



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS VACUNALES DE  
*Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* EN  
MICROALGAS MARINAS**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

LIZETH VALLADARES ROSAS

**CO-DIRECTORES:**

M. en C. MARIO ARCE MONTOYA (+)

DR. CARLOS ELIUD ANGULO VALADEZ

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2021

## DEDICATORIA

A ti, que, te debo todo y aunque ya no estas presente, me sigues guiando.

A ti mamá: Mi guía, mi luz.

Te amo.

Tú luciérnaga

### **A la memoria de dos personas muy importantes:**

Mi madre, que le debo todo lo que soy, que durante décadas me guió y me llenó de amor, siendo la primera maestra de vida y de todo, por guiarme no solo en esta vida si no en el camino de Dios, sé que estarías orgullosa, mucho tiempo lo soñamos, te abrazo y te agradezco todos los días por las enseñanzas tan básicas pero tan grandes a la vez, en algo tan simple como atar mis agujetas, gracias por tanto mamá, te lo debía.

Al Maestro Mario Arce Montoya, que desde el primer día me acogió con mucho respeto, cariño y con muchas ganas de enseñarme en un lugar que me encontraba sola, Gracias Mario por confiar en mi desde el primer día, por tantas enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, esta obra llamada tesis, esta llena de paginas vivas que tienen su nombre y apellido... el suyo, días largos de trabajo pero que están plasmados aquí, en cada página como muestra de su trabajo.

# AGRADECIMIENTOS

A mi primer guía, Gracias Dios, por toda su bondad, tu sabiduría, y el gran amor que me muestra siempre, bendiciéndome y protegiéndome. Por escoger a mis excelentes guías aquí en la tierra; mis padres Beatriz, que desde donde estas me sigues enseñando y Victor, a ti papá, por tu apoyo incondicional, tu amor y su complicidad a través de cada etapa de mi vida.

A mis hermanos; Jeciel, Uriel y mi pequeño Dani, los cuales han sido ese motivo por el cual cuando me sentía sin fuerzas, eran y siguen siendo las personitas que me impulsan para ser el mejor ejemplo para ustedes y hacer las cosas mejor, por enorgullecerse de mí, por hacerme parte de sus decisiones y parte de sus logros. Dios no me pudo haber dado mejores hermanos. mi cuñada Yazmin, por tanto, cariño, por ser mi familia.

Gracias a mi familia que siempre estuvieron ahí elevando oraciones por mí y deseándome lo mejor, apoyándome moral y económicamente: A mi mamá Irma gracias por sus oraciones y su apoyo abue, a mi tía Almita por ser parte de lo que soy, por cuidarme, preocuparse por mí. Muchas gracias.

Al centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por brindarme las facilidades de llevar a cabo este proyecto y a CONACYT por la beca brindada.

A mis Co-directores de tesis, el M. en C. Mario Arce Montoya por su apoyo, asesoría, paciencia, regaños y conocimientos brindados, donde este Mario, gracias!; y al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez quien me dio la oportunidad y su confianza al aceptarme en el grupo y desde ese momento apoyarme, asesorarme y dirigirme en este proyecto, por transmitirme todos sus conocimientos y por estar siempre al pendiente. Al M. en C. Julio Antonio Hernández González del Lab. De Biología Molecular del CIBNOR por ayudarme brindándome sus conocimientos y por su amistad durante mi estancia. A la Dra. Martha Reyes Becerril del Lab. Patogénesis Microbiana del CIBNOR por el apoyo brindado. A mis sinodales la Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda, y al M. en C. Roberto Trejo Albarrán, los cuales me brindaron sus conocimientos para poder sacar un buen trabajo exigiéndome y apoyándome.

A mis compañeros y amigos de la Paz, por los buenos momentos que compartimos juntos, las salidas, Lizita, Eliseo, Julio, David, Alberto, Ricardo y todos los que fueron parte de mi experiencia, y a gran amigo Armando Burgos quien fue el que me apoyo desde el primer momento en que me imagine realizar la tesis en La Paz, Gracias amigo. A mis amigas Nalú, Betsa, Leslie y Magali, por enseñarme a quererlas como hermanas y porque Dios las puso en mi camino. Gracias a todos los que directa o indirectamente hicieron de este trabajo y mi estancia en la paz una experiencia inolvidable.

