



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO PROTECTOR DE PROTEÍNAS LEA DE
Pseudomonas OBTENIDAS DEL GOLFO DE MÉXICO**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

MARTHA ALEJANDRA CATALÁN JACOBO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SELMA JULIETA RODRÍGUEZ SALAZAR

CUERNAVACA, MORELOS

Marzo, 2023

1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1 Ambientes marinos	5
1.2 Microorganismos marinos	5
1.3 Uso biotecnológico de los microorganismos	6
1.3.1. Biotecnología industrial	7
1.3.2. Biotecnología farmacéutica	7
1.3.3. Biotecnología agrícola.....	8
1.3.4. Biotecnología ambiental.....	8
1.4 Bacterias marinas	9
1.5 Derrame petrolero.....	10
1.6 Biorremediación	11
1.7 Generalidades de <i>P. aeruginosa</i>.....	112
1.8 Estrés abiótico en microorganismos	13
1.9 Proteínas LEA.....	144
1.9.1 Clasificación	15
1.9.2 Funciones.....	19
2.- ANTECEDENTES.....	200
3. JUSTIFICACIÓN.....	233
4. HIPÓTESIS	233
5. OBJETIVO GENERAL.....	233
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	233
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	244
8. METODOLOGÍA	244
8.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen LEA.....	24
8.2 Protocolo de extracción de ADN cromosomal por KIT.....	25
8.3 Amplificación de gen LEA por PCR.....	26
8.4 Protocolo de extracción de bandas de gel por KIT.....	26
8.5 Extracción de ADN plasmídico por KIT.....	28
8.6 Ensayo de restricción enzimática y ligación de fragmentos digeridos....	29

8.7 Transformación de células competentes.....	29
8.8 PCR en colonia.....	30
8.9 Gliceroles.....	31
8.10 Inducción de las proteínas LEA.....	32
8.11 Lisis celular.....	33
8.12 Western blot.....	34
8.13 Pruebas de estrés en <i>E. coli</i>	36
9. RESULTADOS.....	37
9.1 Amplificación de gen <i>lea</i> en <i>Pseudomonas</i>	37
9.2 Obtención de transformantes de <i>E. coli</i> con el gen <i>lea</i>	38
9.3 Expresión y purificación de proteína LEA de <i>Pseudomonas</i> en <i>E. coli</i>	39
9.4 Inmunodetección por Western blot.....	40
9.5 Ensayos de tolerancia al estrés en células de <i>E. coli</i>	42
9.5.1 Ensayo Freeze-thaw.....	42
9.5.2 Ensayo radiación Ultravioleta (UV).....	44
9.5.3 Ensayo de salinidad.....	44
10. DISCUSIÓN.....	45
11. CONCLUSIONES.....	54
12. PERSPECTIVAS.....	54
13. BIBLIOGRAFIA	55

ABREVIATURAS

goM	Golfo de México
PIDs	Proteínas Intrínsecamente Desordenadas
GEI	Gases de Efecto Invernadero
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
H ₂ O	Agua
LB	Luria Broth
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
O/N	Over night (durante una noche)
UV	Ultravioleta
nm	Nanometros
LDH	Lactato deshidrogenasa

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución total de la biomasa marina y sus subgrupos	6
Figura 2. Morfología de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Figura 3. Versatilidad del estrés abiótico.	13
Figura 4. Respuestas de los organismos ante el estrés	14
Figura 5. Viabilidad de células transformadas en <i>E. coli</i> bajo diferentes condiciones de estrés	21
Figura 6. Choque térmico en colonias de células silvestres (WT) y mutación de Leam (Δ leamA)	22
Figura 7. DNA cromosomal de cepas de <i>Pseudomonas</i>	37
Figura 8. Amplificación de genes lea de cepa de <i>Pseudomonas</i>	38
Figura 9. PCR en colonias y ensayo de restricción	39
Figura 10. Inducción de proteínas LEA	40
Figura 11. Inducción de proteína PaLEA	41
Figura 12. Inducción y Western blot de PaLEA.	42
Figura 13. Porcentaje de supervivencia de LEA en Freeze- thaw	43
Figura 14. Porcentaje de supervivencia de LEA en UV	44
Figura 15. Porcentaje de supervivencia de LEA en NaCl	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Campos biotecnológicos y sus productos	9
Tabla 2. Grupos de proteínas LEA	19
Tabla 3. Diseño de oligonucleótidos palea	24

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Ambientes marinos

El 70.8% de la superficie del planeta que equivale a 362 millones de km² está cubierta por océanos y mares, estos ocupan un enorme espacio favorable para el desarrollo de la vida, determinan los climas y el tiempo, son el motor que transporta el calor y el agua dulce de la atmósfera. Además, contribuyen enormemente a la biodiversidad del planeta (Lara-Lara, 2008), sin los océanos la vida no sería posible sobre la Tierra, pues más del 85% del oxígeno que utilizan tanto las plantas como los animales acuáticos y terrestres, es producido por el plancton vegetal que vive en ellos (Nahle, 2008).

Es importante decir que el ambiente marino es uno de los más adversos debido a su temperatura, pH, salinidad, corrientes, regímenes de precipitación y patrones de viento, ya que estos suelen ser muy variables; a pesar de esto, variedades de organismos se encuentran presentes en dicho ecosistema desde los grandes mamíferos hasta los diminutos microorganismos, los cuáles se adaptan a las condiciones adversas, por lo tanto, poseen características complejas de adaptación (Dash *et al.*, 2013).

1.2 Microorganismos marinos

Los microorganismos son el grupo más abundante y diverso en la tierra, ya que constituyen el 60% de la biomasa total (Demain y Sánchez, 2009), (Figura 1) además son responsables de llevar a cabo procesos como la fotosíntesis (la cual es realizada en mayor porcentaje por microorganismos marinos que por las plantas), la regulación de los componentes en la atmósfera y el ciclo biogeoquímico vital (Huse *et al.*, 2008). Por otro lado, también influyen en el clima, reciclan nutrientes, degradan contaminantes y nos proporcionan muchos productos y procesos de valor económico (Tichet *et al.*, 2010).

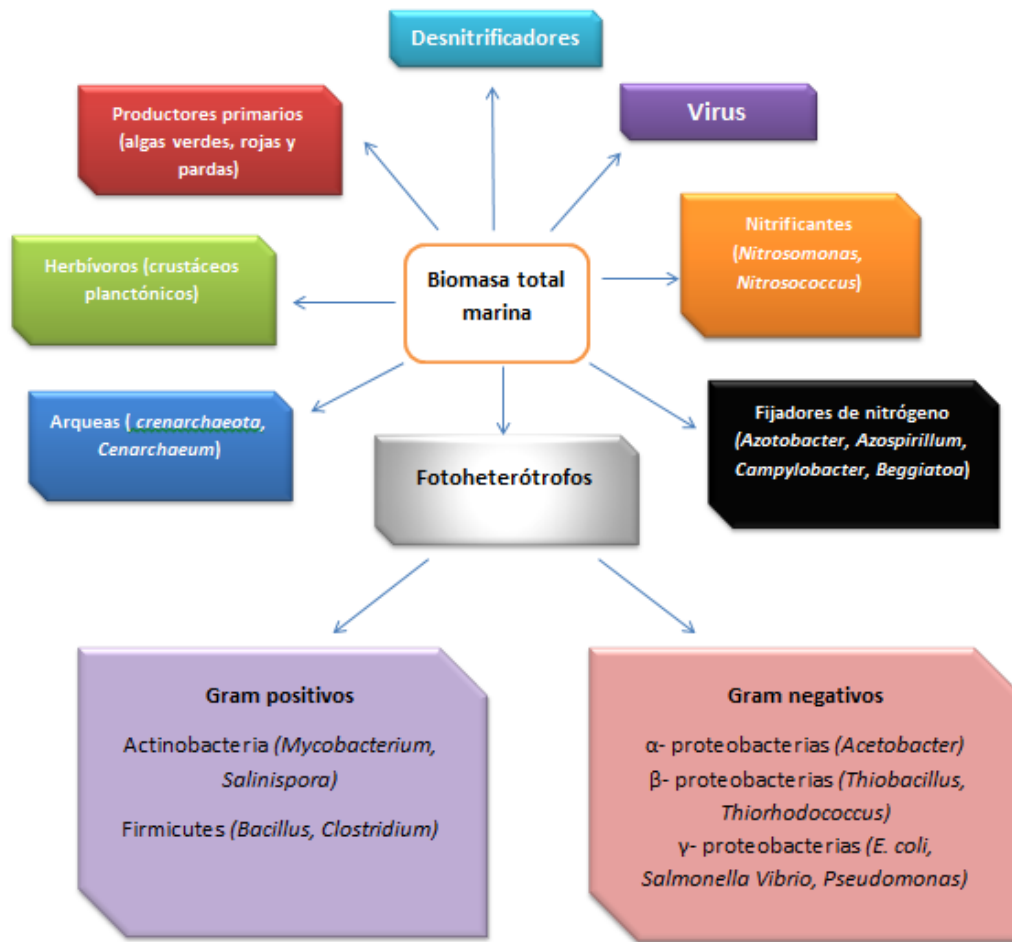


Figura 1. Distribución total de la biomasa marina y sus subgrupos (Dash *et al.* 2013).

En mil millones de años de evolución, los microorganismos han acumulado notable heterogeneidad fisiológica y funcional, y en la actualidad constituyen una reserva casi inagotable de diversidad genética. A pesar de su papel fundamental en la sostenibilidad de la Tierra y sus aplicaciones biotecnológicas actuales y potenciales, gran parte de las capacidades de diversidad y metabólicas de los microorganismos todavía permanecen sin explotar (Tang y Zhao, 2009).

1.3 Uso biotecnológico de los microorganismos

El potencial biotecnológico de esta inmensa diversidad natural de los microorganismos marinos se puede mejorar aún más por herramientas tales como:

ingeniería de enzimas, ingeniería metabólica y evolución dirigida. Como consecuencia de ello, los microorganismos aislados y comunidades microbianas se han convertido en una fuente importante de productos y actividades biológicas con aplicaciones en la industrias (Tabla 1) por ejemplo, la producción de macromoléculas, metabolitos o compuestos bioactivos (Tang y Zhao, 2009). En los siguientes campos se hacen uso de los distintos microorganismos.

1.3.1 Biotecnología industrial

Este campo se basa en el uso de células vivas y / o sus enzimas para la producción sostenible de productos químicos, materiales y combustibles a partir de fuentes renovables (Tang y Zhao, 2009). Enfocándose en el desarrollo de bioprocesos de limpieza con una reducción en las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), así como el uso de energía y agua (Gupta y Raghava, 2007). Para lograr tal objetivo las reacciones biocatalíticas pueden reducir una serie de pasos eficientando el proceso, esto implica una baja de energía y menos entrada de material, por consecuencia se realizan productos de mayor calidad a un costo menor (Wohlgemuth, 2009).

1.3.2 Biotecnología farmacéutica

El papel de los microorganismos en la industria farmacéutica ha sido fundamental desde los años 80 con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, por otro lado, actinomicetos han suministrado más del 50% de todos los antibióticos actualmente en uso. La biotecnología farmacéutica está enfocada en el desarrollo de nuevos fármacos y en la mejora y sustitución de aquellos que han perdido eficacia. Así mismo, crea tratamientos más seguros y herramientas de diagnóstico más eficaces para abarcar un rango cada vez más amplio de enfermedades y con esto mejorar la calidad de vida (Capon, 2010).

1.3.3 Biotecnología agrícola

Uno de los principales desafíos para el siglo XXI es una producción de cultivos ambientalmente racionales y sostenibles, la biotecnología agrícola aplica microorganismos con este fin. Los microorganismos asociados a las plantas tienen un efecto importante en la salud vegetal y el crecimiento al mejorar la tolerancia al estrés, en la resistencia a las enfermedades, en la disponibilidad y captación de nutrientes y en promover la biodiversidad (Morrissey *et al.*, 2004).

Actualmente, los productos que contienen inoculantes para la promoción de biocontrol y crecimiento vegetal que aprovechan esta asociación beneficiosa están disponibles en el mercado. Además, existe el potencial para desarrollar otros productos basados en las interacciones benéficas planta-microbio, tales como agentes que reducen el estrés ambiental (Adesemoye y Kloepper, 2009). Sin embargo, nuestra comprensión de las interacciones entre plantas y microbios sigue siendo incompleta, y se necesita más investigación para evitar inconsistencias en el rendimiento de estos inoculantes (Morrissey *et al.*, 2004).

1.3.4 Biotecnología ambiental

El objetivo principal de la Biotecnología Ambiental es la sostenibilidad de los recursos clave, como el agua, el suelo y la energía, por mencionar algunos, a través de la gestión de las comunidades microbianas (Rittmann *et al.*, 2006). Para esto es necesario estudiar la ecología microbiana, que tiene como objetivo entender las comunidades de organismos y su interacción con el entorno (Rittmann, 2006). Las posibles aplicaciones futuras de la gestión de recursos microbianos son eliminar el dióxido de carbono (CO₂) o el metano (CH₄) de la atmósfera o mantener la integridad de la comunidad del suelo cuando se aplican productos químicos como los plaguicidas (Verstraete, 2007). Un profundo conocimiento de las comunidades microbianas es fundamental para su gestión y para alcanzar este objetivo (Rittmann *et al.*, 2006).

Tabla 1. Campos biotecnológicos y sus productos (Diosini et al., 2012)

Campo	Código de color	Productos clave
Biotecnología industrial	Blanco	Químicos finos, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, detergentes, biocatalizadores y agentes de bioconversión polímeros
Biotecnología farmacéutica	Rojo	Fármacos antitumorales, nutracéuticos, compuestos antibacterianos, inmunosupresores
Biotecnología agrícola	Verde	Bioplaguicidas, agentes antiparasitarios, agentes de procesamiento de alimentos, promotores de crecimiento de las plantas
Biotecnología ambiental	Gris	Biorremediación, producción de bioenergía

1.4 Bacterias marinas

Estos organismos pueden aislarse del agua, sedimentos, manglares asociados con los hábitats marinos, respiraderos hidrotermales de aguas profundas, etc. Esto debido a que tienen la capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas (Dash et al., 2013).

Las bacterias marinas, generalmente, requieren iones de sodio y potasio para su crecimiento y para mantener el equilibrio osmótico de su citoplasma (Macleod y Onofrey, 1957). Este requisito es una característica exclusiva de las bacterias marinas que se atribuye a la producción de indol de triptófano (Pratt y Happold, 1960), la oxidación de la l-arabinosa, manitol, y la lactosa (Rhodes y Payne, 1962) así como el transporte de sustratos en la célula (Häse, et al., 2001). Utilizan también, el ácido β -aminoglutarico o β -glutamato, el cual es raro en la naturaleza, pero está presente en grandes cantidades en sedimentos marinos y es utilizado como osmolitos, para mantener un volumen celular ante el estrés hídrico (Robertson et al., 1990). Otros caracteres físicos son: mayor tolerancia a la presión que sus

homólogos terrestres (Zobell y Morita, 1957), capacidad para sobrevivir en el agua de mar, en su mayoría Gram negativas (Buck, 1982) y formadores de esporas (Buerger *et al.*, 2012). Por otro lado, existen bacterias marinas termófilas, aisladas de respiraderos hidrotermales de aguas profundas capaces de la fijación de nitrógeno (Ruby y Jannasch, 1982).

La única causa detrás del diverso nivel genético en los microorganismos marinos se debe a la adquisición de un mecanismo alternativo para la obtención de carbono y energía. Existen organismos copiótrofos que tienen un alto potencial energético para detectar, someterse a la transducción e integrar estímulos extracelulares. Estas características son cruciales para su capacidad de afinar y responder rápidamente a las cambiantes condiciones ambientales como la afluencia repentina de nutrientes o el agotamiento de los mismos (Lauro *et al.*, 2009).

La mayoría de las bacterias marinas son bien conocidas por su asociación con la amplia variedad de funciones, como los antibióticos y la producción enzimática, la absorción de luz marina, la biorremediación de metales pesados, la biodegradación y biorremediación de hidrocarburos, biorremediación de suelos contaminados con diésel, entre otros, a través de la formación de biopelículas y la producción de sustancias poliméricas (Dash *et al.*, 2013).

1.5 Derrame petrolero

El 20 de abril del 2010 una explosión en la plataforma petrolera Deepwater Horizon ocasionó el derrame accidental más grande de la historia. Durante los tres meses que tardó en ser bloqueada, la fuga liberó cerca de cinco millones de barriles de crudo. La magnitud de los daños y efectos del derrame se desconocen con exactitud hasta el día de hoy.

La explotación petrolera en el Golfo continúa incrementándose y con ello los riesgos e incertidumbre. Por este motivo, un grupo de instituciones académicas se unió para formar el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), cuyo propósito es entender mejor los procesos biogeoquímicos del Golfo, los seres que lo habitan, cuáles son las afectaciones que surgen después de un derrame, e incluso, cómo detener o revertir el daño con ayuda de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Curiosamente, los microorganismos degradadores de petróleo se encuentran esparcidos por todos los océanos, sin embargo, usualmente están en bajas proporciones en el ambiente, pero cuando hay un derrame de crudo, se estimula su crecimiento (Godoy-Lozano *et al.*, 2018)

Se ha reportado que muchas bacterias marinas tienen un potencial de biorremediación (Dash, *et al.*, 2013).

1.6 Biorremediación

La tecnología de biorremediación utiliza el potencial metabólico de los organismos para limpiar los ambientes contaminados. Los microorganismos tienen la capacidad de mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en sustancias menos dañinas que pueden integrarse en ciclos biogeoquímicos naturales. La biorremediación es un intento de acelerar la degradación natural optimizando las condiciones limitantes que son no destructivas, de tratamiento y rentables, así como con una tecnología de limpieza logísticamente favorable (Margesin y Schinner, 2001).

