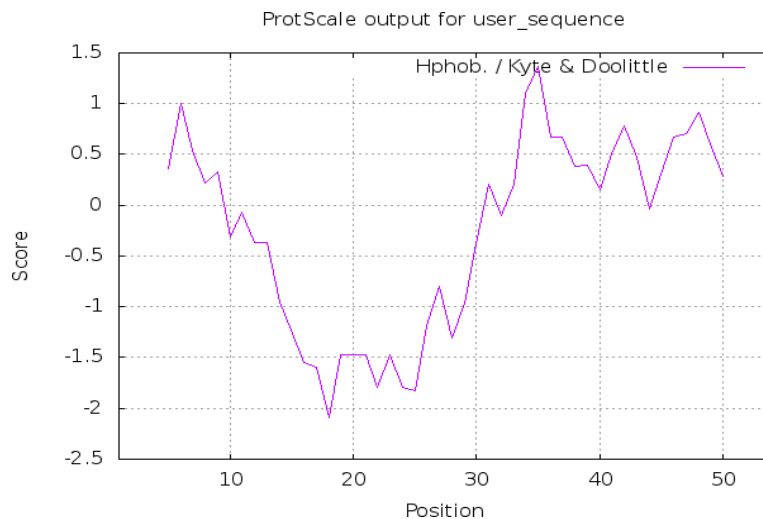


**Figura 2.** Representación esquemática del péptido señal, obtenido a través del programa signalP 5.0. El eje de las **x** (abscisas) corresponde a la cadena de aminoácidos y el de las **y** (ordenadas), a la puntuación que otorga el programa. En la gráfica, se informan tres

probabilidades distintas; La proteína puede tener un péptido señal Sec (Sec / SPI), un péptido señal de lipoproteína (Sec / SPII), un péptido señal Tat (Tat / SPI) y otro (la probabilidad de que la secuencia no tenga ningún tipo de péptido señal).

### 7.3 Predicción de hidrofobicidad de la proteína Lactococcina-A

El análisis de regiones hidrofóbicas se llevó a cabo por el programa ProtScale utilizando el método de algoritmo Kyte & Doolittle el cual emplea una escala que otorga valores de hidrofobicidad. El programa utiliza un umbral de 1.5 por lo que, las regiones que se encuentren por arriba de ese valor serán las regiones consideradas como altamente hidrofóbicas. Se obtuvo un pico cercano al umbral entre los aminoácidos 30 y 40 de la proteína, como se muestra en la figura 3.

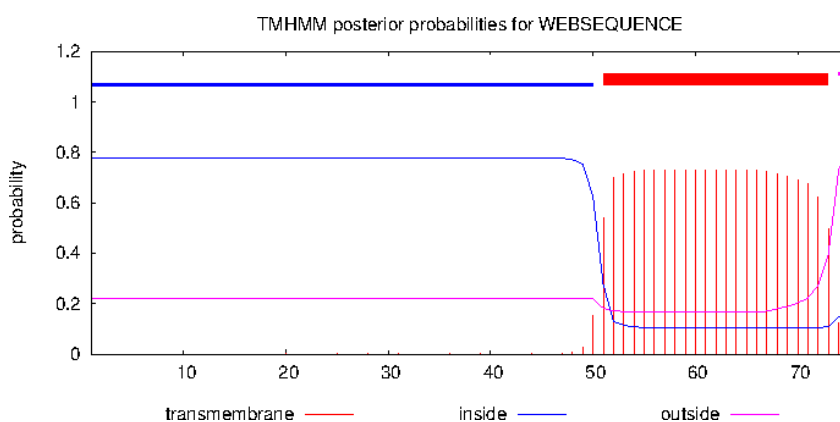


**Figura 3.** Predicción de las regiones hidrofóbicas de la proteína lactococcina A con base en el algoritmo de Kyte & Doolittle

### 7.4 Predicción de la región transmembranal



El resultado de la predicción de la región transmembranal fue definido por el programa (TMHMM, Phyre2). El programa TMHMM muestra que *LCN-A* es una proteína transmembrana, la primera región que va del aminoácido 1 al 50 se encuentra dentro del citoplasma, los aminoácidos 51 al 73 se encuentran dentro de la membrana, los aminoácidos 74 y 75 se encuentran fuera de la membrana (ver figura 4).