A mi amigo entrañable, el M. en C. Esaú Leyva, que sin duda durante años ahí has estado y sé que ahí estarás.

Y ahora sin duda a mi motor de vida, que por ella se que puedo todo, mi luz, mi orgullo y mi razón, gracias mi pequeña Frida, porque, aunque aún no estabas cuando realice este proyecto, por ti lo finalice.

¡Gracias Dios, Gracias universo, Gracias Vida, Gracias!

“Para las personas creyentes,  
Dios está al principio...  
para los científicos,  
está al final  
de todas sus reflexiones”

Max Planc



El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C, (CIBNOR) en los Laboratorios de Biotecnología Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y el Laboratorio de Patogénesis Microbiana, las microalgas utilizadas en este proyecto fueron donadas por la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS).

Esta investigación fue financiada con el proyecto: Identificación y evaluación de vacunas comestibles en alfalfa para prevenir la Paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subespecie. *paratuberculosis*) de rumiantes domésticos de México. SEP-CONACYT (No. 151818).

## RESUMEN

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* es el agente causal de la Paratuberculosis o Enfermedad de Johne, la cual es una infección intestinal crónica de rumiantes domésticos y silvestres. La mayoría de las vacunas contra esta enfermedad están hechas a partir de bacterias vivas atenuadas, pero recientemente se han desarrollado vacunas recombinantes, y existen diferentes sistemas para la producción de estas vacunas tales como las microalgas. Estos sistemas presentan varias ventajas sobre otros sistemas, tales como el bajo costo, el rápido escalado, el confinamiento y algunas modificaciones post-traduccionales. La transformación genética de microalgas se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos de transferencia de ADN tales como la electroporación y la transformación mediada por *A. tumefaciens*. De este modo, el objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad de producción de antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en un sistema de producción consistente en líneas transgénicas de microalgas marinas transformadas de manera estable. Para lo anterior se estableció el cultivo de las microalgas marinas *Schizochytrium* sp (Clorophyta) y *Navicula* sp (Bacilliarophyta) en medio F2 (Guillard). Se analizó la cinética de crecimiento y se determinó la concentración de higromicina (Hyg) como antibiótico de selección de transformantes en el medio NB (Nutrient Broth). Se evaluaron dos métodos de transformación: electroporación y la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*. Utilizando las construcciones genéticas que codifican para los antígenos Ag85b (MAP1609c) y MAP0586c de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en el vector pMDC32. Se analizó la integración de los genes al genoma de las microalgas mediante PCR punto final y se estandarizó un protocolo de extracción de proteína de las líneas confirmadas de *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp para la cuantificación de proteína por el método de Bradford. Los resultados en la cinética de crecimiento indicaron que la fase estacionaria se alcanza dentro de las 48 h a 72 h para las dos microalgas *Schizochytrium* sp. y *Navicula* sp. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria para la selección de microalgas transgénicas fue de 200 mg/L de higromicina en medio NB. Mediante electroporación se obtuvieron dos líneas transgénicas de *Schizochytrium* sp. y 1 línea transgénica de *Navicula* sp. con la construcción que codifica para el gen MAP0586c, confirmado en medio de selección con higromicina. Por otra parte, mediante *A. tumefaciens* se obtuvieron nueve líneas transgénicas únicamente de *Schizochytrium* sp., de las cuales 5 líneas fueron de la construcción con el gen MAP1609c y 4 líneas con el gen MAP0586c confirmadas en medio de selección. Por PCR se confirmó la presencia del transgén MAP1609c (~1000 pb) en *Schizochytrium* sp. transformada mediante *A. tumefaciens*.