Sin embargo, el único obstáculo en la biorremediación "*in situ*" son las condiciones desfavorables de los ambientes. La mayoría de los ambientes se caracterizan por altas o bajas temperaturas, pH alcalino o ácido, alta presión, o alta concentración de sal. Las bacterias marinas tienen una exposición a condiciones desfavorables de forma natural. Por lo tanto, cualquier bacteria marina que tenga el potencial de biorremediación puede convertirse en el candidato ideal para el tratamiento biológico de hábitats extremos contaminados (Dash *et al.*, 2013).

Posterior al derrame petrolero se han estudiado diferentes zonas a lo largo del Golfo de México y se encontraron algunas bacterias del género *Pseudomonas* que entre sus múltiples propiedades tiene la capacidad de degradar e integrar los hidrocarburos en su metabolismo de forma natural.

1.7 Generalidades de *P. aeruginosa*

Descrita por primera vez en 1872 por Schroeter como *Bacterium aeruginosa*. Actualmente pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y se trata de un bacilo recto

o ligeramente curvado (Figura 2) Gram negativo, con un tamaño de 2–4 x 0.5-1 micras, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. Es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa y oxidasa positivo (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016).

Las colonias en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* presentan un color característico azul verdoso debido a la producción de pigmentos fluorescentes como la pioverdina (amarillo verdoso) o la piocianina (azul) y con menor frecuencia producen piorrubina (rojo) o piomelanina (marrón negruzco). La mayoría de las cepas también presentan un olor característico similar a la uva o a una fruta madura. En relación con la morfología de las colonias puede ser variada y generalmente pigmentada, se encuentran desde las típicas colonias que se extienden en la placa con un brillo metálico y con un aspecto gelatinoso, viscoso en zonas de mayor crecimiento, hasta las variantes de colonias con un morfotipo enano, coliforme y mucoide (Milagro, 2012).

Al igual que otros miembros del género *Pseudomonas*, es conocido por su versatilidad metabólica y su capacidad para colonizar una amplia gama de nichos ecológicos, como la rizosfera, los hospedadores animales, incluidos los humanos, donde puede causar infecciones graves y los ambientes acuáticos (Chevalier, *et al.*, 2017).



Figura 2. Morfología de *Pseudomonas aeruginosa*.

Por esta razón, es importante resaltar que la microbiota en este ecosistema es extremófila ya que vive en altas concentraciones salinas y bajo condiciones cambiantes constantemente por las corrientes marinas (Dash, *et al.*, 2013).

1.8 Estrés abiótico en los microorganismos

Es importante conocer los mecanismos de respuesta y su adaptación de los microorganismos ante el estrés abiótico al que se enfrentan en su entorno (Figura 3). Mediante investigaciones bioquímicas y moleculares se conoce acerca de la plasticidad de las vías metabólicas y los límites de su funcionamiento. Se ha revelado que en procesos inducidos por el estrés los microorganismos conducen a la acumulación de metabolitos (Csonka, 1989). Una amplia variedad de especies expresan genes y proteínas similares cuando están estresados (Skriver y Mundy, 1990), ya que el organismo adapta su metabolismo y altera su desarrollo.

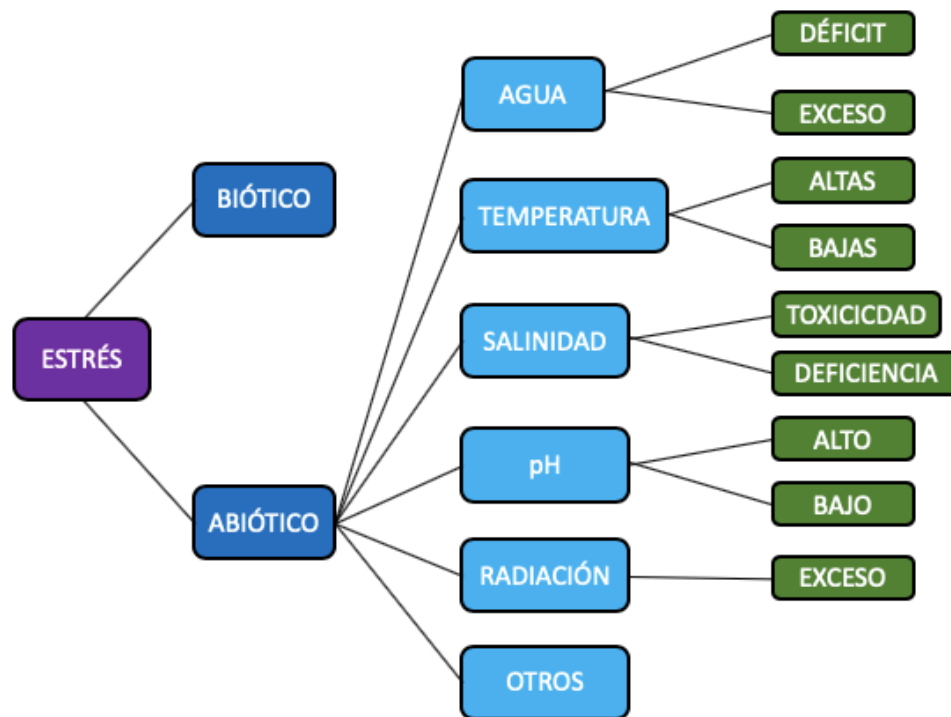


Figura 3. Versatilidad del estrés abiótico.

Cuando una célula se encuentra bajo alguna condición de estrés, (Figura 4) se inducen acciones para proteger los procesos celulares y sus estructuras (Bohnert

et al., 1995). Tales como la síntesis de polioles, se facilita la permeabilidad del agua, se regula la captación y la repartición de iones, se induce la biosíntesis de solutos compatibles y se facilita el flujo de agua, entre otros (Bray, 1997).



Figura 4. Respuestas de los organismos ante el estrés.

En el caso de algunas plantas, el azúcar 2-octulosa se acumula en las hojas hidratadas, pero se convierte rápidamente en sacarosa cuando comienza un período de desecación. De hecho, la acumulación de sacarosa y otros hidratos de carbono resulta ser una característica común de las semillas tolerantes a la desecación de muchas especies de plantas. Por otro lado, también se aumentan los compuestos osmoprotectores, como la prolina, los polioles o los fructanos (Dandekar y Uratsu, 1988). Se demostró que algunos de estos metabolitos confieren tolerancia al estrés a bacterias (Nomura *et al.*, 1995).

1.9 Proteínas Abundantes en la Embriogénesis Tardía

Las proteínas Abundantes en la Embriogénesis Tardía o LEA (Late Embryogenesis Abundant) ayudan a los microorganismos a tolerar el estrés abiótico. Estas proteínas se encontraron hace 30 años, específicamente en semillas de algodón y

se determinó que le conferían tolerancia a la desecación, ahora se sabe que también se encuentran en bacterias y algunos invertebrados (Tunnacliffe y Wise, 2007). La adición de proteínas LEA a enzimas como las lactato deshidrogenasa (LDH) que han sido sometidas a ciclos de congelamiento y descongelamiento ayudan a proteger la actividad de estas. Este tratamiento ocasiona la desnaturalización y agregación de las proteínas, resultando en la pérdida de la actividad, sin embargo, cuando la proteína LEA está presente, la actividad se mantiene sin cambios (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2017).

1.9.1 Clasificación de proteínas LEA

Se han definido al menos siete grupos diferentes de proteínas LEA (Tabla 2), con base en el patrón de expresión y la secuencia de aminoácidos que las conforman (Battaglia *et al.*, 2008).

Grupo 1. Este grupo de proteínas LEA se estudió en semillas de algodón, contiene una secuencia consenso de 20 residuos de aminoácidos, contienen una proporción grande de residuos cargados, que contribuyen a su alta hidrofiliidad, y un alto contenido de residuos de glicina (aproximadamente 18%). Esta última característica permite predecir que no están estructuradas en solución acuosa. Mediante análisis estructurales de dicroísmo circular y resonancia magnética se determinó que este grupo de proteínas presenta una estructura inestable y altamente flexible (Battaglia *et al.*, 2008).

El grupo 1 de proteínas LEA es único, ya que se encuentra presente en todos los dominios taxonómicos: Archaea, Bacteria y Eukarya (Battaglia *et al.*, 2008).

En cuanto a su posible papel en la adaptación de diferentes organismos a la escasez de agua se sabe que las proteínas LEA del grupo 1 se acumulan en condiciones de estrés, tales como alta osmolaridad, altas temperaturas, y condiciones hiperoxidantes (Stacy y Aalen, 1998). Otras evidencias provienen de la presencia de estas proteínas en organismos con hábitats extremos, como las arqueas, también se han encontrado en algunos crustáceos de agua salada como algunas especies de *Artemia*, cuya fase de enquistamiento le permite sobrevivir en

un estado de desecación y permanecer metabólicamente inactivo durante 10 o más años, conservando la capacidad de soportar condiciones ambientales severas (Wang *et al.*, 2007).

La evidencia directa que muestra el funcionamiento de las proteínas LEA del grupo 1 es escasa, sin embargo, se han realizado experimentos “*in vitro*” se ha visto que la purificación y expresión en *E. coli* de proteínas LEA de trigo tienen la capacidad de proteger a enzimas como la citrato sintasa (CS) o LDH al ser sometidas a ciclos de desecación o congelamiento (Gilles *et al.*, 2007).

Grupo 2. Este grupo de proteínas LEA, también conocidas como “dehidrinas”, se identificó originalmente en el desarrollo de embriones de algodón y son el grupo más ampliamente caracterizado. Son altamente hidrofílicas, contienen una alta proporción de aminoácidos cargados y polares y una baja fracción de residuos no polares e hidrófobos, además carecen de residuos de triptófano y tirosina (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Una característica distintiva de las proteínas de este grupo es su secuencia consenso de 15 residuos, rico en lisina llamado el segmento K (Close *et al.*, 1989).

Al igual que las proteínas LEA del grupo 1, varios estudios de proteínas de LEA específicas del grupo 2 han confirmado que se acumulan durante la desecación de las semillas y en respuesta al déficit de agua inducida por la sequía, la baja temperatura o la salinidad. Se ha hecho un esfuerzo para determinar la localización subcelular de algunas de estas proteínas. La mayoría de las proteínas LEA del grupo 2 se acumulan en el citoplasma, y algunas de ellas también se localizan en el núcleo, aunque algunas dehidrinas también se encuentran en otros compartimentos celulares, incluyendo las proximidades de la membrana plasmática, las mitocondrias, la vacuola y el retículo endoplásmico e incluso se ha demostrado una actividad de unión a iones (Battaglia *et al.*, 2008).

Grupo 3. Las proteínas LEA de este grupo se caracterizan por tener una secuencia consenso de 11 aminoácidos. En comparación con otros grupos de proteínas LEA, los miembros del grupo 3 son muy diversos. Esta diversidad es una consecuencia

de los cambios introducidos en la repetición de la secuencia de aminoácidos (Dure, 1993). El análisis de varias proteínas LEA del grupo 3 por dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja indicaron que en su mayoría carecen de estructura secundaria en estado hidratado. Sin embargo, en presencia de glicerol, etilenglicol, o metanol, o después de secado rápido, adoptan una conformación α -helicoidal. El hecho de que la rehidratación conduzca a la forma no estructurada de la proteína indica que estas transiciones estructurales son totalmente reversibles (Tolleter *et al.*, 2007).

Curiosamente, se han encontrado proteínas LEA que se acumulan en varios organismos no vegetales en respuesta a la deshidratación. Ejemplos de estos son proteínas en *Deinococcus radiodurans* y *Haemophilus influenzae*, así como una proteína de *Caenorhabditis elegans*, cuya expresión está correlacionada con la supervivencia de este nemátodo en condiciones de desecación, osmótica y calor (Gal *et al.*, 2004).

Además de apoyar un papel como moléculas protectoras bajo limitación de agua, las proteínas LEA pueden funcionar para proporcionar un ambiente adecuado a sus enzimas diana, evitando su inactivación para mantenerlas íntegras mientras el agua sea restrictiva (Battaglia *et al.*, 2008).

Grupo 4. Este grupo fue caracterizado por su secuencia consenso de 26 aminoácidos ubicados en la región N-terminal (Battaglia *et al.*, 2008).

En un análisis computacional de las proteínas LEA del grupo 4 se predijo que los primeros 70 a 80 residuos de aminoácidos adoptan una estructura α -hélice, mientras que el resto de la proteína no tenía estructura definida (Kyte y Doolittle, 1982). Para corroborar esto se realizó un análisis espectroscópico de una proteína LEA de soja para confirmar dicha predicción (Shih *et al.*, 2004).

Durante experimentos controlados en *Arabidopsis* se demostró que las proteínas LEA de este grupo contribuyeron a mantener la actividad de la LDH, incluso después de un 99% de pérdida de agua (Reyes *et al.*, 2005), sugiriendo un papel protector durante la deshidratación. Del mismo modo, la inactivación de un gen de este grupo

en maní (*Arachis hypogaea*) pareció resultar en una menor tolerancia a la sequía (Senthil-Kumar y Udayakumar, 2006).

Grupo 5. También llamado grupo de proteínas LEA atípico debido a su carácter hidrofóbico y se sugiere una estructura globular. Aunque se sabe poco acerca de este conjunto de proteínas, los datos disponibles indican que se acumulan durante la etapa tardía del desarrollo de las semillas en respuesta a las condiciones de estrés, como la sequía, la luz UV, la salinidad y el frío (Maitra y Cushman, 1994; Park *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

Grupo 6. Este grupo fue encontrado por primera vez en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y se caracteriza por el tamaño pequeño de sus proteínas (7-14 kD). En general, estas proteínas son altamente hidrófilas, carecen de residuos de cisteína y triptófano. Análisis computacionales han predicho que las proteínas del grupo 6 LEA están intrínsecamente desordenadas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Si bien no hay mucha información directa sobre la función de las proteínas en este grupo, los resultados obtenidos de los ensayos de deshidratación “*in vitro*” indicaron que las proteínas LEA, a diferencia de las de otros grupos (2, 3 y 4), no pudieron ayudar a mantener la actividad de las enzimas durante la deshidratación (Reyes *et al.*, 2005). Este resultado sugiere que los objetivos moleculares de estas proteínas son diferentes de los de otras proteínas LEA, e indica que su hidrofiliidad no es la única característica relevante para su función protectora en ambientes que limitan el agua (Battaglia *et al.*, 2008).

Grupo 7. También llamadas proteínas ASR consideradas dentro de las hidrófilas pequeñas, estables al calor e intrínsecamente desordenadas, al igual que otras proteínas LEA se acumulan en las semillas durante la embriogénesis tardía y responden a la limitación del agua (Maskin *et al.*, 2008).

También responden a las condiciones de estrés ambiental, como el déficit de agua, la sal, el frío y la luz limitada (Silhavy *et al.*, 1995; Padmanabhan *et al.*, 1997; Doczi *et al.*, 2005).

Tabla 2. Grupos de proteínas LEA (Battaglia *et al.*, 2008).

Grupo	Secuencia consenso
LEA 1	TVVPGGTGGKSLEAQEHLAE
LEA 2	EKKGIMDKIKEKLPG
LEA 3	GGVLQQTGEQV
LEA 3	TAEKAGEYKDY
LEA 4	AQEKA EKA TARDPXEKEMAHE KKEAK
LEA 5	-----
LEA 6	LEDYKMQGYGTQGHQQPKPGRG
LEA 7	AAGAYALHEKHKAKKDP EHAHRHKI

1.9.2 Funciones

Las proteínas LEA se encuentran dentro de las Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (PIDs) ya que en el estado hidratado se encuentran sin estructura, pero se pliegan principalmente en estructuras α - helicoidales en el estado de deshidratación (Hincha y Thalhammer, 2012). Dicho esto, cuando se encuentran estructuradas y con actividad, se les atribuyen funciones como antioxidantes y como estabilizadores de membrana y proteínas durante el estrés hídrico, ya sea por interacción directa o actuando como escudos moleculares. Protegen estructuras celulares de los efectos de la pérdida de agua actuando como un amortiguador de hidratación, por secuestro de iones, por protección directa de otras proteínas o membranas, o por para renaturalizar proteínas no plegadas (Wise y Tunnacliffe, 2004). Junto con otras proteínas hidrofílicas y solutos compatibles, las proteínas LEA también previenen el colapso celular cuando la cantidad de agua disponible es limitada. Esta capacidad multifuncional de las proteínas LEA es debido en parte a su plasticidad estructural.

2. ANTECEDENTES

Existen varios reportes en donde se han sobreexpresado proteínas LEA provenientes de unas plantas en otras especies de plantas y en *E. coli* y en todos los casos se ha observado protección a diferentes tipos de estrés y protección sobre algunas enzimas de manera "in vitro".

El gen que codifica para la proteína OsLea14-A proveniente de arroz (*Oryza sativa*), se amplificó, clonó y transformó en células de *E. coli*; se realizaron pruebas de tolerancia a estrés en altas concentraciones salinas (100 - 600mM de NaCl) y sequía simulada bajo la adición de sorbitol (600 -1600 mM), altas temperaturas (50°C) y freeze thaw (-80 °C). En sus resultados obtuvieron que la tasa de supervivencia de las células que expresaban la proteína LEA (BL/OsLea14-A) era mayor comparada con las que no la portaban (BL/pET32a), y la diferencia aumentaba a medida que aumentaba la concentración de NaCl o sorbitol (Figura 5b/c). Al someter a las células a altas temperaturas se demostró mayor viabilidad para BL/OsLea14-A que para las células BL/pET32a (Figura 5d). De igual manera en los ciclos de congelamiento y descongelamiento se comprobó que las células que cuentan con la proteína LEA presentan una mejor tolerancia a este estrés (Figura 5e). También determinaron que la proteína OsLea14-A protege la actividad de la LDH y confiere mayor tolerancia a las diferentes condiciones de estrés a las que fue sometida.

De acuerdo con los datos obtenidos, se concluyó que OsLea14A tiene efectos protectores en células de *E. coli* y en LDH al someterse a condiciones de estrés como alta salinidad, sequía, alta temperatura y freeze thaw(Hu et al. 2019).