**Figura 4.** Predicción de regiones transmembranales con el programa TMHMM). En rojo se muestra la región transmembranal; en azul la región que está dentro de la membrana y en rosa las regiones que están fuera de la membrana.

## 7.5 Predicción de la estructura secundaria



## 7.7 Diseño de oligonucleótidos para el gen *Lcn-A*

Se realizó un diseño de Oligonucleótidos con los programas SnapGene y Oligo Analyzer. Los primers que se utilizaron para la amplificación del fragmento de interés se muestran a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño de primers para la amplificación del fragmento de interés a partir del gen *Lcn-A*

Primers	Secuencia	Longitud	Tm °C	%CG	Amplicón
FW-LCA	CGCGCGCGATGAAA AATCAATTTAA	25 pb	57.4	40	237pb
RV-LCA	CGTTTCGATTCTAGA TCAATGGTGC	25 pb	56.1	44	

## 7.8 Análisis de homología de secuencias

Para la búsqueda de proteínas homólogas, se utilizó BlastP de Uniprot para realizar los estudios de similitud considerando las proteínas reportadas por el BlastP. De los datos obtenidos en el alineamiento se seleccionaron dos dominios con funciones relacionadas. Se registró homología con la secuencia perteneciente a la Proteína J3NIW7\_GAET3 (cepa R3-111a-1) del hongo *Gaeumannomyces tritici* (ver figura 7) con el cual comparte una identidad de 88%, el cual contiene el

dominio de peptidasa S59 del gen 20341659 un constituyente estructural del poro nuclear, el dominio se encuentra en la posición 911-1047

```

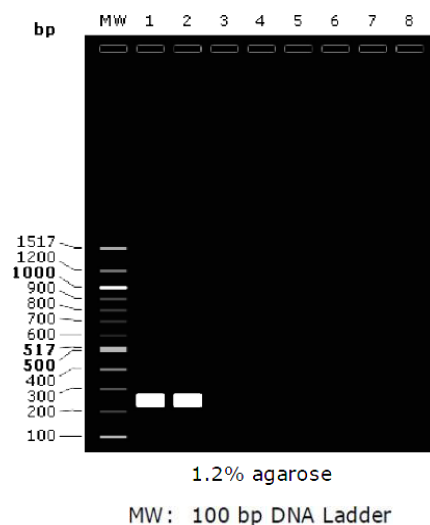
Query                6      QSTAAGDLYNTNTHKTVYQQTQNAFGAAANTIVNGTM---GGAAGGFG      51
                   QST G  NTNT  Q T  AFG AN  G +  GG +GGFG
J3NIW7 J3NIW7_GAET3 19      QSTGFGGGFGTNTNTTSAFGQATPSAFGTPANNTTGGGLFGGGGISGGFG      67

```

**Tabla 5.** Alineación de las secuencias de *LCN-A* de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y la Proteína J3NIW7\_GAET3 -que contiene el dominio de peptidasa S59, del hongo *Gaeumannomyces tritici*.

### 7.9 Amplificación por PCR *In Silico*

Se realizó la amplificación del fragmento de interés del gen *LCN-A*, mediante un PCR en el Software de biología molecular SnapGene el producto de PCR visualizado mediante una simulación *in silico* de electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% muestra un amplicon con el tamaño esperado 270 pb. (Figura 8).

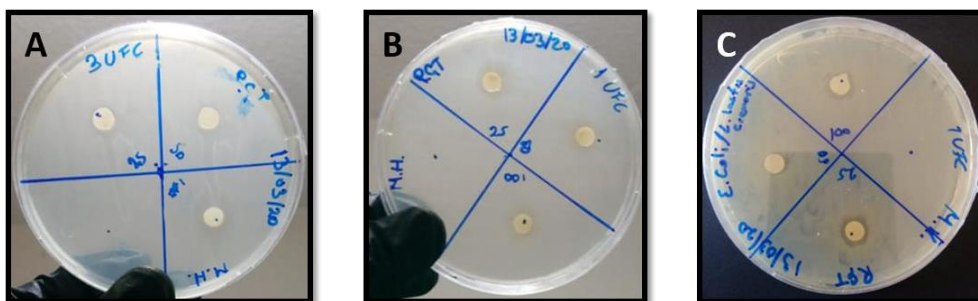


**Figura 7.** Amplificación del gen *LCN-A* En el carril M) Marcador de peso molecular (Escala de ADN 100 PB); carril 2) Producto

de PCR del gen amplificado con un tamaño aproximado de 270 pb.