Se determinó que de 100 ml de cultivo algal con un peso fresco aproximado de 100 a 150 µg, se obtuvo una concentración aproximada de 1 µg/µL de proteína total de *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp. En conclusión, las microalgas *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp representan un buen sistema de producción en cuanto al rápido crecimiento del cultivo celular y la transformación mediada por *A. tumefaciens* en este trabajo representa un método más eficiente para la producción de mayor cantidad líneas transformadas de manera estable debido a la inserción más específica del fragmento de ADN a introducir en la microalga.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 GÉNERO <i>Mycobacterium</i> .....	11
1.2 PARATUBERCULOSIS .....	12
1.2.1 Historia.....	12
1.2.2 <i>Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (MAP)</i> .....	12
1.2.3 Genoma de <i>MAP</i> .....	13
1.2.4 Infección y patogenia; Entrada de <i>MAP</i> en el hospedador.....	13
1.2.5 Hospedadores susceptibles.....	14
1.2.6 Transmisión.....	14
1.2.7 Respuesta inmune del hospedador .....	15
1.2.8 Cuadro clínico.....	15
1.2.9 Distribución y prevalencia de la paratuberculosis .....	15
1.2.10 Impacto Económico de la paratuberculosis.....	17
1.2.11 Tratamiento y vacunación.....	17
1.3 VACUNAS Y SU SISTEMA DE PRODUCCIÓN.....	18
1.4 MICROALGAS.....	20
1.4.1 <i>Shizochytrium sp. (clorophyta)</i> .....	21
1.4.2 <i>Navicula sp (Bacillariophyta)</i> .....	22
1.4.3 Transformación genética en microalgas .....	23
1.5 VACUNAS EN MICROALGAS .....	25
2. ANTECEDENTES .....	28
3.- JUSTIFICACIÓN .....	32
4.-HIPÓTESIS .....	32
5.- OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo General .....	33
5.2 Objetivos particulares: .....	33
6.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
6.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS .....	35
6.1.1 Cepas y cultivo.....	35



6.1.2	Re-activación de cepas de microalgas marinas; <i>Schizochytrium sp</i> Y <i>Navicula sp</i> .....	35
6.1.3	Conteo celular .....	36
6.1.4	Análisis de cinética de crecimiento.....	37
6.1.5	Antibiograma; resistencia a antibiótico de microalgas transformadas.....	37
6.2	TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	38
6.2.1	Extracción de ADN plasmídico por el método de Lisis Alcalina (Modificado de Sambrook y Russell, 2001) .....	38
6.2.2	Extracción de ADN genómico (ADNg) de microalgas marinas cepas silvestre por método (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) CTAB.....	39
6.3	TRANSFORMACIÓN DE MICROALGAS MARINAS .....	40
6.3.1	Selección del protocolo de transformación de microalgas.....	40
6.4	MONTAJE DEL PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE MICROALGAS .....	40
6.4.1	Transformación por Electroporación .....	40
6.4.2	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . .....	42
6.4.3	Selección de transformantes de <i>Schizochytrium sp</i> Y <i>Navicula sp</i> .....	44
6.4.4	Confirmación y verificación de líneas transformadas por PCR (Reacción En Cadena De La Polimerasa) punto final.....	45
6.6	SELECCIÓN DE MÉTODO Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE LAS MICROALGAS <i>Schizochytrium sp</i> . Y <i>Navicula sp</i> .....	46
6.7	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD 1976).....	47
6.7.1	Preparación de la curva estándar con la proteína BSA (Albumina Sérica Bovina) .....	47
6.7.2	Cuantificación de proteína total de microalgas transformadas .....	48
7.-	RESULTADOS.....	49
7.1	Establecimiento del cultivo de microalgas marinas .....	49
7.3	SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES POR ELECTROPORACIÓN Y <i>A. tumefaciens</i> .....	55
7.3.1	Transformantes por electroporación. ....	55
7.3.2	Transformación de microalgas y obtención de Transformantes mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	56
7.3.3	Verificación de transformantes de microalgas con los genes MAP1609c y MAP0586c.....	58
7.4	Extracción y cuantificación de proteína total de <i>Schizochytrium sp</i> y <i>Navicula sp</i> .....	62
8.	DISCUSIÓN .....	65
9.	CONCLUSIONES.....	69
10.	PERSPECTIVAS:.....	70

11.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:.....	71
ANEXOS .....	78
ANEXO I. Vector de clonación pMDC32 .....	78
ANEXO II. Secuencias de Oligonucléotidos.....	78
ANEXO III. Secuencias de los genes utilizados .....	79
ANEXO IV Protocolos deExtracción .....	80
ANEXO V. métodos de cuantificación .....	81
ANEXO VI Cuantificación de Proteínas.....	78

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GÉNERO *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* son bacterias Gram positivas que está integrado por bacilos largos de 3.0 a 5.0µm de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes debido a una membrana constituida por ácidos micólicos de 60-90 carbonos que impiden la eliminación de los colorantes una vez absorbidos (Olsen *et al.*, 2004). Pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otro lento. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN es de 62 a 70 moles % (Levy-Frebault y Portaels, 1992). El género comprende 50 especies, entre ellas patógenos primarios, oportunistas y saprofitas. Perteneciente al Orden *Actinomycetales*.