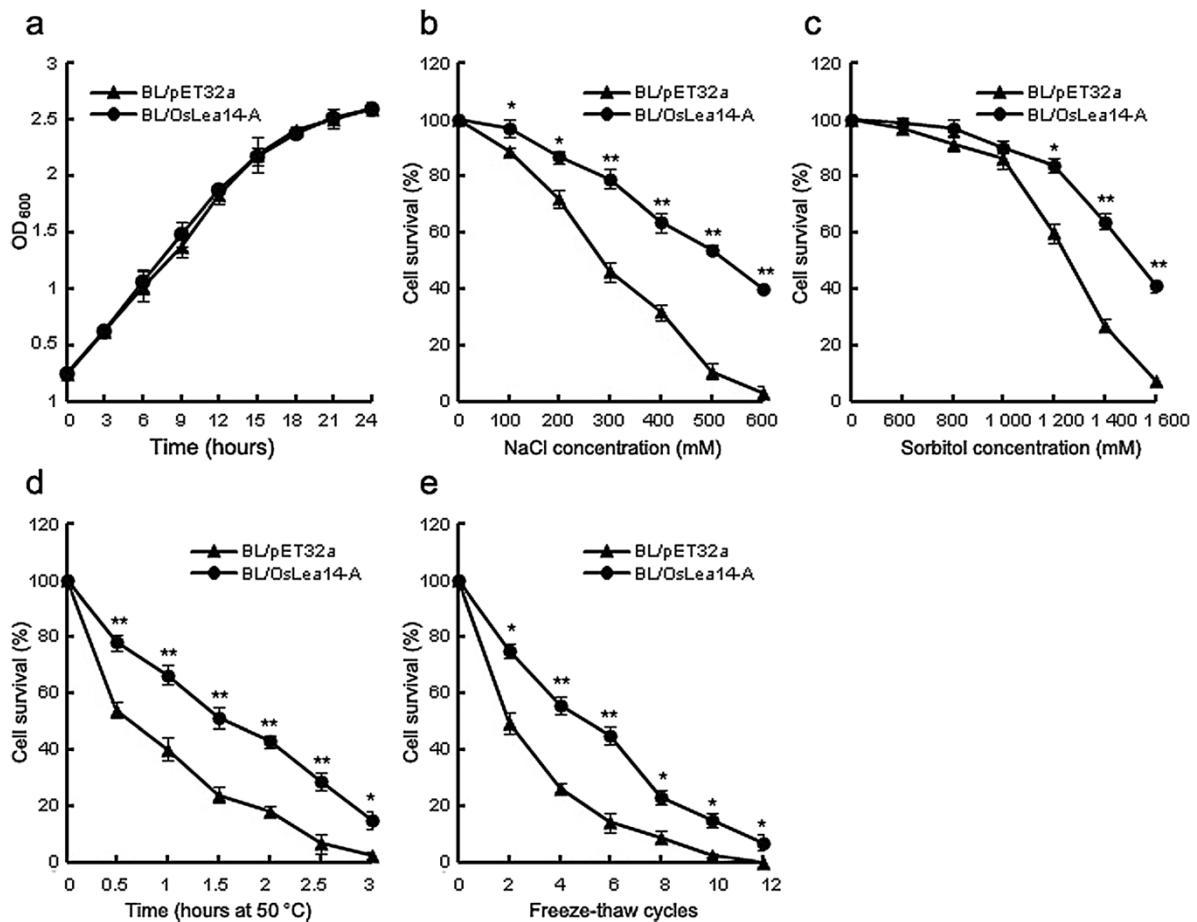


Figura 5. Viabilidad de células transformadas en *E. coli* con OsLea14-A bajo diferentes condiciones de estrés (Hu et al. 2019).

Por otro lado, mutaciones en genes que codifican para proteínas LEA provoca los efectos contrarios, es decir, cepas de *A. fischeri* más sensibles al secado seguido de un choque térmico (60, 70 y 80 ° C), (Figura 6). Tomados en conjunto, estos datos muestran que las proteínas LEA promueven la supervivencia durante la exposición a la sequía y calor (van Leeuwen, et al. 2016).

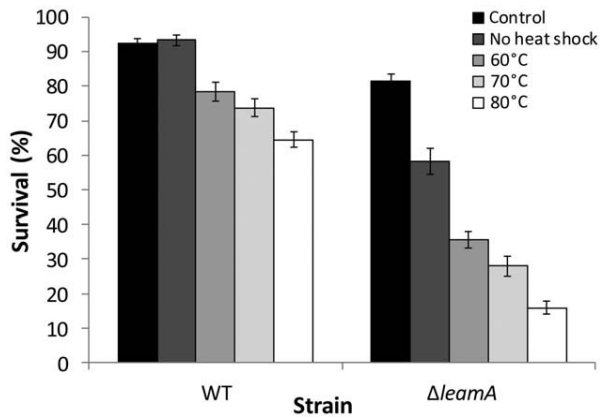


Figura 6. Choque térmico en células silvestres (WT) y mutación de *Leam* ($\Delta leamA$) en *A. fischeri* (van Leeuwen et al. 2016).

En el laboratorio se tienen muestras bacterianas provenientes del golfo de México obtenidas de los diferentes sitios de muestreo que realiza el buque oceanográfico del CIGOM. Se llevó a cabo un análisis bioinformático detallado con el fin de determinar si entre las muestras obtenidas había alguna cepa que tuviera en su genoma secuencias con homología a proteínas LEA, este análisis se llevó a cabo utilizando las secuencias obtenidas por "shotgun" de los metagenomas y los genomas disponibles de las cepas previamente secuenciadas. La búsqueda incluyó: siete secuencias tipo "shotgun" de agua y sedimento de dos campañas oceanográficas denominadas MMF1 y MET1, ocho genomas de cepas aisladas secuenciadas, y dos secuencias shotguns adicionales de consorcios bacterianos enriquecidos con crudo de la estación B09 del crucero oceanográfico MMF1. En total se hizo la búsqueda sobre nueve metagenomas y ocho genomas.

Para el análisis bioinformático, se seleccionaron secuencias de proteínas LEA de organismos eucariontes como *Artemia franciscana*, *Arabidopsis thaliana*, y procariontes como *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens*.

Únicamente se encontraron dos secuencias con homología a proteínas LEA del grupo 1 en los genomas de dos cepas de *Pseudomonas*, específicamente una cepa de *P. aeruginosa*, proveniente de un consorcio bacteriano de la estación B9 y una cepa de *P. stutzeri* de la estación D18. Ambas cepas fueron aisladas por su capacidad para crecer en un medio suplementado con crudo y queroseno.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe una alta diversidad de microorganismos presentes en los ambientes marinos y el Golfo de México no es la excepción, por lo cual, es de suma importancia profundizar en su conocimiento, ya que debido a las condiciones extremas los microorganismos que lo residen necesitan estar adaptados a este medio, por consecuencia cuentan con enzimas que les permiten tolerar esas condiciones. Por esta razón, es de gran interés profundizar en el estudio de proteínas LEA, que como ya se explicó anteriormente, confieren tolerancia a diversas condiciones de estrés. Actualmente se conocen y se han descrito y estudiado a detalle una gran variedad de proteínas LEA, casi todas provenientes de plantas, sin embargo, existen muy pocos reportes de estas proteínas en bacterias y ninguno de ellos en bacterias marinas.

4. HIPÓTESIS

La proteína LEA del organismo marino *P. aeruginosa* aislado del golfo de México (goM), tienen un efecto protector en células de *E. coli* bajo diferentes condiciones de estrés.

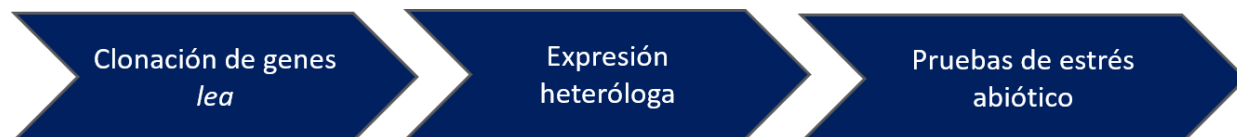
5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar una proteína LEA bacteriana proveniente de una muestra del goM.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Expresar heterológamente el gen que codifica para la proteína LEA de *P. aeruginosa* en *E. coli*.
2. Determinar el efecto protector de la proteína LEA en células de *E. coli* bajo diferentes condiciones de estrés.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Búsqueda de secuencias	Transformación	<i>E.coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> • Diseño de oligos • pET-22b 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> BL21 • Análisis de restricción 	<ul style="list-style-type: none"> • Salinidad • Freeze-thaw • Radiación UV

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen LEA

Una vez obtenida la secuencia del genoma de *P.aeruginosa* se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR del gen de interés. El diseño de los oligonucleótidos (Tabla 3) para la clonación en el vector de expresión pET22b incluyó el codón de inicio, pero no el codón de paro de cada gen, además se adicionaron las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* en el extremo 3' y 5', respectivamente. Finalmente adicionamos 3 pares de bases extra al extremo para el correcto corte de las enzimas.

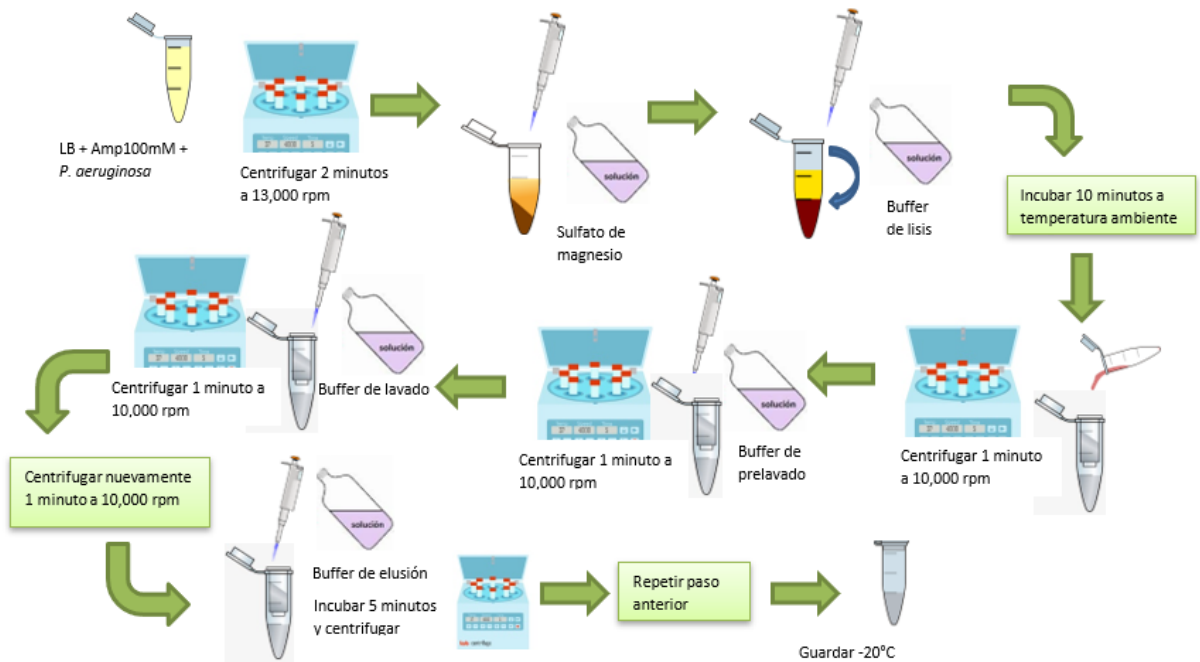
Tabla 3. Diseño de oligos palea.

Nombre	Secuencia	Corte	Longitud	Tm
F1EcoPaLEA	ATGATTTTTTCGTCCCAGGG	G AATTC	20	58
R1XhoPaLEA	TCAGGACGAGCGTCCGC	C TCGAG	17	58

8.2 Protocolo de extracción de ADN cromosomal por KIT

Para obtener el gen codificante de la proteína LEA se parte de la extracción de ADN por KIT de *P. aeruginosa*, para posteriormente amplificarlo con ayuda de los oligonucleótidos previamente diseñados, para esto se siguió el protocolo de la extracción de la siguiente manera:

1. Partir de un pre-cultivo overnight de 5 mL de LB inoculados con la cepa de *P. aeruginosa*
2. Centrifugar dos minutos a 13,000 rpm y eliminar sobrenadante
3. Agregar 200 µl de sulfato de magnesio (MgSO₄) y resuspender
4. Agregar 800 µl de buffer de lisis y mezclar por inversión
5. Incubar diez minutos a temperatura ambiente
6. Pasar la mezcla a columna del KIT
7. Centrifugar un minuto a 10,000 rpm y eliminar sobrenadante
8. Agregar 200 µl de buffer de prelavado, centrifugar un minuto a 10,000 rpm y eliminar sobrenadante
9. Agregar 500 µl de buffer de lavado, centrifugar un minuto a 10.000 rpm y eliminar sobrenadante
10. Centrifugar nuevamente un minuto a 10,000 rpm y eliminar sobrenadante
11. Pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL
12. Agregar 30 µl de buffer de elusión, incubar cinco minutos a temperatura ambiente y centrifugar un minuto a 10,000 rpm
13. Repetir paso anterior
14. Guardar a -20°C



8.3 Amplificación de gen LEA por PCR

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la amplificación de la secuencia se llevó a cabo un PCR en gradiente, esto se realizó variando las concentraciones de $MgCl_2$, y temperaturas para encontrar la T_m adecuada.

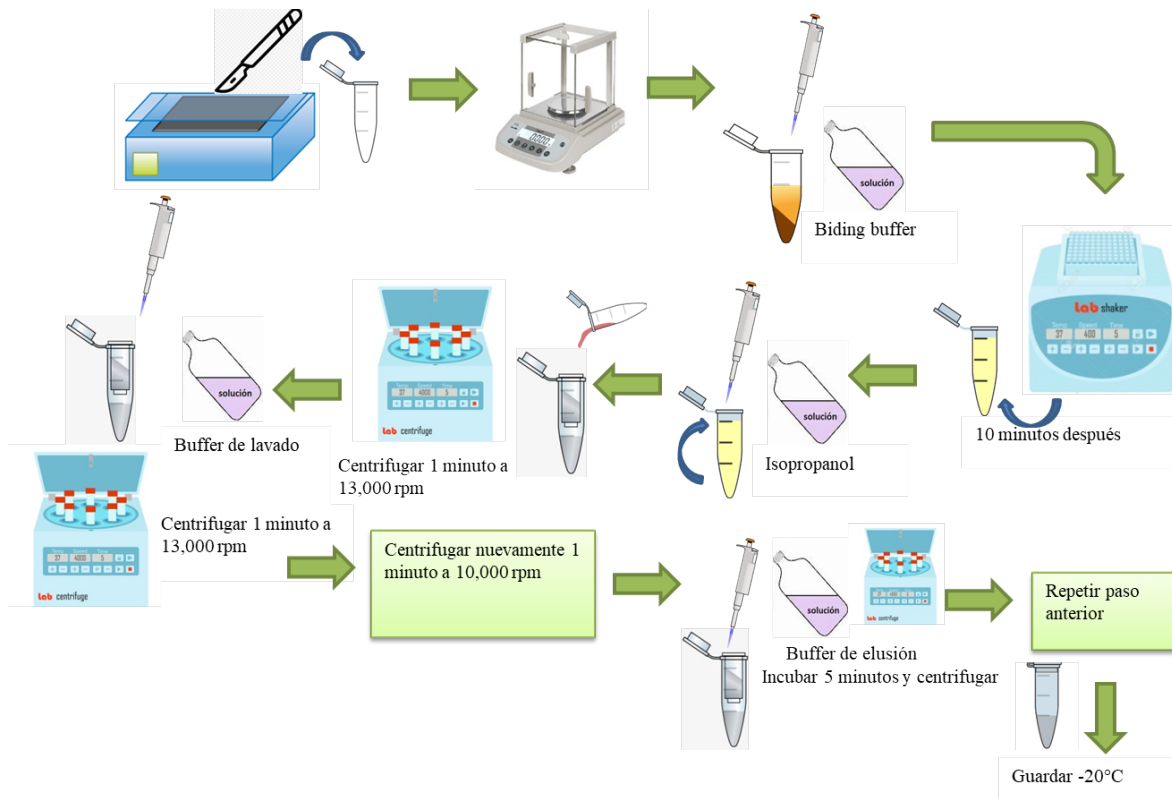
Una vez obtenidas las condiciones óptimas de amplificación, se realizó un PCR para la amplificación y posterior purificación de la banda de interés.