### 7.10 Antibiogramas

Como técnica *in vitro* se realizaron antibiogramas. Se colocaron los antibiogramas a 37°C y se midió su crecimiento en 2, 4, 6 y 8 horas después (ver figura 9), para observar el crecimiento durante estos periodos de tiempo, también se registró la medida de los halos de inhibición (ver tabla 6).



**Figura 8.** A) Antibiograma de *S. aureus* en presencia de LCN-A con 2 h. de incubación en concentraciones B) 4 h después de incubarse, C) 8 h después de incubarse.

**Tabla 6.** Medida de los halos de inhibición con LCN-A. Las concentraciones que se usaron en cada disco fueron de 25, 50 y 100 ul, a las 2, 4, 6 y 8 h de incubación.

horas	25ul	50ul	100ul
2	2 mm	2 mm	3 mm
4	3 mm	2 mm	3 mm
6	1.5 mm	1.5 mm	2 mm
8	1.5 mm	1.5 mm	2 mm

## 8. DISCUSIÓN

El análisis *in silico* de la secuencia del gen de la bacteriocina *lactococcina A* de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, se realizó mediante el uso de diversas herramientas computacionales que muestran datos importantes, estos pueden ser

de utilidad para conocer las propiedades de este gen y definir si tiene potencial como agente antimicrobiano. Una de las características importantes de las bacteriocinas es el tamaño de su secuencia, *LCN-A* es un péptido de 228 pares de bases, el cual codifica para un prepéptido de 75 aminoácidos, que tiene una región N-terminal de 21 aminoácidos, este actúa como péptido señal, como menciona Holo y colaboradores (35), el cual participa en el sistema de secreción de las proteínas, al separarse de la secuencia inmadura queda un péptido maduro de 54 aminoácidos, con un peso molecular de 5631.19 Da. propio de las bacteriocinas de la clase IIC, tal como lo menciona Mondragon y colaboradores (24). De esta manera pueda ser reconocido por las proteínas que participan en el proceso de exportación para que el péptido final sea transportado gracias al mecanismo general de secreción de las bacterias y otros organismos procariontes (Blaauwen 1996).

Por otra parte, dentro de las propiedades fisicoquímicas que se analizaron se encuentra el índice de inestabilidad, cuando una proteína tiene un índice de inestabilidad por encima de 40 se puede predecir que la proteína es inestable (35). La proteína *LCN-A* tiene un índice de estabilidad de 14.11, según Gasteiger en 2005, significa que se trata de un péptido estable. Por otra parte, se reportó una vida media de 20 horas *in vivo*, que es el parámetro del tiempo promedio que tarda una proteína para desaparecer después de ser sintetizada en la célula, los resultados indicaron que tiene un tiempo medio de vida mayor a 20 h, este tiempo de vida la categoriza dentro de los péptidos de larga duración. En cuanto al índice

de hidropatía se obtuvo un valor de -0.376, al respecto Hooda en 2011 menciona que valores negativos permiten mejor interacción con el agua y que entre más bajo índice de hidropatía hay mayor posibilidad de establecer dicha interacción, lo cual da indicios sobre la topología, dominios transmembranales y probables sitios antigénicos expuestos en la superficie de la proteína. Se determinó un índice alifático de 65.2. Gasteiger en 2005, menciona que este valor es significativamente mayor en proteínas de bacteria termófilas que en proteínas ordinarias, lo que se considera un factor positivo en el incremento de la termoestabilidad de las proteínas. En cuanto a la predicción de hidrofobicidad se determinó que la secuencia de *LCN-A* presenta una región hidrofóbica en su estructura, corroborado por el perfil hidrofóbico de Kyte-Doolittle esta característica, es requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad permitiéndole realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno que interaccione con la membrana (36).

La selectividad para el diseño de oligonucleótidos, se llevó a cabo bajo los parámetros óptimos de temperatura de fusión ( $T_m$ ), para la hibridación con el ADN molde fueron de 57.4°C y 56 °C, para el oligonucleótido sentido y el oligonucleótido anti-sentido respectivamente, por otra parte, el porcentaje de citosinas y guaninas le confiere mayor fuerza y resistencia a la desnaturalización fue del 40 y 44% respectivamente. Ambos oligonucleótidos tuvieron una longitud de 25 pb. Tampoco presentaron formaciones de dímeros ni horquillas lo cual es importante para que la secuencia amplifique de manera adecuada.