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil de *Mycobacterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales, adaptándose fácilmente al crecimiento en sustratos muy simples, utilizando amoníaco o aminoácidos como fuentes de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales (Timpe y Runyon, 1950).

### 1.1.1 Complejo *Mycobacterium avium*

*Mycobacterium avium* (MAC) corresponde a un grupo de bacterias genéticamente relacionadas, distinguiéndose por crecer en biotopos naturales sin perder su patogenicidad, de lento crecimiento con intervalos de temperaturas de 20 a 37°C, un pH de 4.0 a 7.0 (Biet *et al.*, 2005) y pertenecientes al género *Mycobacterium*. Este complejo incluye 3 subespecies: *Mycobacterium avium subsp avium* (MAA), *Mycobacterium avium subsp hominis* (MAH) y *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP).

Anteriormente MAC también incluía *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI) por lo que también se le conocía a este complejo como *M. avium-intracelullare*, el cual ahora se considera perteneciente a un grupo distinto (Biet *et al.*, 2005).

## **1.2 PARATUBERCULOSIS**

### **1.2.1 Historia**

En 1826, d'Aroval describió una forma especial de enteritis en ganado vacuno que cursaba con diarrea. Posteriormente en 1881 Hansen y Nielsen observaron esta forma característica de enteritis en la mucosa intestinal de ganado vacuno (Chiodini *et al.*, 1984) pero no fue hasta 1895 cuando Johne y Frothingham (Johne y Frothingham, 1895) describieron la enfermedad como una enteritis crónica que afectaba al ganado vacuno y demostraron la presencia de bacilos en los tejidos afectados. En ese momento se pensaba que las formas bacilares observadas en los tejidos de los animales infectados eran formas modificadas de *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium avium* y por lo tanto se trataba de una forma intestinal de tuberculosis. Finalmente, debido a la gran relación genética y antigénica que comparte con *M. avium* en 1990 se la reclasificó como una subespecie de *M. avium*, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Thorel *et al.*, 1990).

### **1.2.2 *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP)**

El agente etiológico de la paratuberculosis, es un bacilo Gram positivo, aerobio, de un tamaño aproximado de 1.0 µm de longitud por 0.5 µm de ancho. Debido a que no se evidencia por tinciones comunes, se puede observar por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Chiodini, 1986) y es una bacteria de crecimiento lento, difícil de cultivar y que requiere un aporte externo de micobactina (Cocito *et al.*, 1994).

Requiere medios de cultivo especiales y para crecer en laboratorio se necesita de 16 semanas aproximadamente aunque se han desarrollado nuevos medios de cultivo para que el tiempo se reduzca a un aproximado de 2 a 8 semanas como Bactec, MGIT y Trek ESP, los cuales se suplementan con Micobactina.

### 1.2.3 Genoma de *MAP*

La publicación del genoma de *MAP* cepa K-10 con número de acceso GENBANK: AE016958 fue en el 2005 (Hansen, 2009) donde las 4, 829,781 pb de la secuencia se determinaron mediante la preparación y secuenciación de una biblioteca pequeña, una inserción aleatoria y por los productos de PCR dando un total de 66,129 secuencias únicas (Li *et al.*, 2005). Actualmente se conocen 4350 ORF's (Li *et al.*, 2005), si se excluyen los 45 genes tRNA y una secuencia de rRNA que no codifican proteínas se tiene un poco más de 4,300 secuencias que codifican. Cho *et al.* (2006) definieron algunos de los antígenos presentes en el filtrado del cultivo y con éxito identificaron 14 proteínas incluyendo MAP1569, MAP3527 y MAP3531c (antígeno 85c).

**Tabla1.** Resumen de las características del genoma de *MAP* en comparación con otras especies de micobacterias. (Li *et al.*, 2005).