8.4 Protocolo de extracción de bandas de gel por KIT

Una vez realizado el PCR en las condiciones de amplificación adecuadas, se corrió un gel de agarosa y se siguió el protocolo de la purificación de la siguiente manera:

1. Cortar la banda de interés en el gel con un bisturí
2. Depositar el gel en tubo eppendorf de 1.5 mL
3. Pesar el tubo
4. Añadir binding buffer en proporción 1:1
5. Incubar a 55°C por 10 minutos con agitación.
6. Agregar isopropanol en proporción 1:1 y mezclar por inversión

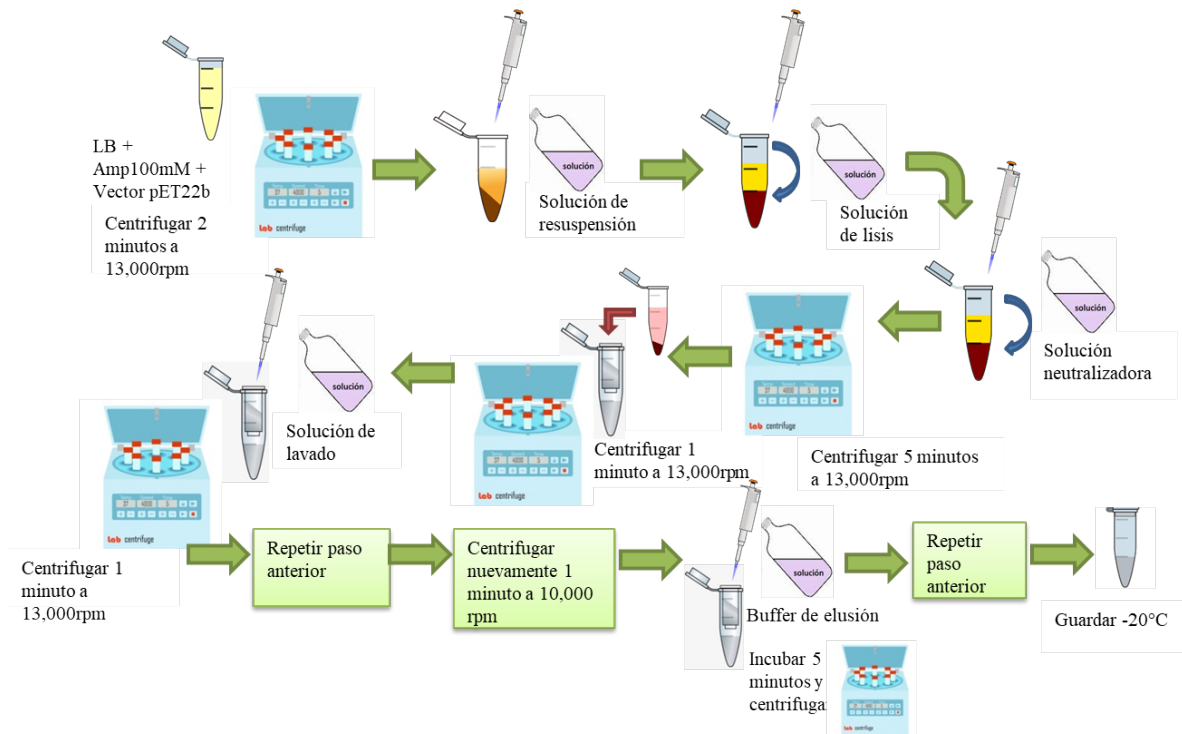
7. Transferir 800µl a una columna del KIT y centrifugar un minuto a 13,000 rpm y eliminar el sobrenadante
8. Añadir 700 µl del buffer de lavado, centrifugar un minuto a 13,000 rpm y eliminar sobrenadante
9. Centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante
10. Pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5mL
11. Agregar 30µl de buffer de elusión, incubar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar
12. Repetir el paso anterior
13. Guardar a -20°C



8.5 Extracción de ADN plasmídico por KIT

Con el fin de poder clonar el gen purificado de la proteína LEA en el vector pET-22b, es necesario realizar la extracción de ADN mediante el siguiente protocolo:

1. Partir de un precultivo overnight de 5 mL de LB inoculado con la cepa del pET-22b más ampicilina
2. Centrifugar dos minutos a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) y eliminar sobrenadante
3. Resuspender el pellet en 250µl de la solución de resuspensión
4. Añadir 250 µl de la solución de lisis y mezclar por inversión
5. Añadir 350 µl de solución neutralizadora y mezclar por inversión
6. Centrifugar cinco minutos a 13,000 rpm
7. Pasar la solución en una columna del KIT, centrifugar un minuto a 13,000 rpm y eliminar sobrenadante
8. Agregar 500 µl de solución de lavado y centrifugar un minuto a 13,000 rpm y eliminar sobrenadante
9. Repetir el paso anterior
10. Centrifugar nuevamente a 13,000 rpm y eliminar sobrenadante
11. Pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL
12. Agregar 30 µl de buffer de elusión, incubar cinco minutos a temperatura ambiente y centrifugar un minuto a 13,000 rpm
13. Repetir el paso anterior
14. Guardar a -20°C



8.6 Ensayo de restricción enzimática y ligación de fragmentos digeridos

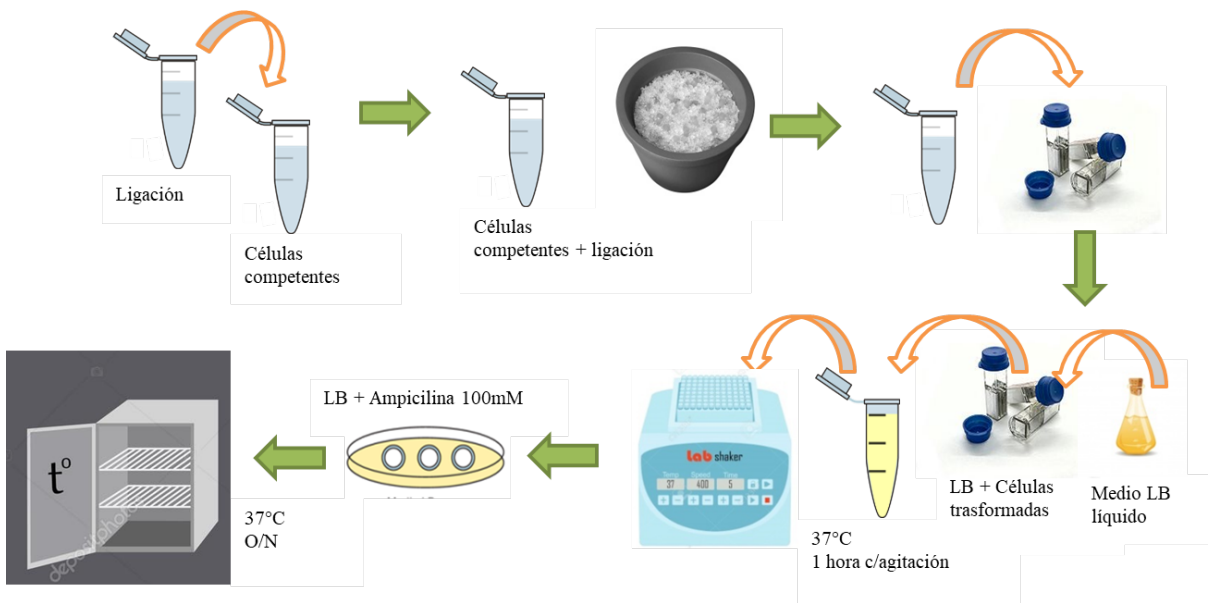
Para la clonación del fragmento de interés en el vector de expresión pET-22b, se realizó una doble digestión con las enzimas *XhoI* y *EcoRI*, se incubó durante 2 horas a 37°C, pasado este tiempo, se inactiva la reacción por 10 minutos a 65°C, para posteriormente ligar el fragmento.

De acuerdo con la cuantificación de ADN del vector y el inserto, se realizó una ligación en proporciones 1:3 y 1:5 respectivamente, en un volumen final de 20µl. Se deja incubando durante una noche a una temperatura de 18-22°C.

8.7 Transformación de células competentes

Para la obtención de clones que contengan el vector con el gen de interés se transformaron células electro-competentes de *E. coli* BL21 de la siguiente manera:

1. A las células electrocompetentes se le agrega 1/10 de la ligación y se dejan incubar cinco minutos en hielo, posteriormente se transfiere el contenido a celdas de electroporación y se les da un electrochoque (Ec2)
2. Agregar 1 mL de LB líquido para recuperar las células transformadas, resuspender y pasar a tubos eppendorf de 1.5 mL
3. Incubar a 37°C con agitación durante una hora
4. Pasado este tiempo, se siembran las células con perlas estériles en cajas Petri con LB y ampicilina 100mM
5. Incubar las cajas Petri a 37°C durante una noche para que crezcan las células y obtener colonias



8.8 PCR en colonia

Una vez obtenidas las colonias en las cajas Petri, se realizó un PCR para confirmar la presencia del plásmido.

Se picaron 3-4 colonias por muestra y se colocaron en 50 µl de agua, fungiendo esto como ADN para el PCR

Para confirmar cuál de las clonas contenía el fragmento de interés, se pusieron pre-cultivos en 5mL de LB con ampicilina durante una noche a 37°C a 200 rpm para su

posterior extracción de ADN y confirmar los resultados con una doble digestión con las enzimas *XhoI* y *EcoRI*.

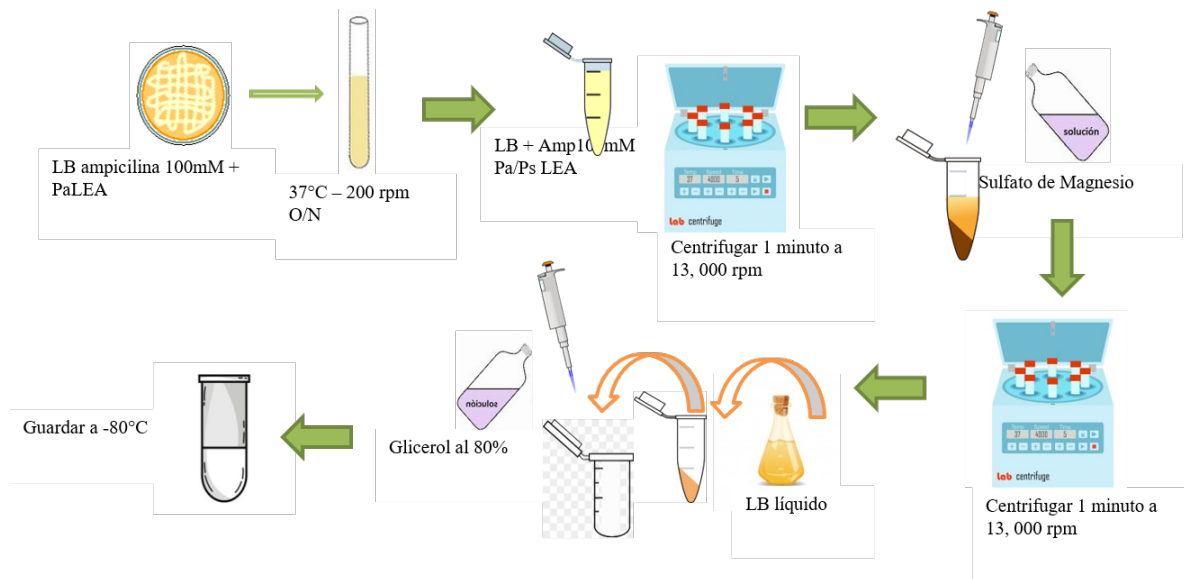
Las cepas transformadas con los plásmidos que contienen los genes de interés que fueron confirmadas por digestión y PCR se renombraron de la siguiente forma:

Nombre de la cepa	Descripción
PaLEA	<i>E. coli</i> BL21 + pET-22b + <i>lea</i> de <i>P. aeruginosa</i>
AvLEA	<i>E. coli</i> BL21 + pET-22b + <i>lea</i> de <i>Azotobacter vinelandii</i>
pET-22b	<i>E. coli</i> BL21 + pET-22b

8.9 Gliceroles

Una vez obtenidas las clonas, se guardan en glicerol bajo esterilidad para su correcto resguardo y almacenamiento.

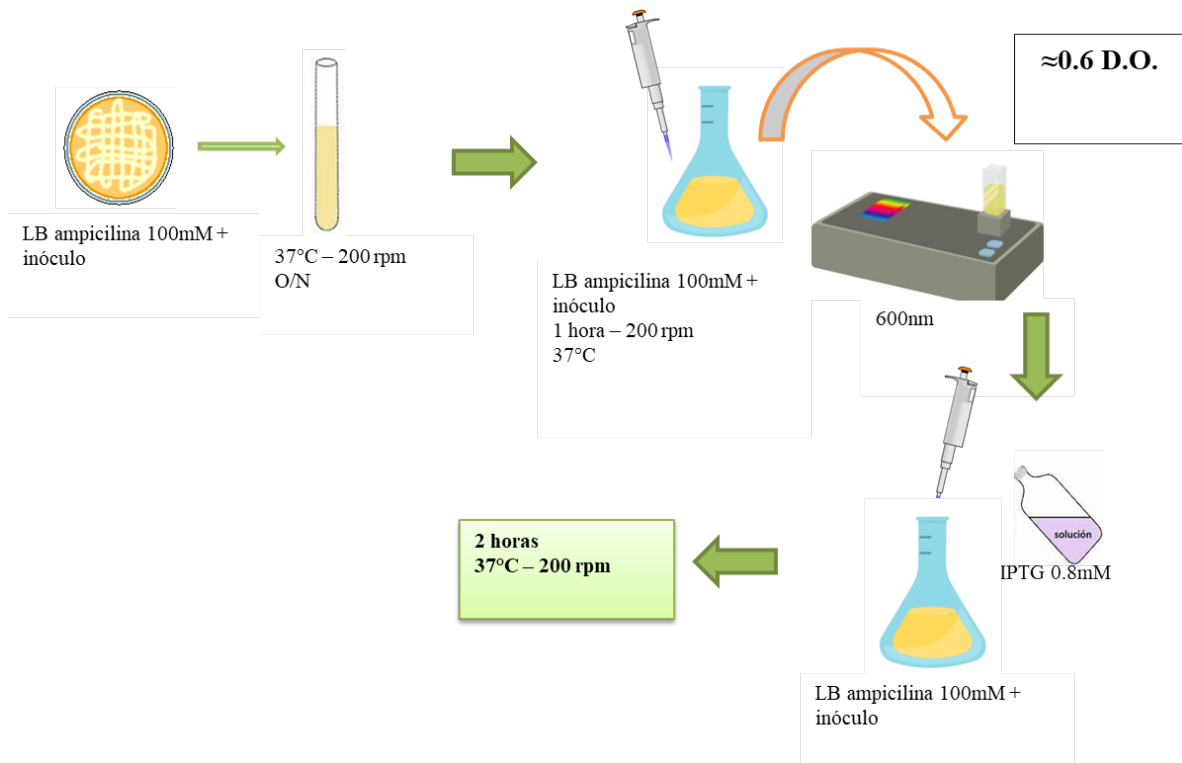
1. En un tubo de ensaye se ponen los precultivos de PaLEA y AvLEA inoculando 5mL de LB con 5µl de ampicilina por cada una y se dejan incubar una noche a 37°C y 200 rpm
2. Posteriormente, se pasan a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugan los 5 mL de precultivo de cada muestra por separado, durante un minuto a 13,000 rpm
3. Obtenidos los pellets, se resuspenden con 1 mL de sulfato de magnesio (MgSO₄) para lavarlos
4. Centrifugar un minuto a 13,000 rpm y desechar sobrenadante
5. Resuspender pellet en 1mL de LB y pasar a tubos estériles para glicerol
6. Añadir 1mL de glicerol al 80% y guardar a -80°C



8.10 Inducción de las proteínas LEA

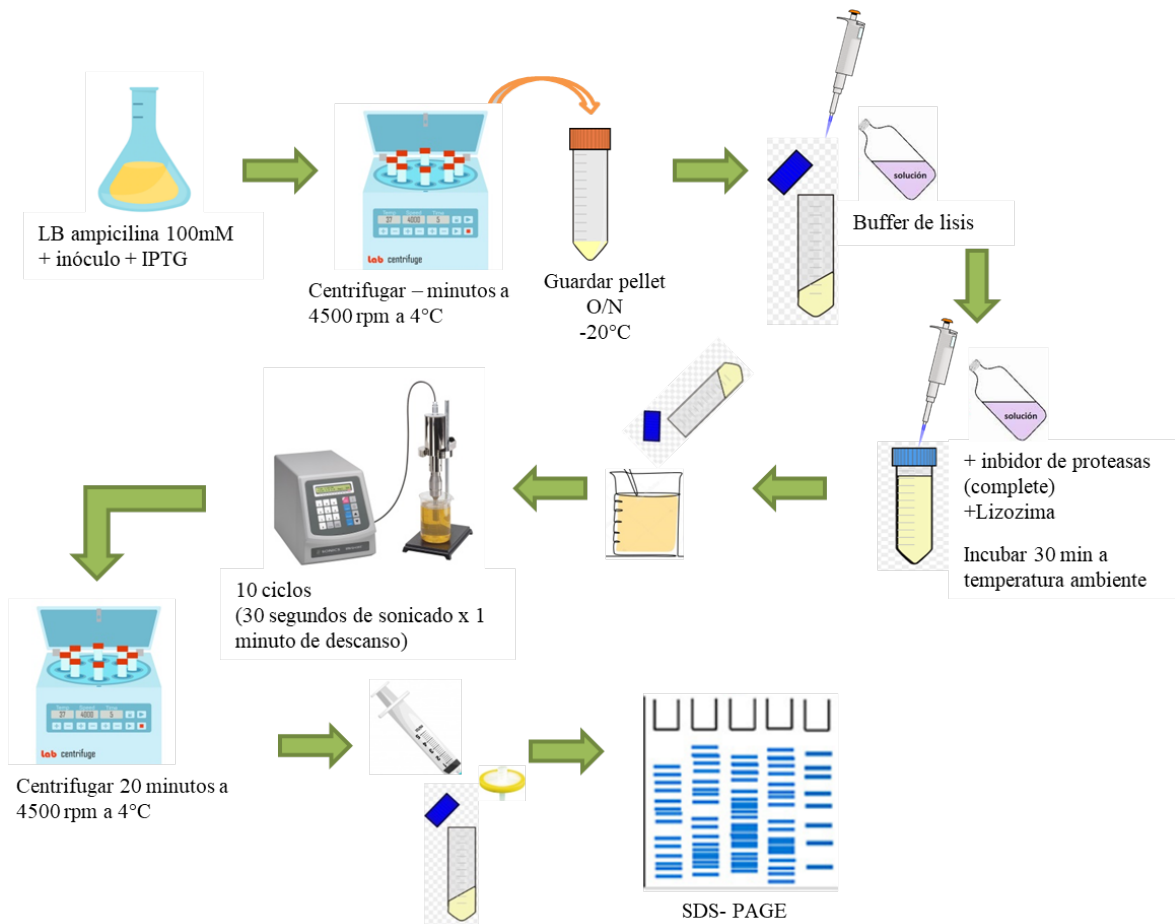
Para la correcta expresión de las proteínas LEA, se parte de los pre-cultivos de las cepas PaLEA y AvLEA en un tubo de ensaye en 5mL de LB con ampicilina 100mM a 37°C y 200 rpm, incubándolos durante una noche. Posteriormente, se inoculan 20mL de LB con 20µl de ampicilina 100mM, ajustando la densidad óptica (OD600) a 0.1.