La determinación de la homología la secuencia del gen de *LCN-A* con otras secuencias se llevó a cabo con el programa BlastP utilizando la secuencia aminoacídica, mostrando un score de 88% con la secuencia la proteína J3NIW7\_GAET3, que contiene el dominio de peptidasa S59 del gen 20341659, un constituyente estructural del poro nuclear, lo que indica que podrían tener una función parecida, especialmente, en su función antigénica (41).

Gracias a las predicciones de los programas utilizados se logró deducir que el gen de *LCN-A* codifica para una proteína transmembrana, lo que indica que es secretada fuera de la célula para realizar su función en la respuesta inmune contra bacterias patógenas (42). En cuanto a la predicción de su estructura secundaria, se identificaron motivos estructurales asociados a proteínas, que son regiones importantes en los péptidos formadores de poros de membrana permitiendo la salida de cualquier soluto intracitoplasmático, como lo menciona Morgan en 1995.

Posteriormente en la estructura tridimensional de la bacteriocina, se observaron algunas características. Barreto 2012, indica que estas son importantes para comprender los detalles de una proteína en particular, como son la conformación y ángulos de torsión que determinan su plegamiento.

Los antibiogramas realizados, mostraron un halo de inhibición durante las primeras 8 horas de incubación especialmente en las primeras 4 horas, aunque los resultados de los antibiogramas arrojaron valores mínimos en cuanto a inhibición de las bacterias patógenas en comparación a los antibióticos



convencionales, aun así, se confirmó que la LCN-A de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* tiene efecto inhibidor de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*.

Como menciona Londoño, en 2015, la detección de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas es de ayuda para realizar otros estudios que puedan establecer su potencial antimicrobiano al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas lo que indica que podrían ser una alternativa antimicrobiana en el área médica y de bioconservación en la industria de alimentos.

## **9. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos *in silico*, se obtuvieron propiedades fisicoquímicas y estructurales que sugieren una posible función antimicrobiana. También se comprobó por medio de los estudios *in vitro* que estas bacterias inhiben el crecimiento de algunas especies de bacterias patógenas.

## **10. PERSPECTIVAS**

Estudios futuros pretenden evaluar efectividad para su incorporación como conservador en alimentos o su adición a productos simbióticos que permitan reducir la presencia de bacterias patógenas.

## 11. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud, 2015. Datos Y Cifras Sobre Las Enfermedades De Transmisión Alimentaria. [online] Organización Mundial de la Salud. Available at:<[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg\\_infographics/es/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/)> [Accessed 25 April 2020].
2. Oliveira ABA, Paula, CMD, Capalong, R., Cardoso, MRI., Tondo, ED. 2010. Doenças Transmitidas por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos e Aspectos Gerais: uma revisão. Rev HCPA; 30: 279-285.
3. Rodríguez Torrens, Herlinda, Barreto Argilagos, G., Sedrés Cabrera, Martha, Bertot Valdés, J., Martínez Sáez, S., Guevara Viera, G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria [en línea]. 2015, 16(8), 1-27[fecha de Consulta 26 de Abril de 2020]. ISSN:. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63641401002>
4. Organización Mundial de la Salud. Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2015 [cited 25 April 2020]. Available from: [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg\\_infographics/es/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/)
5. Su J e. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2019 [cited 5 December 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451182>

6. Caporaso J, Paszkiewicz K, Field D, Knight R, Gilbert J. The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank [Internet]. NCBI. 2019 [cited December 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071345>
7. OIE - World Organisation for Animal Health [Internet]. [cited 27 April 2020]. Available from: <https://www.oie.int/es/seguridad-sanitaria-de-los-alimentos/seguridad-sanitaria-de-los-alimentos/>
8. CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO [Internet]. Fao.org. [cited 27 April 2020]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/#c453333>
9. CDC. Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2018 [cited 28 April 2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
10. Guía de Referencia Rápida Diagnóstico y Tratamiento para la Fiebre Tifoidea [Internet]. consejo de salubridad genral. [cited 28 April 2020]. Available from: <http://evaluacion.ssm.gob.mx/pdf/gpc/grr/IMSS-259-10.pdf>
11. Betran A, Cortez A. Evaluación de la resistencia antibiótica de Escherichia coli en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro [Internet]. Seq.es. 2015 [cited 29 April 2020]. Available from: [https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq\\_0214-3429\\_28\\_5\\_betran.pdf](https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_5_betran.pdf)
12. CDC. Las infecciones mortales por estafilococo [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cited 30 April 2020]. Available from:

[https://www.cdc.gov/spanish/mediosdecomunicacion/comunicados/p\\_vs\\_estafilo\\_coco\\_030519.html](https://www.cdc.gov/spanish/mediosdecomunicacion/comunicados/p_vs_estafilo_coco_030519.html)

13. Ministerio de salud. Guía de medicamentos esenciales para el PNA antimicrobianos [Internet]. 1st ed. Buenos aires, Argentina; 2017 [cited 30 April 2020]. Available from:

<http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001087cntmedicamentos-esenciales-primer-nivel-atencion-antimicrobianos.pdf>

14. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo [Internet]. Fao.org. 2004 [cited 1 May 2020]. Available from: <http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s05.htm>

15. Patridge S., Kwong S., Firth N. and Jensen S. 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 31: 17.

16. Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42–55. doi:10.1016/s0213-005x(03)72873-0

17. OMS, Resistencia a los antibióticos 2017, [Internet]. Who.int. 2019 [cited 5 December 2019]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

18. International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations, 2015. IFPMA. Rethinking the way we fight bacteria [Internet]. Geneva [https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2016/02/IFPMA\\_-\\_Facts\\_And\\_Figures\\_2015\\_web.pdf](https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2016/02/IFPMA_-_Facts_And_Figures_2015_web.pdf)

19. OMS. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Who.int. 2018 [cited 3 May 2020]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>.
20. Tafur, D., Torres, J., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226
21. Tonarelli G, Simonetta A. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos
22. Perez H., Zendo T. and Sonomoto K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cells Factories* 13: 1
23. Feliatra F., Abidin Z., Yuda H., Rahmi W., Nursyirwani N. and Dahliaty A. 2018. Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish. *F1000 Research* 7:415.
24. Mondragón Preciado, G.; Escalanteminakata, P.; Osuna Castro, J. A.; Ibarra Junquera, V.; Morlett Chávez, J. A.; Aguilar González, C. N. & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59).
25. Chen H., Mechanic L., Racine B., Clarke J., Gillanders E. and Feuer E. 2015. Genetic data simulators and their applications: an overview. *Author Public Access* 39:2.10.
26. KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins Vásquez s. y cols. 71 produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 39-86.

27. González Martínez B.E., Gómez Treviño M. y Jiménez Salas Z. (2003) Bacteriocinas de Prebióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Vol. 4 Núm 2.
28. Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGdM, Converti A, Oliveira RPdS (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32: 134-142
29. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš, A., Habjanič, K. y Matošić, S. 2010. Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48(3):296-307
30. Monroy DMC, Castro BT, Fernández PFJ, Mayor- ga RL (2009) Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73: 63-72.
31. March-Rosselló G. Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos [Internet]. Elsevier. 2017 [cited 8 May 2020]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-rapidos-deteccion-resistencia-bacteriana-S0213005X16303986>
32. López M. Caracterización *in silico* de una región antigénica del gen RmS-19 de la garrapata *Rhipicephalus microplus* A partir de la cepa mexicana “Media Joya”. Tesis para obtener el título de ingeniero de biotecnología: Universidad Politécnica del Estado de Morelos; 2018.
33. Escalona M., Rocha S., and Posada D. 2016. A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. *Europe PubMed Central* 17: 459-469.

34. Peng B., Chen H., Mechanic L., Racine B., Clarke J., Gillanders E. and Feuer E. 2015. Genetic data simulators and their applications: an overview. *Author Public Access* 39:2.10.
35. Holo, H., Nilssen, O., & Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3879–3887. doi:10.1128/jb.173.12.3879-3887.1991
36. Van Belkum, M.J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.N. & Abee, T. 1991b. "The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner". *J. Bacteriol.*, 173: 7934-7941
37. Wilkins, M., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J., Williams, K., Appel, R., & Hochstrasser, D. (2005). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 112, 531–552.
38. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol.* 2012;61:809–12.
39. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119:243-249.
40. Petersen, T., Brunak, S., Von-Heijne, G., & Nielsen, H. (2011, September). SignalP 5.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. United States.