Característica	<i>Map</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>
Tamaño del genoma	4.829.781	5.475.738	4.411.532	4.345.492	3.268.203	6.988.209
Contenido G+C (%)	69,30	68,99	65,61	65,63	57,79	67,40
Genes que codifican proteínas (%)	91,30	NA	90,80	90,59	49,50	92,42
Marcos de lectura abiertos (ORFs)	4350	NA	3959	3953	1604	6897
Densidad genét. (pb/gen)	1112	NA	1114	1099	2037	1013
Long. media gen (pb)	1015	NA	1012	995	1011	936
ARNt	45	45	45	45	45	47
Operones ARNr	1	1	1	1	1	2

### 1.2.4 Infección y patogenia; Entrada de *MAP* en el hospedador

Actualmente se considera que la infección paratuberculosa comienza con la invasión del tejido linfoide intestinal. La puerta de entrada de *MAP* en el tejido linfoide intestinal son las células epiteliales M que recubren la cúpula de los folículos linfoides de las placas de Peyer (Momotani *et al.*, 1988). Una vez que la micobacterias penetran en las células M, son transportadas en vacuolas a los macrófagos (célula diana) subepiteliales e intraepiteliales de la lámina propia adyacente a la placa de Peyer, donde se localizan en el interior de fagosomas (Clarke, 1997). Uno de los puntos cruciales para el

establecimiento definitivo y progresión de la enfermedad es la persistencia de *MAP* en este tipo celular (Valentin-Weigand y Goethe, 1999).

### **1.2.5 Hospedadores susceptibles**

Esta subespecie del complejo *Mycobacterium* es un patógeno obligado (Merkal, 1984), considerándose a los rumiantes domésticos (ganado bovino, caprino y ovino) los hospedadores por excelencia. Cuando se determinó la importancia de esta enfermedad en los rumiantes domésticos se aumentaron los estudios a rumiantes salvajes (ciervo, gamo, alce, llama, muflón, etc.) poniéndose de manifiesto su importancia principalmente como reservorios de la enfermedad para los animales domésticos y silvestres (Saito *et al.*, 1989). Los caballos y perros se pueden infectar de forma experimental. Generalmente, la infección se produce en los primeros años de vida, y muchos animales infectados se convierten en portadores crónicos. Además, la paratuberculosis provoca pérdidas en la producción láctea de forma asintomática. Se calcula que los portadores asintomáticos producen 15 a 16% menos de leche, con pérdidas aproximadas de 590 a 1270 kg de leche por lactancia. Recientemente, se ha aislado a esta micobacteria de muchas especies no rumiantes, incluyendo mamíferos y aves. *MAP* también ha estado implicada como posible causa, de la enfermedad de Crohn en los humanos debido a las características que se comparten en el cuadro clínico, aunque esta conexión es aún controversial y no ha sido probada (Cirone *et al.*, 2007).

### **1.2.6 Transmisión**

Debido a que la entrada de esta micobacteria en el organismo se produce en el tejido linfóide intestinal, en los rumiantes, la paratuberculosis se transmite principalmente por la vía fecal-oral. Los animales infectados pueden eliminar grandes cantidades de organismos en las heces, que puede comenzar antes de la aparición de los signos clínicos (Rosenberger *et al.*, 1992; Collins, 1994). Los portadores asintomáticos pueden eliminar la bacteria de forma intermitente. La transmisión se puede producir por fómites, y los insectos pueden actuar como vectores mecánicos.

Los animales jóvenes son los más susceptibles a la infección. Habitualmente, los animales se infectan cuando se amamantan de una ubre sucia con heces o cuando están alojados en corrales contaminados. Poco se conoce sobre la transmisión de *MAP* en

especies no rumiantes, pero la propagación fecal-oral probablemente sea la más importante.

### **1.2.7 Respuesta inmune del hospedador**

Una vez que *MAP* está en el interior de los macrófagos se desencadenan una serie de procesos inmunológicos regulados por las células del sistema inmune mediante la producción de distintas citocinas. Las respuestas del hospedador están estrechamente relacionadas con el estadio de la enfermedad y la lesión histológica (Burrells *et al.*, 1998).