Se realiza el monitoreo de los cultivos hasta una densidad óptica de ≈ 0.6 . Se añade IPTG 0.8 mM para inducir la producción de las proteínas y se incuba durante 2 horas.



8.11 Lisis celular

La inducción de la proteína se verifica mediante un gel de poliacridamida al 12%. Para esto, se lisan 5 mL de los cultivos inducidos adicionando lisozima y se sonicán tres veces durante 10 segundos a una potencia de 5 watts con intervalos de 1 min de descanso entre ellos. Posteriormente se centrifuga el lisado 15 min a 4°C y de este se toman alícuotas. Se adiciona buffer de carga y se incuba a 98°C durante quince minutos. Se cargan las muestras en el gel y se dejan correr durante aproximadamente dos horas y media. Transcurrido el tiempo, se tiñe el gel con azul de Coomasie durante 30 minutos y finalmente se deja durante toda la noche con solución para desteñir.

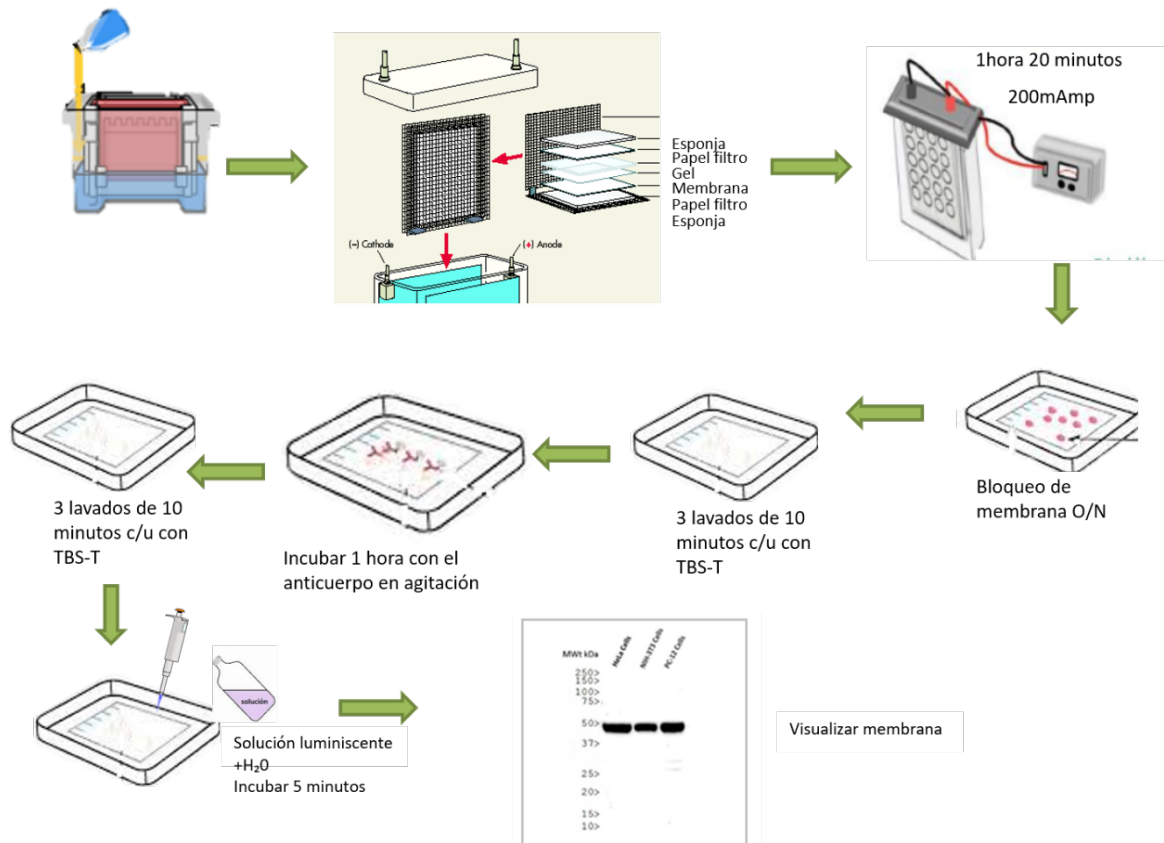


8.12 Western blot

Una vez realizado el gel de poliacrilamida, se procede a transferir la proteína a la membrana de nitrocelulosa en donde se visualizará la unión antígeno-anticuerpo por luminiscencia, de la siguiente manera:

1. Vaciar el buffer de transferencia en la cámara
2. Cortar la membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel
3. Humedecer cuidadosamente con ayuda de unas pinzas el par de esponjas, papeles filtro y la membrana con el buffer de transferencia
4. Colocar una esponja, un papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana, la otra esponja y papel filtro, en una especie de "sándwich"
5. Esto se monta dentro de la cámara de transferencia, colocando la membrana del lado positivo y el gel del negativo
6. Mantener la electro-transferencia durante 1 hora con 20 minutos a 200mAmp

7. Pasado este tiempo, tomar la membrana cuidadosamente, ponerla en un recipiente y agregar la solución de TBS-T+ 0.1 g de leche descremada
8. Dejarla bloqueando en el cuarto frío en agitación O/N
9. Al día siguiente, realizar 3 lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno
10. Añadir el anticuerpo e incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación
11. Lavar nuevamente 3 veces con TBS-T
12. Agregar 1 mL de cada solución de luminiscencia y 2 mL de agua
13. Incubar 5 minutos y desechar solución
14. Visualizar la membrana



8.13 Pruebas de estrés en *E. coli*

Para determinar si la expresión heteróloga de las proteínas LEA, tiene un efecto en *E. coli*, se realizan ensayos sometiendo las células a diferentes condiciones de estrés. Se parte de una inducción de la proteína de cada una de las cepas: PaLEA, AvLEA (+) y el pET 22b (-). De los matraces con la inducción, se toman alícuotas de 1mL a una densidad óptica de 0.6 para exponer las células a diferentes condiciones como se explica a continuación:

Salinidad: Las células se siembran por triplicados en placas Petri con medio LB ampicilina adicionado con IPTG y diferentes concentraciones de NaCl, después de 12-24 horas de incubación a 37°C se realiza cuenta viable por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Finalmente se determina el número de supervivencia celular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = \frac{\text{promedio del número de colonias en placa}}{\text{promedio del número de colonias en la placa control}} \times 100$$

Freeze-thaw: Esta técnica consiste en someter a las células a ciclos constantes de congelamiento y descongelamiento rápido para determinar el efecto que tiene esta acción sobre las membranas y proteínas de la célula. Para esto, una alícuota de células se congela durante tres minutos en hielo seco y se descongela durante tres minutos en un termoblock a 30°C, esto se considera un ciclo freeze-thaw. Estos ciclos se repiten de 1 a 20 veces, dónde cada 5 ciclos se toma muestra para ver el efecto del paso de los ciclos y posteriormente se siembran en cajas de LB con ampicilina por triplicados, finalmente se realiza cuenta viable por unidades formadoras de colonias.

Radiación UV: Se siembran las células por triplicado en cajas Petri de LB con ampicilina, y se exponen a rayos UV a 254 nm en la campana de flujo laminar durante 5-30 minutos, posteriormente se incuban a 37°C por 48 horas, y se realiza el conteo de unidades formadoras de colonias.

9. RESULTADOS

9.1 Amplificación de gen *lea* en *Pseudomonas*

Para amplificar el gene *lea* de *P. aeruginosa*, se extrajo DNA cromosomal y se comprobó la correcta extracción en un gel de agarosa. Observamos dos bandas de alto peso molecular que corresponden al DNA de nuestra cepa de interés (Figura 7).

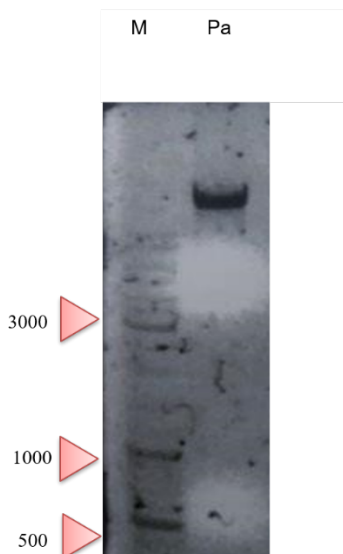


Figura 7. DNA cromosomal de la cepa de *Pseudomonas*. Gel de agarosa al 1% M (marcador molecular) Pa (*Pseudomonas aeruginosa*)

Este DNA se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen. Se realizó un gradiente de concentraciones de magnesio y temperaturas con el fin de encontrar las condiciones óptimas de amplificación para el gen.

Para *P. aeruginosa* esperábamos una banda de 465 pb. Observamos que la mejor condición para amplificar el gen *palea* fue utilizando de 2.5mM de MgCl₂ y una T_m de 52°C (Figura 8).

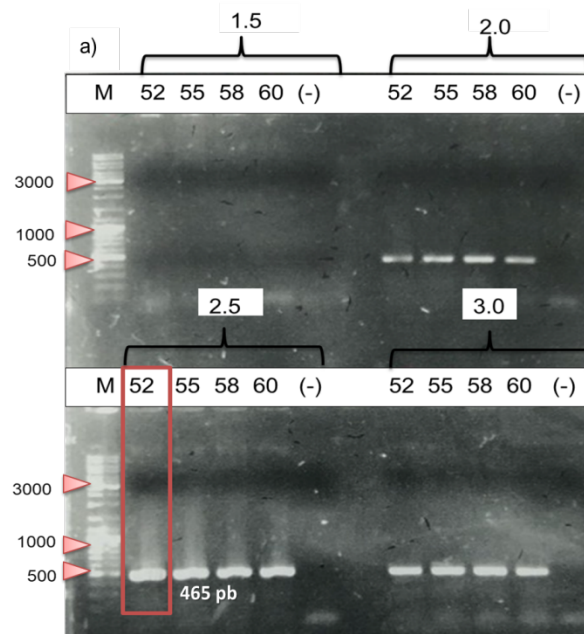


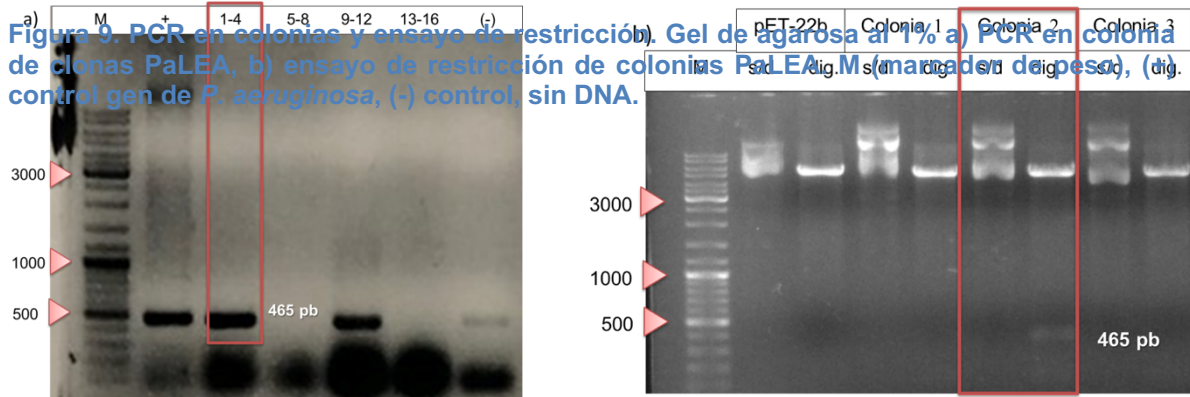
Figura 8. Amplificación de gen *lea* de la cepa de *Pseudomonas*. Gel de agarosa al 1% indicando las diferentes temperaturas y concentraciones de MgCl₂ utilizadas. a) Amplificación de gen *lea* en *P. aeruginosa*. M (marcador de peso), (-) control, sin DNA. TM (50-60°C). MgCl₂(1.5-3.0 mM).

9.2 Obtención de transformantes de *E. coli* con el gen *lea*

Para confirmar la presencia del plásmido en las colonias obtenidas, se realizaron PCR en colonia y/o ensayos de restricción (Figura 11).

Para PaLEA se analizaron 4 clonas candidatas mediante PCR, sin embargo, observamos amplificación de un fragmento cuando utilizamos el ADN del vector pet22b como control (Figura 9a), por esta razón decidimos realizar un ensayo de restricción para confirmar que efectivamente no hubiera algún fragmento clonado (Figura 9b).

Ambas clonas se confirmaron mediante secuenciación de ADN para demostrar que el fragmento clonado en el vector correspondiera a la secuencia amplificada de los genes de ambas cepas.



9.3 Expresión de proteína LEA de *Pseudomonas* en *E. coli*

Para determinar la correcta expresión de la proteína LEA en *E. coli*, Se indujeron cultivos de la cepa PaLEA sin el inductor IPTG y después de una y dos horas de inducción. Como control positivo utilizamos la cepa AvLEA y como negativo la cepa de *E. coli* BL21 que contiene el vector pET 22b vacío. Se lisaron las células y se utilizó el extracto celular para correr las muestras en geles de poliacrilamida (Figura 10).

En la muestra de PaLEA se observa la inducción de la proteína en el peso predicho de 17.2 Kda (Figura 10b).

En el control positivo, observamos la banda correspondiente a 14 Kda, peso que corresponde la proteína LEA de *A. vinelandii* y como se esperaba, en el control negativo no observamos inducción alguna (Figura 10 a).

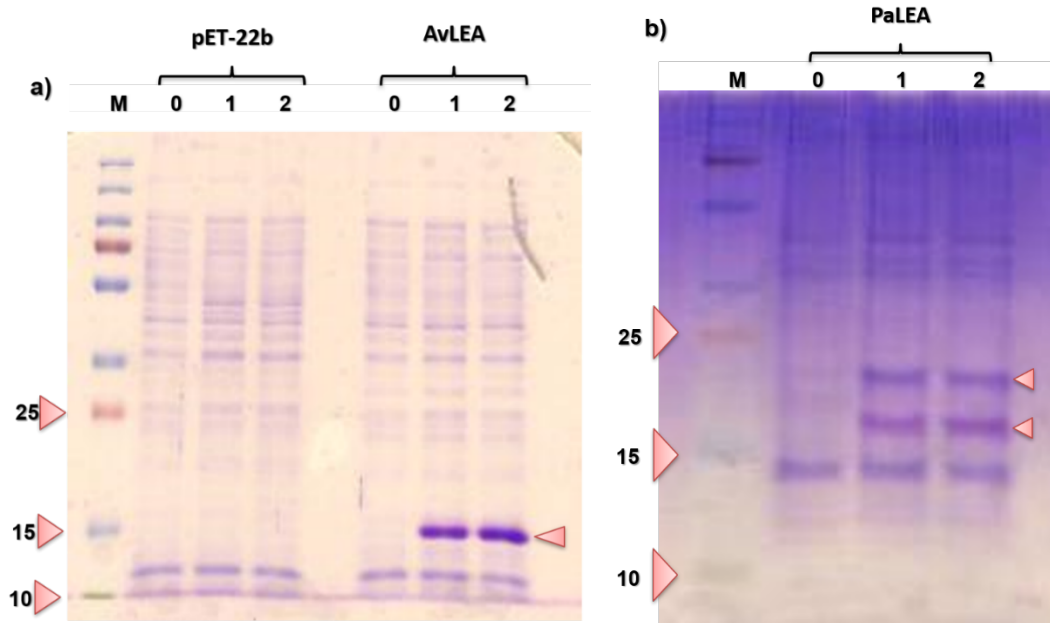


Figura 10. Inducción de proteínas LEA. Gel de poliacridamida al 12 y 15% respectivamente a) Controles pET-22b (-) y *A. Vinelandii* (+) b) PaLEA. M (marcador de peso). 0 (sin inducción), 1, 2 (horas tras la inducción).

9.4 Inmunodetección por Western blot

Ante el resultado de una doble banda vista en el gel, posterior a la inducción de la proteína LEA por el método seleccionado, se procedió a verificar que ambas bandas se trataran de la misma proteína, para esto, se realizó la técnica de Western blot, en dónde, la unión del anticuerpo con la proteína se visualizó por luminiscencia en la membrana de nitrocelulosa con ayuda del programa de Image Studio. Como producto de ello se detectaron ambas bandas correspondientes a los pesos moleculares previamente vistos (Figura 11), como control negativo se ocupó el plásmido vacío (pET- 22b) y como control positivo la enzima catecol dioxigenasa (CDO) con un peso molecular mayor al de la PaLEA, esperando no interferir en su señal.