41. Krogh, A., Larsson, B., Von-Heijne, G., & Sonnhammer, E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580
42. Buchan, D., Minneci, F., Nugent, T., Bryson, K., & Jones, D. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41, W349-57
43. Bairoch, A. et al. (2005). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic acids research*, 33(1), D154-D159.
44. The UniProt Consortium UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017 45:D158–D169
45. SnapGene software (from Insightful Science; available at [snapgene.com](http://snapgene.com))
46. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
47. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296-W303 (2018).
48. Hooda V. Physicochemical, Functional and structural characterization of wheat germin using in silico methods. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2011; 3 (1): 35-41.
49. Morgan, S., Ross, R.P. y Hill, C. 1995. "Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M". *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2995-3001.





**FACULTAD DE NUTRICIÓN**

**Cuernavaca, Morelos 1de marzo del 2022**

**ASUNTO: VOTO PROBATORIO**

**Mtra. Jesica López Bucio Fabián**  
**Directora de la Facultad de Nutrición**

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de revisor de tesis de licenciatura de la estudiante **Karla Denisse Taboada Apaez**, he leído y revisado el trabajo titulado: “**Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano**”, y considero esta cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para tesis profesional de la UAEM. Con lo anterior mencionado la alumna puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

**ATENTAMENTE**

**Dr. Marcos Amed Salazar Blas**  
**Sinodal revisor de tesis**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

MARCOS AMED SALAZAR BLAS | Fecha:2022-03-01 11:07:22 | Firmante

UVvnaYAOjwPVk561yO8Isojr3zhHuDKTj/fESHVlJK6lN9jnebFdg+oDW1AWTbM/tqDyZz6Fb41lpvu0d/ZmLu0liCul9Bm09JYBkX1aav0QHdLEQP/PkMSYiXO09Gp2S9kK5Ta7kKPO8Jl3gEV2jRSCrYVZ19taw0pSifm7DdRbF5qyh8it8EB0+9Wn6eqewEgqpggD9ryufuPMowl8lBzgWxtGzsmP2iFFePdCUNcurgKjyW08E7cwGqUd/ncdrDmwmEfPlq2k62eLgts5eucV8ltNsFle4OKZthqX+QCKlgVDZbLSU2G2ib9fSD5BBQgIK+ezxVDBfj4U4H4yA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[OhXt8QwLW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pqO0EJekJ1beW56cRYBaWrI7ji6kODfx>





**FACULTAD DE NUTRICIÓN**

**Cuernavaca, Morelos febrero del 2022**

**ASUNTO: VOTO PROBATORIO**

**Mtra. JESICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICION**

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de jurado de examen de grado del estudiante en licenciatura en nutrición **Karla Denisse Taboada Apaez**, he leído y revisado la tesis titulada: “**Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano**”, y considero esta cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para tesis profesional en laUAEM. Con lo anterior mencionado el alumno puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

**ATENTAMENTE**  
**Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena**  
**SINODAL DE TESIS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2022-02-13 11:01:09 | Firmante**

Xo9v+VSqt1pRR0O9E9PKd/gGV0Y3HXZcuUcTX5xvcG6uhxm39pdz9eXT0MaPiKFGi5zcNWVYwifD63pM6jomPGfF2z4N93KOZPk+G444a9bMu7lBxMzUgyMB3MWAcURmMoxF2re+z+1Xnosl7Z0mWXZE2Ev6xRShZcbHLloAPq7RBgL0MaF+NLhQOpwaQ+QgOwmVxwm5SosWiLBeXeXvlluyjbdTSPs5k/1F7oQZMYZVh06LhCopS2E92xolmBB6154NK A5XZ6bLYN/oN3Q7qhbZx3paijmLwpqtt9bh1zKPMaV0yPAry3VQ5iJqDbz4CzpFTri1jdOGvyMUUkNivA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**5vUGPJfRY**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dsAQ1cDtGPg1niqLSGRLxhVUZBglBLvA>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 30 de mayo del 2022.

Asunto: Voto aprobatorio.