### **1.2.8 Cuadro clínico**

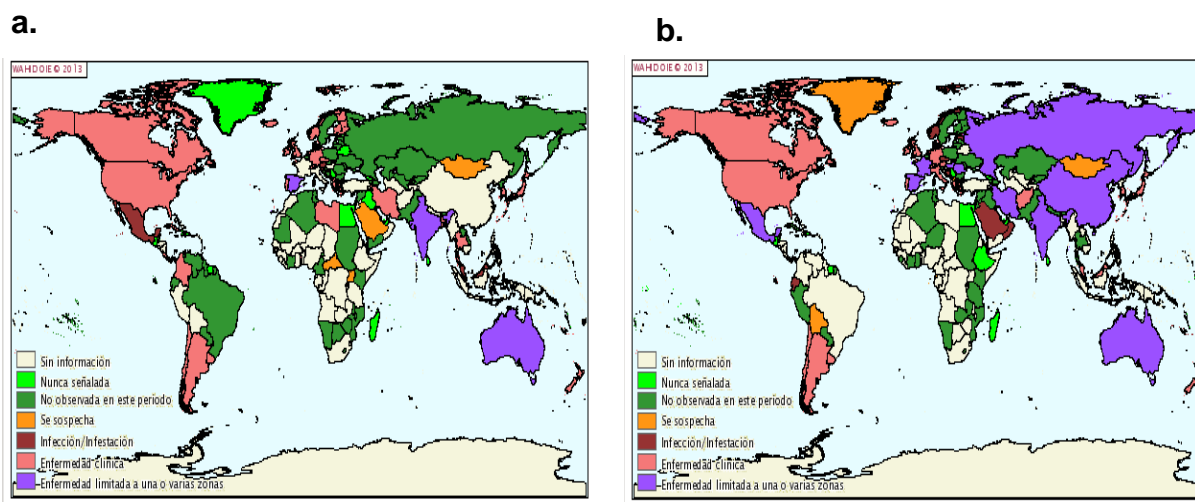
El periodo de incubación es variable pero generalmente en ganado vacuno la aparición de sintomatología no se produce antes de los dos años de edad (Whitlock y Buergelt, 1996). En ganado vacuno, además de una pérdida crónica y progresiva de peso se caracteriza por la presencia de una diarrea crónica intermitente que no responde eficazmente al tratamiento. A pesar de que el apetito y el nivel de ingesta no se ven afectados, se produce una pérdida de peso debido principalmente a una malabsorción o pérdida proteica (Brown, 2005) y a las altas concentraciones del TNF- $\alpha$  que provoca un catabolismo tisular (Beutler y Cerami, 1989).

En las fases avanzadas de la enfermedad se presenta un edema intermandibular, emaciación, atrofia muscular, debilitación y muerte. En ganado vacuno de alta producción se observa también una disminución en la producción láctea así como alteraciones de la fertilidad. Hay que tener en cuenta que existen animales infectados de forma subclínica que no desarrollan la enfermedad clínica como tal (Sherman, 1985). En los pequeños rumiantes (ovejas y cabras) solo un 10-20% de los casos clínicos presenta diarrea siendo la pérdida crónica de peso el síntoma característico (Stehman, 1996). En estos casos, si no se lleva a cabo una identificación exhaustiva esta sintomatología se asocia a enfermedades parasitarias.

### **1.2.9 Distribución y prevalencia de la paratuberculosis**

Desde la primera descripción de un caso de paratuberculosis en 1895 ésta se ha extendido afectando a un elevado número de países, sin embargo la dificultad en su diagnóstico hace que en ocasiones la estimación de la prevalencia real sea difícil

(Chiodini *et al.*, 1984). A esto hay que añadir que a pesar de que está incluida dentro de la lista B de enfermedades de la Oficina Internacional de Epizootias la notificación de casos en los distintos países es variable, lo que en muchos casos dificulta conocer su distribución mundial). A pesar de las adversidades esta enfermedad se distribuye a nivel mundial y se reporta en todos los continentes aunque con poca información disponible (Kennedy *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Mapa de la distribución de paratuberculosis en el mundo, **a.** año 2007, **b.** año 2012. Tomada de base de datos del sistema mundial de información zoonosaria (Por sus siglas en inglés; WAHID).

En México esta enfermedad se encuentra dentro del grupo tres que está constituido por aquellas enfermedades que son consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde una perspectiva epidemiológica, económica y de salud pública y de comercio nacional e internacional y la cual es de notificación mensual obligatoria, de acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Presentándose en al menos 22 Estados de la República Mexicana y en gran parte de los casos con prevalencias mayores al 5% (SAGARPA, 2005).



### 1.2.10 Impacto Económico de la paratuberculosis

Para estimar las pérdidas económicas de esta enfermedad se consideran tanto las pérdidas directas como indirectas, donde las pérdidas directas son el aumento de la mortalidad y el costo del sacrificio de los animales infectados, así como la disminución de producto lácteo. Las pérdidas indirectas se le atribuyen a los costos de remplazo, costos de métodos de control pérdida de animales de gran valor genético y costos de veterinario, entre otros (Valentin-Weigand, 2009).