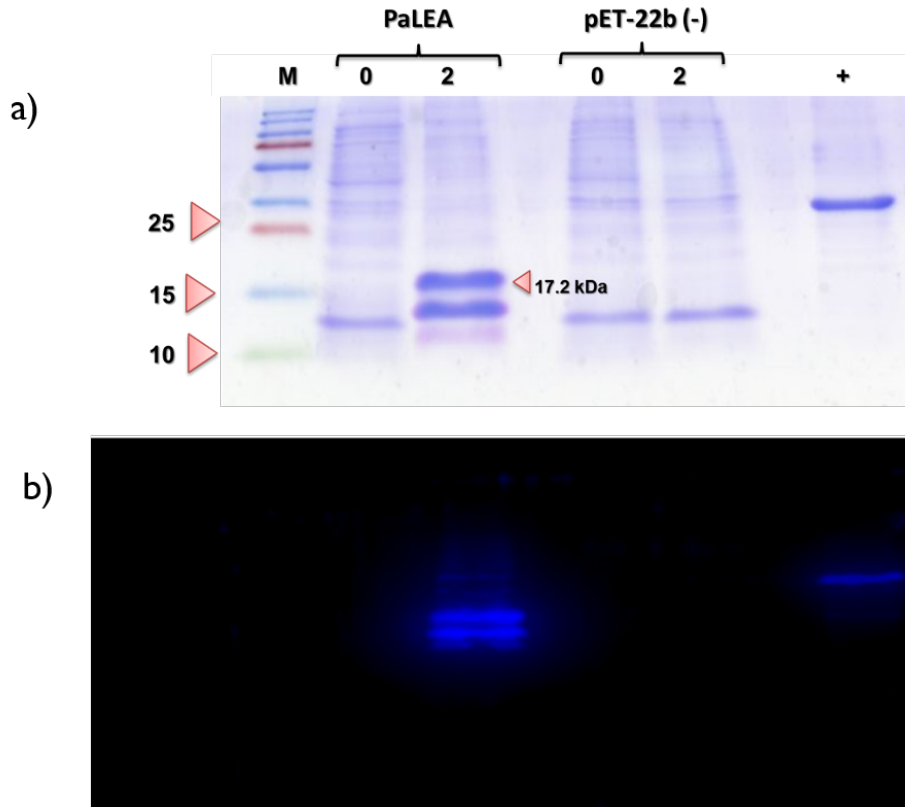


Figura 11. Inducción y Western blot a) Proteína PaLEA. Gel de poliacrilamida al 15%. b) Detección por Western blot. M (marcador de peso). 0 (sin inducción), 2 (horas tras la inducción). (+) Catecol dioxigenasa

Considerando que pudo existir algún fallo en la correcta producción de la proteína y tomando en cuenta que esto podría ocasionarnos un problema al momento de determinar el papel de la misma en las pruebas de estrés, se decidió volver a amplificar la secuencia del gen *palea* del dna cromosomal de la cepa de *P. aeruginosa* para construir nuevamente la cepa de *E. coli* BL21.

En la figura 12, podemos observar que, en esta cepa, la expresión de la proteína se dio de manera adecuada, visualizando una única banda que corresponde al peso molecular esperado.

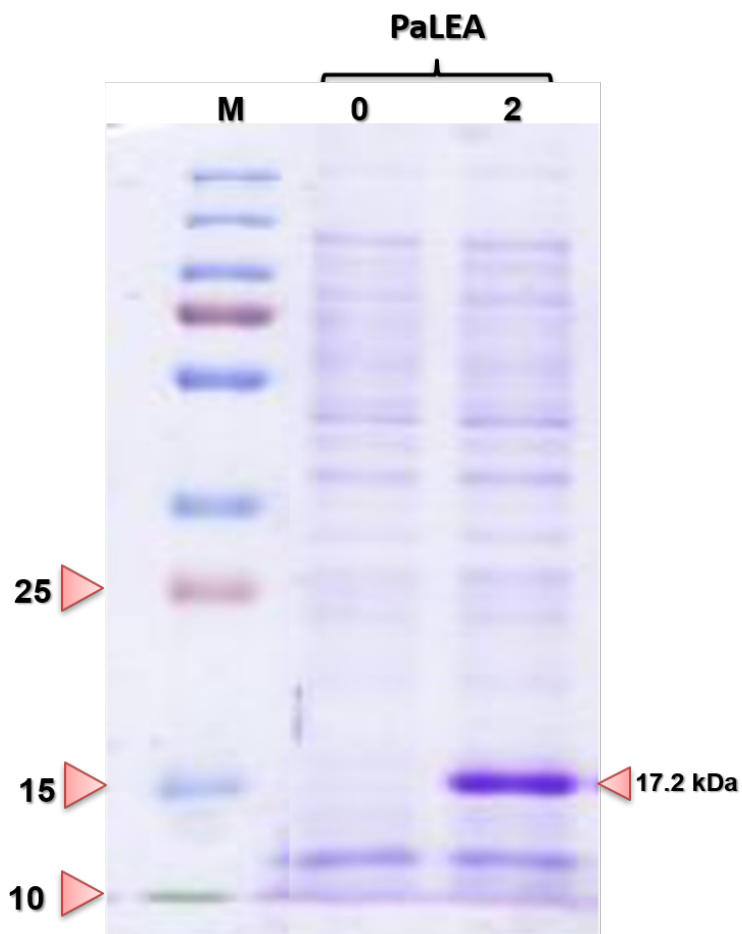


Figura 12. Inducción de Proteína PaLEA. Gel de poliacrilamida al 15%. M (marcador de peso). 0 (sin inducción), 2 (horas tras la inducción).

9.5 Ensayos de tolerancia al estrés en células de *E. coli*

Una vez determinada la inducción de la muestra se continuo con las pruebas de tolerancia a estrés en *E. coli* para determinar si la expresión de la proteína LEA confería algún tipo de tolerancia.

9.5.1 Ensayo Freeze-thaw

De igual forma, para determinar si también había un efecto en la protección contra ciclos de congelamiento, se sometieron las células a ciclos constantes de congelamiento y descongelamiento rápido para determinar el efecto que tiene esta acción sobre las membranas y proteínas de la célula. Para esto, una alícuota de

células se congela durante tres minutos en hielo seco y se descongela durante tres minutos en un termoblock a 30°C. Estos ciclos se repiten de 1 a 20 veces, dónde cada cinco ciclos se toma muestra para ver el efecto del paso de los ciclos y posteriormente se siembran en cajas de LB con ampicilina por triplicados, finalmente se realiza cuenta viable por unidades formadoras de colonias y se determina el porcentaje de supervivencia.

En este caso se observó que no hubo diferencia entre las cepas desde los primeros cinco ciclos de congelamiento ya que las células morían rápidamente, sin embargo, quitando el primer punto de la gráfica y viendo las diferencias de cinco a veinte ciclos, se observa que el control negativo (pET22b) presenta mayor crecimiento que las células que contienen la proteína LEA (Figura 13).

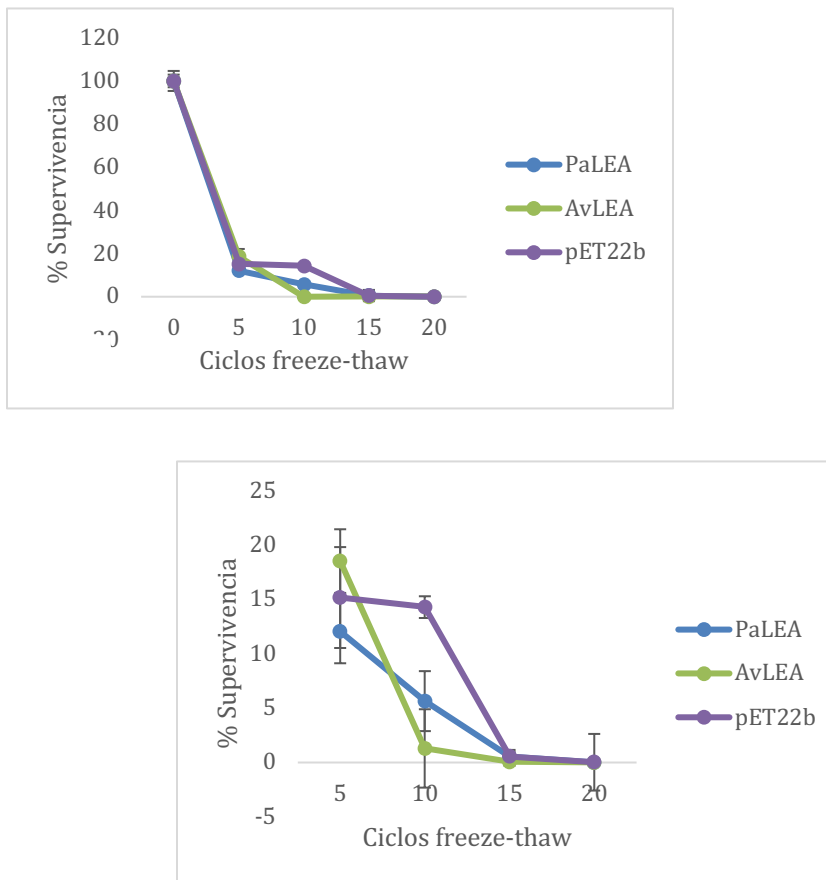


Figura 13. Porcentaje de supervivencia de proteína LEA provenientes de *P. aeruginosa* sobre expresadas en células de *E. coli* bajo ciclos de freeze- thaw.

9.5.2 Ensayo radiación Ultravioleta (UV)

Se sembraron las células en cajas Petri de LB con ampicilina y se sometieron a 254 nm de radiación UV en la campana de flujo laminar, durante 5-30 minutos, para después incubarlas a 37°C durante 48 horas y determinar el efecto protector. Pasado este tiempo, se hizo conteo de UFC y se revisó el porcentaje de supervivencia. Como resultado, no se observó diferencia entre las cepas, desde los 5 minutos en exposición a los rayos UV las células murieron rápidamente (Figura 14).

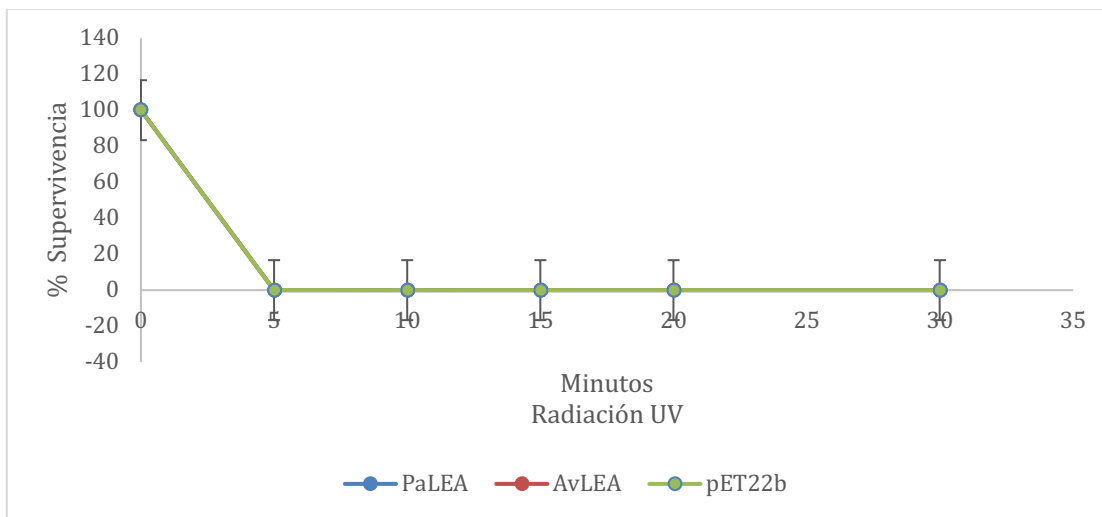


Figura 14. Porcentaje de supervivencia de proteína LEA provenientes de *P. aeruginosa* sobre expresadas en células de *E. coli* bajo radiación UV.

9.5.3 Ensayo de salinidad

Para determinar el efecto de la salinidad sobre las células, se sembraron diluciones de cultivos previamente inducidos con IPTG en placas Petri con medio LB y ampicilina 100mM, adicionado con diferentes concentraciones de NaCl, después de 12-24 horas de incubación a 37°C. Se realizó cuenta viable por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y se graficó por porcentaje de supervivencia. Como resultado se obtuvo que las células con PaLEA soportaron un rango de 0-500 mM de NaCl adicional al del medio, e incluso hubo un aumento de células en 200 mM

en comparación con 0 mM. El control positivo se comportó como lo esperado soportando hasta 600 mM de NaCl adicional al del medio. En cuanto al control negativo, creció por debajo de las células con proteína LEA (Figura 15).

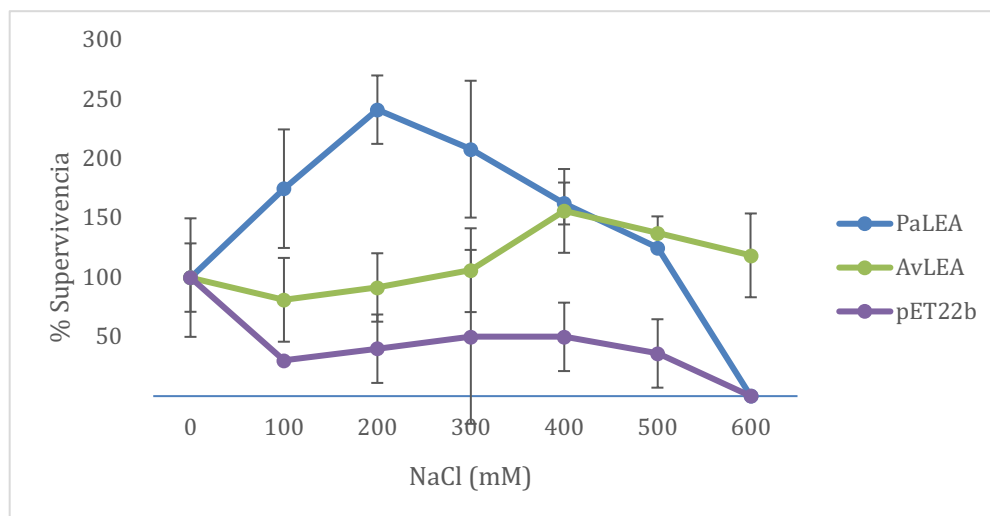


Figura 15. Porcentaje de supervivencia de proteína LEA proveniente de *P. aeruginosa* sobre expresadas en células de *E. coli* bajo diferentes concentraciones de NaCl.

10. DISCUSIÓN

Diversos estudios se han centrado en la adaptación y respuesta al estrés de los organismos ante ambientes adversos, en los cuáles han destacado a las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), las cuáles han sido encontradas en muchas especies, desde plantas, animales, hongos, e incluso bacterias, como es el caso de este estudio, el cual es pionero en caracterizar una proteína LEA proveniente de una bacteria marina llamada *P. aeruginosa*. Esta proteína nombrada PaLEA fue transformada, expresada, inducida y purificada con éxito, sin embargo, una vez finalizado el experimento de purificación se observaron dos bandas distintas pertenecientes a PaLEA, verificando por Western blot, la primera banda se observa en 17.2 kDa que coincide con el peso molecular de la proteína de interés, la segunda banda se observa por debajo de los 15 kDa, este hecho desencadenó el interés de indagar a qué se debía la aparición de una segunda banda. En un reporte de una proteína LEA de amaranto (*Amaranthus cruentus*) denominada AcLEA, se encontró que ocurría algo similar, en el estudio se identificaron dos bandas en un gel de

poliacrilamida y mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) confirmaron que ambas se trataban de la misma proteína AcLEA, al no detectar péptidos en la región N-terminal de la segunda banda concluyeron que esta proteína corta era un fragmento truncado que carece de la región N-terminal (Saucedo, *et al.*, 2017).

Sin embargo, en otros estudios se ha observado una expresión de proteínas LEA en *E. coli* y purificación sin inconveniente alguno. Tal es el caso de la proteína LEA llamada WRAB18 proveniente de trigo (*Triticum aestivum*) en donde se extrajo su ARN total para posteriormente sintetizar ADNc y clonarlo en el pET28a, el plásmido recombinante se transformó en células competentes de la cepa BL21 de *E. coli* y se indujo la sobreexpresión de las proteínas con IPTG 1.0 mM durante 12 horas. Después de purificar la proteína se examinó mediante SDS-PAGE al 12 % y las bandas de proteína se tiñeron con azul Coomassie, de igual manera se verificó por Western Blot la expresión de WRAB18 obteniendo exitosamente una sola banda esperada a los 21 kDa. (Wang, *et al.*, 2017)

O tal es el caso de la única proteína LEA estudiada hasta el momento avLEA1 proveniente de una bacteria llamada *Azotobacter vinelandii*, de la cual se amplificó un fragmento de ADN de 396pb correspondiente al gen *lea1* para después clonarse en el vector pET22b+, y una vez el plásmido construido, se procedió a transformar células BL21(DE3) de *E. coli* para expresar la proteína induciéndola con IPTG 1 mM durante 2 horas. La proteína recombinante se purificó y se analizó en SDS-PAGE utilizando geles de acrilamida al 12 % y finalmente se inmunodetectó por western blot. Resultando en una exitosa expresión de la proteína, obteniendo una única banda esperada en los geles a 14.3 kDa. Esto nos hace referencia a que anteriormente ya se había logrado la expresión exitosa de proteínas LEA provenientes de diferentes organismos en células de *E. coli*. (Rodríguez-Salazar, *et al.*, 2017).

Para nuestro estudio utilizamos condiciones similares para la clonación y expresión de la proteína paLEA de acuerdo con los datos reportados en la literatura.

Esto nos llevó a suponer que lo que observamos podría tratarse también de una secuencia trunca o quizá una proteólisis durante la purificación y no sobre la metodología utilizada para la expresión heteróloga de la proteína. Esto se pudo haber confirmado o descartado mediante una técnica de secuenciación de proteínas, que nos indicaría si la secuencia nucleotídica o peptídica tiene algún cambio con respecto a la secuencia original que estuviera provocando la temprana terminación de la traducción de nuestra proteína de interés. Por este motivo decidimos realizar nuevamente la construcción de nuestra cepa, determinando si en el primer caso no se expresó de manera adecuada debido a un error en la transcripción del mensajero o en la traducción de la misma proteína.

La célula, para su normal metabolismo, necesita una concentración iónica determinada. La exposición a altas concentraciones osmóticas puede causar toxicidad a las células, deshidratación y daño tanto de las proteínas como de la membrana celular (Liu y Zheng, 2005). Como consecuencia ocurre un aumento en la presión osmótica y la concentración de iones inorgánicos, resultando en la muerte celular (Karandashova y Elanskaia, 2005).