**MTRA. JESICA LOPEZ BUCIO FABIAN.**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición **Karla Denisse Taboada Apaez**, he leído y revisado la tesis titulada “**Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano**, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
FIRMA ELECTRÓNICA  
M. en C. Diana Rivera Bahena



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

DIANA RIVERA BAHENA | Fecha:2022-05-30 07:50:43 | Firmante

RLYDqoCuHvOxr7+7sFkd5/RL0hCcLyp1e0lpwIB2wnilgpUaPxpq3qBoxbBLkK5bfFhErpn4ZrOP88VrmP825e1lXBaW3Z0Vni5u7hXM69hl5bOmW6uXeCS1Kn1mbQsO9Q9+cNxwQVd88Yet/0jPTibIMW9WmQ5iHdoUSHw8BmclliCWnshKKYQps1Hcp+F+r5ogTaz+SqV/E5KI6icW9tW0+CeaVk7q2TWCLXsU3SGPRrLLdX4QpkvMMvNntbQxciP2uAXxp7Wry8zTqtouFog8ltklwCFwO9zmP8G5ADcTTYbOoXWVcvVprtM1eYi+amnneF//hFEXxn4ljLP06w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[wKNZb3a2U](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uyxQiEL6Ux3Xerq8VEkf7i7if7plQPBe>



Cuernavaca, Morelos marzo del 2022

ASUNTO: VOTO PROBATORIO

**Mtra. JESICA LÓPEZ BUCIO FABÍAN**

**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN**

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de jurado de examen de grado el estudiante en licenciatura en nutrición **Karla Denisse Taboada Apaez**, he leído y revisado la tesis titulada: **“Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano”**, y considero que cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para la tesis profesional en la UAEM. Con lo anterior mencionado el alumno puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

A T E N T A M E N T E.

MC. MARÍA EULALIA LOURDES PERALTA FLORES

SINODAL DE TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

MARIA EULALIA LOURDES PERALTA FLORES | Fecha:2022-03-09 23:16:06 | Firmante

xZqSN0T0Pporq7Yy26rB1Z/dvzgfhl91Y/3725yvfXmp3UTCqR7xztZU3aneHvYU9oVkyw4BKVcnGea1WWKuxW0L5o4qbFqtU2Ppz+7HZVUo2dSfjPgXBU8G2s+zjnK0GbqyugITLd/oAyrCLX3BmpeQ4SXFO/6obVQ1dzh9MB9jMf/H/QHitklbos7uRsEMMumW8KHTI46UsO7iTJQMaDih8ymV6ymA/k3l+UxxO67yXe06qL9dPluI7W6Pz+dPoKfZ2nZBq38LLPfVLc9hfF+p+L1luJmy1oBRMSSmKKkrQi5yPNpuBxtuStRsP0j3HUG3s0UIEkw7NA393xRiQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KdvDNfMiW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4bMgUcY2O3aCpcnHgjFie0xikS4cXeRs>





**Cuernavaca, Morelos 05 abril del 2022**

**ASUNTO: VOTO PROBATORIO**

**Mtra. JESICA LÓPEZ BUCIO FABÍAN**

**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN**

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de jurado de examen de grado del estudiante en licenciatura en nutrición **Karla Denisse Taboada Apaez**, he leído y revisado la tesis titulada: **“Análisis *in silico* de la proteína lactococcina A de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como posible agente antimicrobiano”**, y considero que cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para la tesis profesional en la UAEM. Con lo anterior, el alumno puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

**A T E N T A M E N T E.**

**MC. RAÚL DÁVILA DELGADO**

**SINODAL DE TESIS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAUL DAVILA DELGADO** | Fecha:2022-04-05 13:39:51 | Firmante

LJRVSvn4vkmg+Zm/HRjbiJoRY6eEYUATzmUJWzbEqiDYdk73s/fSX57JzW S+4BleRSwOziJTQWymle08UG7MGTEEBwPeB5Esmq2J5ZdBhHZPEnVJSqnsCSdVN+swZ/HHZ QY5o2D5g+itKWBJXMibh6OajJ8jpw5P25oUTuw7XQ9mQBSUx0XtieqKS1q9LNxQbpgBERwU3Qgtfn9nHs+KMVBv1in9mJV87IGRAtT61Hr1Rproh86vOeyrbUhNLwPL0CrqYFA Upx2ymtu3bzujCjKMc8BJq0eA6AhCQ4+mi1J0VvF/UvuU3zWiCDKao7hCM1EQTfmeUk2r/h8fSoGgA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RubB6dm3N](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y1U6cM7zAJCTxHavnPru8xrFDmGq7Jji>