En México se cuenta con información que indica que esta enfermedad es de alta relevancia. En un estudio realizado en 2005, sobre el impacto económico de la paratuberculosis en bovinos lecheros del centro del país, se calculó que este ascendía a \$10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87% en una población de casi 30,000 bovinos, donde el mayor impacto se asoció a la pérdida en la producción láctea (SAGARPA, 2005).

**Tabla 3.** Pérdidas económicas anuales asociadas a paratuberculosis en bovinos lecheros con diversas seroprevalencias. **R**, Seroprevalencia real del estudio Estimando éstas seroprevalencias en una población de 27,700 bovinos. Tomado de: Gilberto Chávez Gris

Seroprevalencia % (ELISA)	No. de bovinos seropositivos	Pérdidas económicas \$/año
8.87% (R)	2,457	\$25,410,000.00
3.0%*	831	\$ 8,456,000.00
7.0%*	1,939	\$19,730,000.00
23.0%	6,372	\$64,830,000.00

### 1.2.11 Tratamiento y vacunación

Centrándose específicamente en el control de la paratuberculosis y dadas las bajas posibilidades de erradicar por completo, parece que los objetivos de control de paratuberculosis deben centrarse más en la prevención, curación de los efectos

patológicos que deben producir un buen beneficio y el costo de equilibrio: la vacuna cumple con eso.

Varios estudios de vacunación han demostrado que la vacunación de terneros en el primer mes de vida con una vacuna de células enteras (inactivada) impide el desarrollo de la etapa clínica de la enfermedad, y por lo tanto reduce el daño económico (Koehler *et al.*, 2001). Sin embargo, este tipo de la vacunación no da lugar a la eliminación de micobacterias, ya que se detectaron animales con infección subclínica en aproximadamente la misma frecuencia en rebaños vacunados y no vacunados. Además esta estrategia de vacunación interfiere con diagnósticos de la tuberculosis bovina. Como consecuencia de ello, el uso de vacunas de células enteras inactivadas en el ganado vacuno es limitado o incluso prohibido (por ejemplo, en los Países Bajos). Finalmente, la vacuna de células enteras inactivadas causa daño sustancial del tejido en el sitio de la vacunación, y el mal uso de la vacuna en el ganado vacuno, así como auto-inoculación accidental, por ejemplo, por los veterinarios, pueden tener efectos secundarios graves (Wentink *et al.*, 1994). Desde los puntos de la salud humana de vista epidemiológica, la salud animal y, estos serios inconvenientes actualmente limitan el uso de la vacunación de ganado en todo el mundo, y constituyen un problema importante en la erradicación de la paratuberculosis. La vacunación con uno o más antígenos bien definidos podría evitar algunas de las desventajas de la vacuna de células enteras inactivadas, es decir, podría prevenir la interferencia con los enfoques de diagnóstico existentes para la paratuberculosis y la tuberculosis, especialmente cuando se combina con un sistema de diagnóstico que carece de los componentes de la vacuna. Además, omitiendo el uso de células micobacterianas enteras en adyuvante de aceite podría reducir el daño tisular extenso.

### **1.3 VACUNAS Y SU SISTEMA DE PRODUCCIÓN**

Las vacunas son definidas como un producto biológico utilizado para conseguir una inmunización activa artificial, estas producen una memoria inmunológica similar a la enfermedad adquirida en forma natural (Abbas *et al.*, 2003).

Hasta la fecha existe una gran variedad de sistemas de producción para vacunas como lo son las levaduras, bacterias, animales y plantas. Todos los sistemas de producción tienen ventajas y desventajas como costos de producción, la dificultad para su elaboración, la glicosilación, el almacenamiento de estas, el escalado y los riesgos a la salud que conlleva cada sistema.