En células transformantes sometidas a altas concentraciones salinas que tienen proteínas LEA, se ha visto que estas favorecen a su supervivencia en distintos rangos de NaCl. En un reporte, 6 de 11 genes lea provenientes de *Dendrobium officinale* mostraron un incremento de tolerancia a NaCl, con mucho mayor viabilidad con respecto al control, soportando de 2 a 7 veces más cloruro de sodio de lo normal (Ling, *et al.*, 2016). En otro reporte se encontró un gen en soya codificante para la proteína PM2, en donde se estudió el efecto de la proteína completa, dos fragmentos truncos y una secuencia artificial duplicando el 22-mer, resultando en hasta un 60% de supervivencia en las células de *E. coli* que contenían la proteína en comparación con el control. Se llegó a la conclusión de que el polipéptido PM2 mejora la tolerancia a la sal y la región de repetición de 22 unidades es una región funcional importante (Hu, *et al.*, 2019). Era interesante para nuestro estudio el someter a las células a este estrés en particular ya que el organismo del

que proviene nuestra proteína LEA pertenece a una *Pseudomonas* marina y su propio ambiente es altamente salino, llevándonos a la suposición de que las proteínas LEAS que contiene *P. aeruginosa* son parte de su adaptación al medio en el que viven. En nuestro caso, también se observó un favorable efecto protector de PaLEA con respecto a los controles, dando como resultado un incremento por arriba de 200% de supervivencia celular en 200 mM de NaCl adicional al medio, infiriendo que NaCl favorece el crecimiento celular; esto podría deberse a la procedencia del organismo marino de donde proviene la proteína PaLEA, en comparación con las LEA's de *D. officinale* y PM2 de soya, en donde no se ve este resultado, ya que naturalmente no se encuentran en ambientes salinos.

La exposición a altas concentraciones salinas y la congelación, aunque factores estresantes distintos, comparten un factor común: ambos pueden comprometer la integridad de la membrana celular y sus proteínas. El estrés por congelamiento también conduce a la producción de radicales de oxígeno, porque las reacciones de captación de luz continúan funcionando, mientras que las reacciones bioquímicas están severamente restringidas, resultando en daños directos a la integridad de las células y causando su muerte (Bohnert, *et al.*, 1995). En este caso, sabemos que los ambientes marinos también están sujetos a sufrir cambios drásticos como la congelación de los mismos, por esta razón es interesante estudiar nuestra proteína LEA ante dicho estrés.

En cuanto a los ciclos de freeze-thaw, se determinó un nulo efecto protector por parte de PaLEA, siendo que pasados los primeros cinco ciclos de congelamiento las células morían, sin embargo, durante los primeros cinco ciclos se observó una mayor supervivencia por parte del control negativo (plásmido vacío) en comparación con las células que sí tenían la LEA, perjudicando de alguna manera el crecimiento celular. A pesar de que en otros reportes si se ha visto mayor viabilidad en las células que contienen proteínas LEA, por ejemplo en una LEA proveniente de *Oryza sativa*, nombrada OsLEA5 en donde la viabilidad celular se mantuvo hasta un 46% después de cuatro ciclos de freeze-thaw, mientras que en el vector vacío como

control negativo se mantenía el 26%, pasado los ocho ciclos se siguió manteniendo el 7% de supervivencia, y para el control negativo ya habían muerto todas las células (He, *et al.* 2012). No tenemos certeza de que pueda estar ocurriendo en las células transformadas con el control vacío, sin embargo parece ser evidente que la proteína PaLEA no protege durante condiciones de congelamiento.

La radiación ultravioleta (UV) causa daño en todos los organismos vivos. Los rayos UV dan como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno que causan daños en el ADN, como los dímeros de timina, que bloquean la transcripción del ADN y provocan la muerte celular (Huwaidi, *et al.*, 2018). Con el paso del tiempo, la contaminación aumenta y con ello el dióxido de carbono, agotando cada vez más la capa de ozono y permitiendo el paso de los rayos UV en mayor cantidad, los ambientes marinos no quedan exentos y los organismos que los habitan también sufren las consecuencias.

En nuestro caso no observamos diferencia entre las cepas, en la prueba de radiación UV lo que nos dice que PaLEA, no confiere protección a las células, observándose un rápido decremento en la viabilidad posterior a los cinco minutos de exposición a radiación UV. A diferencia de otros experimentos donde se ha visto un buen efecto de protección por parte de las células transformadas con proteínas LEA, en este caso se trata de la misma cepa OsLEA5 en donde fue sometida a rayos UV en una longitud de onda de 254 nm en los rangos de tiempo de 5- 20 minutos, y posteriormente incubadas de 24-48 horas a 37°C, a lo que sus resultados demostraron una mejor supervivencia por parte de OsLEA5 que células con el plásmido vacío, ya que al pasar el mayor tiempo, de 20 minutos, las células se mantenían vivas un 5% mientras el control negativo no mostraba crecimiento (He, *et al.* 2012).

En general, aún hace falta mucho por conocer sobre las proteínas LEA, pues son muy variadas y PaLEA no es la excepción, se espera en un proyecto futuro agregar más información a este estudio con respecto a actividad enzimática, sin embargo,

desde un punto de vista biológico, podríamos agregar que en primera estancia, la proteína PaLEA podría estar ayudando a proteger junto con otros factores, a las células de *P. aeruginosa* en ambientes marinos, especulando que este efecto podría darse mediante los mecanismos descritos para algunas proteínas LEA del grupo 1, como son, protegiendo membranas, tal es el caso de esta proteína LEA (LEAM) identificada en las mitocondrias de las semillas de guisantes (*Pisum sativum*), la cual se pliega en una hélice α anfipática de clase A tras la desecación y se estabiliza aún más dentro de la membrana mediante interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente del péptido y los restos cargados negativamente en los grupos de cabeza de fosfolípidos. La interacción LEAM- membrana en estado seco se confirmó mediante calorimetría diferencial de barrido. De igual manera, se utilizó la espectroscopia de fluorescencia e infrarrojo transformada de Fourier (FTIR) para obtener información sobre los detalles moleculares de las interacciones de LEAM con las bicapas de fosfolípidos en estado seco y sus efectos sobre la estabilidad de los liposomas, los resultados mostraron que LEAM interactúa específicamente con los grupos fosfato cargados negativamente en los fosfolípidos secos y que esta interacción aumenta la movilidad de la cadena de acilo graso y disminuye la temperatura de fusión de los lípidos. Esto contribuye al mantenimiento del estado líquido-cristalino de los lípidos, que es el estado funcional de las membranas biológicas y, por tanto, podría ser crucial para la integridad funcional de las membranas mitocondriales expuestas a la desecación en semillas secas (Tolleter, *et al.*, 2010).

También existen enzimas y proteínas que protegen de los cambios adversos que pudiera ocasionar el estrés osmótico dado por altas concentraciones de sal. Esto podría ser comprobado mediante diversas técnicas moleculares y bioquímicas, dándonos una mejor visión del papel que estaría desempeñando esta proteína en su ambiente natural. Como por ejemplo LsEm1, la cual fue sobreexpresada, purificada y añadida en proporciones 1:1, 3:1 y 10:1 a la LDH para analizar si había efecto protector a la actividad enzimática de dicha proteína bajo un tratamiento de sal. En donde se vio que la actividad enzimática en la proporción 10:1 se mantuvo hasta un 70% en comparación con la enzima sola en donde la actividad decaía a un

10% aproximadamente. Los datos sugirieron que la proteína LsEm1 evita la inactivación de la enzima LDH y estabiliza su actividad, y se especula que LsEm1 podría estar involucrada en la tolerancia al estrés salino, según los resultados anteriores. Tal como PaLEA ayudó a las células de *E. coli* podría suponerse que realizando ensayos enzimáticos también ayude a la estabilización de proteínas diana (Xiang, *et al.*, 2018).

No existen muchos reportes de expresión de proteínas LEA del grupo 1 bacterianas, Campos, *et al.*, 2013 realizó un estudio detallado de este grupo de proteínas en particular, en donde expresó los motivos y purificó las proteínas de GsiB de *B. subtilis*, AtEM6 de *A. thaliana* y LEA1-YciG de *P. aeruginosa* (PaEM), y llevo a cabo ensayos de crio protección in vitro con LDH ya sabiendo que la enzima es susceptible a los tratamientos de congelación y descongelación inactivándose por completo después de cinco ciclos; teniendo como resultado que la adición de una proteína LEA del grupo 1 después de cinco ciclos en diferentes proporciones evitó parcialmente esta inactivación. En los tres casos, este efecto protector se detectó a una relación molar LEA: LDH de 1:1, y fue dependiente de la concentración, ya que se observó una mayor protección cuando la relación LEA: LDH se incrementó (20:1) en los tres casos.

También existe evidencia previa que respalda que las proteínas similares a LEA1 bacterianas y vegetales previenen la inactivación enzimática debido a que el motivo 20-mer es un factor importante, en este caso se eliminó el motivo 20-mer de AtEM6. La proteína recombinante mutante, AtEM6del, se sobre expresó y purificó de *E. coli* para probar su actividad protectora, se usó en proporciones 1:1 y 20:1 (LEA1:LDH) sin embargo, aunque se detectó una menor actividad para AtEM6del en relación 20:1 (LEA1:LDH), la diferencia entre las proteínas completas y acortadas no proporcionó resultados significativos, lo que sugirió que la región deletada no juega un papel relevante para la actividad protectora de las proteínas LEA1, al menos bajo las condiciones probadas, más bien indican que otras regiones de estas proteínas son importantes para prevenir la inactivación de la LDH en los ciclos de congelación y descongelación.

Resulta muy interesante especular que la adquisición de un gen similar a LEA1 durante la evolución puede reflejar la ventaja selectiva de una mayor capacidad del organismo receptor para responder a condiciones adversas, por ello se debe realizar un análisis más detallado para identificar aquellos residuos o regiones proteicas críticas para la actividad de la proteína LEA1 (Campos, *et al.*, 2013) .

En otro reporte, para el caso de LEAs del Grupo 1 de plantas u otros organismos, se encontraron seis genes codificantes para proteínas LEA en *Xerophyta schlechteri* (XsLEAs). Las seis proteínas fueron identificadas y clasificadas en los diferentes grupos y una de ellas resultó perteneciente al grupo 1 (XsLEA 1-8) con un peso molecular de 10.73 kDa.

Por medio de dicróismo circular se verificó la plasticidad estructural, XsLEA1-8 experimentó un cambio conformacional desde aproximadamente un 92 % desordenado en solución acuosa y hasta un 100 % de hélice alfa en estado hidrofóbico, lo que sugiere que la dinámica estructural puede desempeñar un papel en su función en el entorno subcelular.

Para corroborar la propiedad protectora de las XsLEAs, se realizaron análisis *in vitro* e *in vivo*. Primeramente, se clonaron en un vector de expresión y se transformaron células de *E. coli* BL21, induciendo la expresión de las proteínas con IPTG durante 2 horas, para posteriormente someterlas a estrés térmico, salino y de manitol. Curiosamente, la cepa XsLEA1-8 fue la que mostró un mejor crecimiento en todas las condiciones estresantes, lo que sugiere que esta proteína tiene una función protectora más alta en *E. coli* en comparación con las otras XsLEA probadas. Posteriormente se purificaron las proteínas y también se realizaron pruebas en proporción 1:1 con LDH durante la desecación, el calor y el estrés oxidativo. A excepción de una, todas las demás proteínas XsLEA pudieron proteger la actividad de la LDH contra los diversos estreses y nuevamente XsLEA1-8 mostró la mayor capacidad protectora en comparación con las demás XsLEAs, manteniendo la actividad a un 63% en desecación, 55% en calor y un 95% en estrés oxidativo (Artur, *et al.*, 2019).

Por otro lado, entre los últimos reportes que hay, se identificó un gen codificante para una proteína LEA del grupo 1 en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y se creó un mutante nulo para estudiar su papel *in vivo*. Los resultados demostraron que los animales mutantes LEA-1 formaron larvas sensibles al calor y al estrés osmótico (Hibshman y Goldstein, 2021) .

Sería interesante en nuestro caso determinar si la proteína purificada PaLEA tiene un efecto *in vitro* similar a lo descrito para otras proteínas lea del Grupo 1 ya sea protegiendo la actividad enzimática de la LDH u otras enzimas del metabolismo central, así como la realización de mutantes para determinar si la viabilidad se ve afectada cuando las células son sometidas a estrés y la sobre expresión de la misma esperando observar el efecto contrario, esto nos ayudaría a contribuir con la generación de conocimiento sobre proteínas de este grupo poco exploradas en bacterias.

Estos reportes nos dan una idea del funcionamiento de las LEAs del grupo 1 y su potencial, sin embargo, aún falta mucho por explorar en cuanto al mecanismo de acción de estas proteínas.

11. CONCLUSIONES

PaLEA no solo protege células de *E. coli* en condiciones de salinidad si no que su expresión podría conferir una ventaja al observarse mayor el crecimiento de estas células en concentraciones altas de NaCl.

La sobreexpresión de PaLEA no ofrece protección alguna cuando células son sometidas a freeze-thaw y radiación UV.

12. PERSPECTIVAS

Purificar la proteína PaLEA y realizar los ensayos de protección enzimática sobre la lactato deshidrogenasa (LDH).

13. BIBLIOGRAFIA

Adesemoye, Anthony O.; Kloepper, Joseph W. (2009): Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. En: *Applied microbiology and biotechnology* 85 (1), pág. 1–12. DOI: 10.1007/s00253-009-2196-0.

Artur, Mariana A. Silva; Rienstra, Juriaan; Dennis, Timothy J.; Farrant, Jill M.; Ligterink, Wilco; Hilhorst, Henk (2019): Structural Plasticity of Intrinsically Disordered LEA Proteins from *Xerophyta schlechteri* Provides Protection In Vitro and In Vivo. En: *Frontiers in Plant Science* 10. DOI: 10.3389/fpls.2019.01272.

Battaglia, Marina; Olvera-Carrillo, Yadira; Garcarrubio, Alejandro; Campos, Francisco; Covarrubias, Alejandra A. (2008): The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. En: *Plant physiology* 148 (1), pág. 6–24. DOI: 10.1104/pp.108.120725.

Berg, Gabriele (2009): Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. En: *Applied microbiology and biotechnology* 84 (1), pág. 11–18. DOI: 10.1007/s00253-009-2092-7.

Bohnert, H. J.; Nelson, D. E.; Jensen, R. G. (1995): Adaptations to Environmental Stresses. En: *The Plant cell* 7 (7), pág. 1099–1111. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1099.

Bray, Elizabeth A. (1997): Plant responses to water deficit. En: *Trends in plant science* 2 (2), pág. 48–54. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)82562-9.

Buck, J. D. (1982): Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. En: *Applied and Environmental Microbiology* 44 (4), pág. 992–993.

Buerger, S.; Spoering, A.; Gavrish, E.; Leslin, C.; Ling, L.; Epstein, S. S. (2012): Microbial scout hypothesis and microbial discovery. En: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (9), pág. 3229–3233. DOI: 10.1128/AEM.07308-11.

Campos, F.; Cuevas-Velazquez, C.; Fares, M. A.; Reyes, J. L.; Covarrubias, A. A. (2013): Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaea and bacteria domains. En: *Molecular genetics and genomics* : MGG 288 (10), pág. 503–517. DOI: 10.1007/s00438-013-0768-2.

Capon, Robert (2010): Australian microbial biodiscovery: From bugs to drugs. En: *Microbiology Australia*.

Chevalier, Sylvie; Bouffartigues, Emeline; Bodilis, Josselin; Maillot, Olivier; Lesouhaitier, Olivier; Feuilloley, Marc G. J. et al. (2017): Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. En: *FEMS microbiology reviews* 41 (5), pág. 698–722. DOI: 10.1093/femsre/fux020.

CIGoM (2015): Una catástrofe inmensa. Proyecto del Fondo de Hidrocarburos. Disponible en línea en <https://cigom.org/>.

Close, T. J.; Kortt, A. A.; Chandler, P. M. (1989): A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. En: *Plant molecular biology* 13 (1), pág. 95–108.

Csonka, L. N. (1989): Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. En: *Microbiological reviews* 53 (1), pág. 121–147.

Dandekar, A. M.; Uratsu, S. L. (1988): A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. En: *Journal of Bacteriology* 170 (12), pág. 5943–5945. DOI: 10.1128/jb.170.12.5943-5945.1988.

Dash, Hirak R.; Mangwani, Neelam; Chakraborty, Jaya; Kumari, Supriya; Das, Surajit (2013): Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. En: *Applied microbiology and biotechnology* 97 (2), pág. 561–571. DOI: 10.1007/s00253-012-4584-0.

Demain, Arnold L.; Sanchez, Sergio (2009): Microbial drug discovery: 80 years of progress. En: *The Journal of antibiotics* 62 (1), pág. 5–16. DOI: 10.1038/ja.2008.16.

Diosini, Hebe M.; Lozada, Mariana; Olivera, Nelda L. (2012): Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and method. En: *Revista Argentina de microbiología* 44, pág. 49–60.

Dóczy, Róbert; Kondrák, Mihály; Kovács, Gabriella; Beczner, Farkas; Bánfalvi, Zsófia (2005): Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. En: *Plant physiology and biochemistry : PPB* 43 (3), pág. 269–276. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.02.002.

Dure, L. (1993): A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. En: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 3 (3), pág. 363–369.

Gal, Tali Z.; Glazer, Itamar; Koltai, Hinanit (2004): An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. En: *FEBS letters* 577 (1-2), pág. 21–26. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.09.049.

Garay-Arroyo, A.; Colmenero-Flores, J. M.; Garcarrubio, A.; Covarrubias, A. A. (2000): Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. En: *The Journal of biological chemistry* 275 (8), pág. 5668–5674. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5668.

Gilles, Gregory J.; Hines, Kelly M.; Manfre, Alicia J.; Marcotte, William R. (2007): A predicted N-terminal helical domain of a Group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. En: *Plant physiology and biochemistry : PPB* 45 (6-7), pág. 389–399. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.03.027.

Godoy-Lozano, E. Ernestina; Escobar-Zepeda, Alejandra; Raggi, Luciana; Merino, Enrique; Gutierrez-Rios, Rosa Maria; Juarez, Katy *et al.* (2018): Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. En: *Frontiers in Microbiology* 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02528.

Gupta, Munishwar N.; Raghava, Smita (2007): Relevance of chemistry to white biotechnology. En: *Chemistry Central journal* 1, pág. 17. DOI: 10.1186/1752-153X-1-17.

Häse, C. C.; Fedorova, N. D.; Galperin, M. Y.; Dibrov, P. A. (2001): Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. En: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 65 (3), 353-70, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.65.3.353-370.2001.

Hincha, Dirk K.; Thalhammer, Anja (2012): LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. En: *Biochemical Society transactions* 40 (5), pág. 1000–1003. DOI: 10.1042/BST20120109.

Hu, Tingzhang; Liu, Yuanli; Zhu, Shanshan; Qin, Juan; Li, Wenping; Zhou, Nong (2019): Overexpression of OsLea14-A improves the tolerance of rice and increases Hg accumulation under diverse stresses. En: *Environmental science and pollution research international* 26 (11), pág. 10537–10551. DOI: 10.1007/s11356-019-04464-z.

Huwaidi, Alaa; Pathak, Nishit; Syahir, Amir; Ikeno, Shinya (2018): *Escherichia coli* tolerance of ultraviolet radiation by in vivo expression of a short peptide designed from late embryogenesis abundant protein. En: *Biochemical and biophysical research communications* 503 (2), pág. 910–914. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.095.

Huse, Susan M.; Dethlefsen, Les; Huber, Julie A.; Mark Welch, David; Relman, David A.; Sogin, Mitchell L. (2008): Correction: Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. En: *PLoS Genetics* 4 (12). DOI: 10.1371/annotation/3d8a6578-ce56-45aa-bc71-05078355b851.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene En El Trabajo (2016): *Pseudomonas aeruginosa*. En colaboración con Databio. Disponible en línea en <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>, Última actualización el 15 de marzo 2016.

Jonathan D. Hibshman, Bob Goldstein (2021): LEA motifs promote desiccation tolerance in vivo. En: *BMC Biology* 19. DOI: 10.1186/s12915-021-01176-0.

Karandashova, I. V.; Elanskaia, I. V. (2005): Genetic control and mechanisms of salt and hyperosmotic shock resistance in cyanobacteria. En: *Genetika* 41 (12), pág. 1589–1600.

Karner, M. B.; DeLong, E. F.; Karl, D. M. (2001): Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. En: *Nature* 409 (6819), pág. 507–510. DOI: 10.1038/35054051.

Kim, Hyung-Sae; Lee, Jee Hyun; Kim, Jae Joon; Kim, Chang-Hoon; Jun, Sung-Soo; Hong, Young-Nam (2005): Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. En: *Gene* 344, pág. 115–123. DOI: 10.1016/j.gene.2004.09.012.

Kyte, J.; Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. En: *Journal of molecular biology* 157 (1), pág. 105–132.

Lara-Lara José Rubén (2008): Los ecosistemas marinos. En colaboración con Arenas Fuentes Virgilio, Bazán Guzmán Carmen, Díaz Castañeda Victoria, Escobar Briones Elva, de la Cruz García Abad María, Gaxiola Castro Gilberto, Robles Jarero Guadalupe, Sosa Ávalos Ramon, Soto González Luis Arturo, Tapia García Margarito, Valdez-Holguín J. Eduardo. CONABIO. México (Capital natural de México, vol. I Conocimiento actual de la biodiversidad). Disponible en línea en https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I05_Losecosistemasmr.pdf.

Lauro, Federico M.; McDougald, Diane; Thomas, Torsten; Williams, Timothy J.; Egan, Suhelen; Rice, Scott et al. (2009): The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 106 (37), pág. 15527–15533. DOI: 10.1073/pnas.0903507106.

Liu, Yun; Zheng, Yizhi (2005): PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. En: *Biochemical and biophysical research communications* 331 (1), pág. 325–332. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.165.

López-Monteon Aracely (2019): Dirección de Comunicación de la Ciencia. CLONACIÓN GENÉTICA: Mejorando la vida. edit. por Eliseo Hernández Gutiérrez. Universidad Veracruzana. Fac. de Ciencias químicas-UV, Orizaba. Disponible en línea en <https://www.uv.mx/cienciauv/blog/clonaciongeneticamejorandovida/>.

Macleod, R. A.; Onofrey, E. (1957): Nutrition and metabolism of marine bacteria. III. The relation of sodium and potassium to growth. En: *Journal of cellular and comparative physiology* 50 (3), pág. 389–401.

Maitra, N.; Cushman, J. C. (1994): Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein. En: *Plant physiology* 106 (2), pág. 805–806.

Margesin, R.; Schinner, F. (2001): Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. En: *Applied microbiology and biotechnology* 56 (5-6), pág. 650–663.

Maskin, Laura; Maldonado, Sara; Iusem, Norberto D. (2008): Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. En: *Molecular biology reports* 35 (4), pág. 501–505. DOI: 10.1007/s11033-007-9114-2.

Milagro, Montero María (2012): *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. Universidad Autónoma de Barcelona- Departamento de medicina. Barcelona. Disponible en línea en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/107902/mmm1de1.pdf?seque>.

Morrissey, John P.; Dow, J. Maxwell; Mark, G. Louise; O'Gara, Fergal (2004): Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. En: *EMBO reports* 5 (10), pág. 922–926. DOI: 10.1038/sj.embor.7400263.

Nahle Sabag Nasif (2008): AMBIENTES MARINOS. ©Biology Cabinet Organization. New Braunfels, TX. Disponible en línea en http://www.biocab.org/Ambientes_Marinos.html.

- Nomura, M.; Ishitani, M.; Takabe, T.; Rai, A. K. (1995): *Synechococcus* sp. PCC7942 Transformed with *Escherichia coli* bet Genes Produces Glycine Betaine from Choline and Acquires Resistance to Salt Stress. En: *Plant physiology* 107 (3), pág. 703–708.
- Padmanabhan, V.; Dias, D. M.; Newton, R. J. (1997a): Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. En: *Plant molecular biology* 35 (6), pág. 801–807.
- Padmanabhan, V.; Dias, D. M.; Newton, R. J. (1997b): Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. En: *Plant molecular biology* 35 (6), pág. 801–807.
- Park, Jong-A.; Cho, Seok Keun; Kim, Jee Eun; Chung, Hoo Sun; Hong, Jong-Pil; Hwang, Baik et al. (2003): Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the Ca-LEAL1 gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). En: *Plant Science* 165 (3), pág. 471–481. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00165-1.
- Pratt, Darrell; Happold, Frank C. (1960): Requirements For Indole Production By Cells And Extracts Of A Marine Bacterium¹. En: *Journal of Bacteriology* 80 (2), pág. 232–236.
- Reyes, Jose L.; Rodrigo, Maria-J.; Colmenero-Flores, Jose M.; Gil, Jose-V.; Garay-Arroyo, Adriana; Campos, Francisco et al. (2005): Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. En: *Plant Cell Environ* 28 (6), pág. 709–718. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01317.x.
- Rhodes, M. E.; Payne, W. J. (1962): Further observations on effects of cations on enzyme induction in marine bacteria. En: *Antonie van Leeuwenhoek* 28, pág. 302–314.
- Rittmann, Bruce E. (2006): Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. En: *Trends in biotechnology* 24 (6), pág. 261–266. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.04.003.
- Rittmann, Bruce E.; Hausner, Martina; Löffler, Frank; Love, Nancy G.; Muyzer, Gerard; Okabe, Satoshi et al. (2006): A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. En: *Environmental science & technology* 40 (4), pág. 1096–1103.

Robertson, D. E.; Roberts, M. F.; Belay, N.; Stetter, K. O.; Boone, D. R. (1990): Occurrence of beta-glutamate, a novel osmolyte, in marine methanogenic bacteria. En: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (5), pág. 1504–1508.

Rodriguez-Salazar, Julieta; Moreno, Soledad; Espín, Guadalupe (2017): LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii*. En: *Cell stress & chaperones* 22 (3), pág. 397–408. DOI: 10.1007/s12192-017-0781-1.

Ruby, E. G.; Jannasch, H. W. (1982): Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. Strain L-12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. En: *Journal of Bacteriology* 149 (1), pág. 161–165.

Senthil-Kumar, M.; Udayakumar, M. (2006): High-throughput virus-induced gene-silencing approach to assess the functional relevance of a moisture stress-induced cDNA homologous to *lea4*. En: *Journal of experimental botany* 57 (10), pág. 2291–2302. DOI: 10.1093/jxb/erj200.

Shih, Ming-der; Lin, Shu-Chin; Hsieh, Jaw-Shu; Tsou, Chi-Hua; Chow, Teh-Yuan; Lin, Tsai-Piao; Hsing, Yue-le C. (2004): Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. En: *Plant molecular biology* 56 (5), pág. 689–703. DOI: 10.1007/s11103-004-4680-3.

Silhavy, D.; Hutvágner, G.; Barta, E.; Bánfalvi, Z. (1995): Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. En: *Plant molecular biology* 27 (3), pág. 587–595.

Singh, Brajesh Kumar (2010): Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. En: *Trends in biotechnology* 28 (3), pág. 111–116. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.11.006.

Skriver, K.; Mundy, J. (1990): Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. En: *The Plant cell* 2 (6), pág. 503–512. DOI: 10.1105/tpc.2.6.503.

Sogin, Mitchell L.; Morrison, Hilary G.; Huber, Julie A.; Mark Welch, David; Huse, Susan M.; Neal, Phillip R. et al. (2006): Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32), pág. 12115–12120. DOI: 10.1073/pnas.0605127103.

Stacy, R. A.; Aalen, R. B. (1998): Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of

Bacillus subtilis. En: *Planta* 206 (3), pág. 476–478. DOI: 10.1007/s004250050424.

Suttle, Curtis A. (2005): Viruses in the sea. En: *Nature* 437 (7057), pág. 356–361. DOI: 10.1038/nature04160.

Tang, Weng Lin; Zhao, Huimin (2009): Industrial biotechnology: tools and applications. En: *Biotechnology journal* 4 (12), pág. 1725–1739. DOI: 10.1002/biot.200900127.

Tichet, Camille; Nguyen, Hong Khanh; Yaakoubi, Sefia El; Bloch, Jean-François (2010): Commercial product exploitation from marine microbial biodiversity: some legal and IP issues. En: *Microbial biotechnology* 3 (5), pág. 507–513. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00202.x.

Tolleter, Dimitri; Hinch, Dirk K.; Macherel, David (2010): A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. En: *Biochimica et biophysica acta* 1798 (10), pág. 1926–1933. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.06.029.

Tolleter, Dimitri; Jaquinod, Michel; Mangavel, Cécile; Passirani, Catherine; Saulnier, Patrick; Manon, Stephen et al. (2007): Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. En: *The Plant cell* 19 (5), pág. 1580–1589. DOI: 10.1105/tpc.107.050104.

Tunnacliffe, Alan; Wise, Michael J. (2007): The continuing conundrum of the LEA proteins. En: *Die Naturwissenschaften* 94 (10), pág. 791–812. DOI: 10.1007/s00114-007-0254-y.

van Leeuwen, M. R.; Wyatt, T. T.; van Doorn, T. M.; Lugones, L. G.; Wösten, H. A. B.; Dijksterhuis, J. (2016): Hydrophilins in the filamentous fungus *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) have protective activity against several types of microbial water stress. En: *Environmental microbiology reports* 8 (1), pág. 45–52. DOI: 10.1111/1758-2229.12349.

Verstraete, Willy (2007): Microbial ecology and environmental biotechnology. En: *The ISME journal* 1 (1), pág. 4–8. DOI: 10.1038/ismej.2007.7.

Wang, Weiwei; Meng, Bo; Chen, Weihua; Ge, Xiaomeng; Liu, Siqi; Yu, Jun (2007): A proteomic study on postdiapaused embryonic development of brine shrimp (*Artemia franciscana*). En: *Proteomics* 7 (19), pág. 3580–3591. DOI: 10.1002/pmic.200700259.

Wang, Xiaoyu; Zhang, Linsheng; Zhang, Yane; Bai, Zhenqing; Liu, Hao; Zhang, Dapeng (2017): *Triticum aestivum* WRAB18 functions in plastids and confers abiotic stress tolerance when overexpressed in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. En: *PLoS ONE* 12 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0171340

Wise, Michael J.; Tunnacliffe, Alan (2004): POPP the question: what do LEA proteins do? En: *Trends in plant science* 9 (1), pág. 13–17. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.10.012.

Wohlgemuth, Roland (2009): The locks and keys to industrial biotechnology. En: *New biotechnology* 25 (4), pág. 204–213. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.01.002.

Wolkers, W. F.; McCready, S.; Brandt, W. F.; Lindsey, G. G.; Hoekstra, F. A. (2001): Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. En: *Biochimica et biophysica acta* 1544 (1-2), pág. 196–206.

Xiang, Dian-Jun; Man, Li-Li; Zhang, Chun-Lan; Peng-Liu; Li, Zhi-Gang; Zheng, Gen-Chang (2018): A new Em-like protein from *Lactuca sativa*, LsEm1, enhances drought and salt stress tolerance in *Escherichia coli* and rice. En: *Protoplasma* 255 (4), pág. 1089–1106. DOI: 10.1007/s00709-018-1207-3.

Zobell, Claude E.; Morita, Richard Y. (1957): BAROPHILIC BACTERIA IN SOME DEEP SEA SEDIMENTS¹. En: *Journal of Bacteriology* 73 (4), pág. 563–568.

Cuernavaca, Morelos a 2 de mayo de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MARTHA ALEJANDRA CATALÁN JACOBO**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN Y EFECTO PROTECTOR DE PROTEÍNAS LEA DE *Pseudomonas* OBTENIDAS DEL GOLFO DE MÉXICO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES

SECRETARIO: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE

VOCAL: DRA. SELMA JULIETA RODRIGUEZ SALAZAR

SUPLENTE: DRA. MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

SUPLENTE: DRA. LILIANA PARDO LOPEZ



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 DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-05-03 10:31:14 | Firmante

V8bX09749uSs9OyXncVeuX3arlZfVwV5QJjjjTun/XEbjjWIEgJHn/JioolekhmCOMj+i8efEoNGocn6En0RdcQpRQxpadvD4R7ktU70T5pOhx+y3sX6IMxggLh6pv/b1iuRgIN6L4M/9O1AvfITpYitYunrD7/qa4ud7J3JeHjkz+px9b5Tei+OCkj5qZPC7XeCGuTPpsPn03DC+tumwRNLzYRw6S16QNVQOKQmr5dGe6jAYZaDKMk656vg0xBQIFgfVjGjOTKqS5kSMu1WsC7LmqQY55tYXq8oOt8pbtXV8/19sLjXURI/hRvFFS/db+U9tIWwXzjWRh0UTw==

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2022-05-04 11:40:46 | Firmante

Fnc9df5SctKf437hn2XIU2jwvlqgzKYvu8IUqmKBZsvcn+v9lxuo/T2UIQ2oCI+k9CfqHGnXz2s9gXLJtJpHEJTCwAH3xW6eGlx1OrxoGNPH502V5QJ7kTK/9ooo1XIXU01ijNrm09ozK UtyIkjLBERj3Swb5e5jg7G0sP4nq457jltfXVuMqikQAlpTj/Vm75lZmERmPBIBLDC01QnLBHCKGMnzFr3aMVfNkCz7EY1yNgHafPYZACRB4hLzxpFB8nU77Wa988o6QTRHM4Ezh1We/hOmLhOjXyBzF1lc7Z6Skcq+ufguLUkEy3WhS7wrVJNJz2fTMMMA3TUuQ==

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-05-09 11:27:14 | Firmante

NZyec0VUN9vPbVXvc+UE1btlDaUuDtINFYF7+dhKu2hNnBz2jWXVI7/jouuESN/UwXP/acZoDjgo4Z6Z9Js7F/Y9YAgPkLQlqEJSefiplZ5mosipN9A0fee8sLibK0Ksb07LiMCOMx/W1zvqCcZHT5i+N28c4Dz0vLS49h45Yq7K31AVqY15pC0zGu7RV2VGCxPu4o2Qr/iPI8MUE1Pfl+yOYxqeDfAtrC2zvuaaKC/zGYous+9VQy8JsYe+Mf1iqRJJHTZl3HxyJmDhZx0Mx3fzXw2oK80jHsrgCWOOOsVVBS76+Sw5c0/EgrOTkUzXlq8BFxbZVKKY15xeqwcA==

LILIANA PARDO LÓPEZ | Fecha:2022-05-13 04:00:35 | Firmante

m56J/Pkf/xTsrJ05nxyA8RZcv/eSuKfJGR9zOSDNr1f7oGQZzjOEu8PPShPH5BHJdrnj0jX3ecMn2DBDOjGlaop2kVewyhTmfSBCae4mg00+Vpcqs3oiNPUZbT13R1AomdL/xlWULEe2dLk15oa2mqkIlg+ZyCGVikJLS1ggUm0PWLCpuVr+fc8FpyH6HFUF4Di0TfYOPe9Zi6lXY+4PIXMyeNs7uPM1BZSIMUJyh1GGxkCeT+MSvzKbNxxQg27/nla47F7gqy5TG HXMPNXfme7j6HwCOxiwVOzo22Kl5S/3M/bSmEE6tUkztzSa7JuqKY0fYD6WnAVCF+RsQ==

SELMA JULIETA RODRIGUEZ SALAZAR | Fecha:2022-06-22 16:46:10 | Firmante

VzRtQsK+VWvrhxuh1nmu41E1H7bMOuZ2zLmZLUXzgt3atTF+c3cqKF9Ue3Pa3lh3WK62OYJfx4q0tOvlGXBdpt5XulWfl9BNSopB/OIzsS52ukwFyn5yZCEkaUo3XoX7JLQlW+hdTtAYHkIFc/7nk4wbqYn3MqWpi7ppduO8l0jbnmPLFilpKZcs8xpNOKhX2uy6UWsRdrqgR00fE/kJMA1mzmyw5IAKZFWanDBSOhrTs6mw3iAgwNjg1mGc4RDztGGbdaHujWx0wGC8NINIPFQ6B97iaOOWhN5/UKpFxenudhnFra5tZro56KBYz2LxcOnl0ZiaSGtr+qr7X1KQ==

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



E0gocm8aT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VSbzJSuVwDSj1JwetDSMI6MU13H8hwUB>