**TABLA 4.** Comparación de sistemas de producción de vacunas (Walker *et al.*, 2005).

Sistema	Costos de producción	Tiempo/Dificultad	Escalado	Glicosilación	Almacenamiento	Riesgo de contaminación
<b>Bacteria</b>	Bajo	Bajo	Alto	No hay	-20 °C	Endotoxinas
<b>Levadura</b>	Medio	Medio	Alto	Con diferencias	-20 °C	Bajo
<b>Cultivo de células de mamíferos</b>	Alto	Alto	Muy bajo	Correcta	N2 liquido	Virus y oncogenes
<b>Animales transgénicos</b>	Alto	Alto	Bajo	Correcta	Difícil	Virus y Oncogenes
<b>Cultivo de tejidos vegetales</b>	Medio	Medio	Medio	Con menores diferencias	-20 °C	Bajo
<b>Plantas transgénicas</b>	Bajo	Alto	Muy alto	Con menores diferencias	Temperatura ambiente	Bajo
<b>Microalgas</b>	Bajo	Bajo	Muy alto	Con menores diferencias	Al alcance	Bajo

Las algas han demostrado que son un sistema idóneo para la síntesis de vacunas. Algunas microalgas como *Dunaliella* se utilizan de otro modo para la nutrición, donde no hay necesidad para la purificación del antígeno, por lo que las algas podrían ser utilizadas para producir una vacuna. Las microalgas también han demostrado ser útiles para expresar proteínas insecticidas. El uso de tales algas transgénicas puede ser una alternativa mucho más económica, sostenible y de fácil manejo. La utilización de algas como un sistema de expresión no se limita a anticuerpos, antígenos, o proteínas insecticidas (Franklin y Mayfield 2004). Además, la expresión de proteínas que dañan las

células de mamífero en principio, o al menos en concentraciones más altas, debería ser factible en el sistema de algas verde muy alejadas. Entre otros puntos, esta característica hace a las microalgas un sistema atractivo para la expresión extracelular de proteínas recombinantes. En los últimos años se han desarrollado nuevas investigaciones para el aprovechamiento biotecnológico de microalgas evaluando varias especies con el fin de encontrar los componentes orgánicos eficaces como metabolitos secundarios (Kopecky *et al.*, 2000; Lubián *et al.*, 2000), biomoléculas antifúngicas o antibacterianos (Piccardi *et al.*, 2000), toxinas de algas (Piccardi *et al.*, 2000), o ingredientes farmacéuticos activos como fármacos candidatos (Skulberg, 2000).

#### **1.4 MICROALGAS**

Las microalgas comprenden un amplísimo y heterogéneo grupo de microorganismos eucariotas y procariotas, unicelulares y coloniales, que comparten la característica común de ser fotoautótrofos. Su elevada capacidad de adaptación se refleja en su distribución ecológica, encontrándolas prácticamente en cualquier hábitat (Darley, 1987). Estas miden desde 1  $\mu\text{m}$  hasta varios cm, son excelentes fijadores de  $\text{CO}_2$ . Los constituyentes químicos de una célula de microalga representan en su mayoría las proteínas, carbohidratos y lípidos que constituyen del 90 al 95% de su peso seco (Becker, 1986). La composición química y la velocidad relativa de crecimiento de las poblaciones de microalgas son muy variables debido a que son afectados por diversos factores como la manipulación de las condiciones de cultivo, etapa de crecimiento al momento de la cosecha, el pH y concentración de nutrientes, el fotoperiodo, la intensidad de luz y la temperatura (Brown *et al.*, 1989). La temperatura es otro factor fundamental que está relacionada con la luz, así a grandes temperaturas las microalgas toleran intensidades de luz mucho más altas que a temperaturas menores (Darley, 1987), el pH también juega un papel muy importante ya que las membranas plasmáticas de las células microalgales no son libremente permeables a los iones de hidrógeno e hidroxilo, mostrando una dependencia respecto al pH del medio de cultivo, que es óptimo entre 7 y 8 (Avron, 1992). En el caso de las microalgas marinas, éstas muestran tolerancia a la sal que va desde concentraciones milimolares hasta soluciones saturadas variando entre especies, dividiéndose entre halotolerantes y halofílicas, en respuesta a una dilución menos

severa, los solutos orgánicos son metabolizados hasta que se alcance el adecuado equilibrio osmótico (Avron, 1992).

El cultivo de algas es una forma de acuicultura que se ocupa del cultivo de especies de algas, mayoritariamente, microalgas, organismos fotosintéticos autótrofos que forman parte del fitoplancton también denominadas micrófitas. El combustible de algas es un biocombustible de tercera generación, fabricado a partir de los productos oleaginosos de microalgas; por esa razón, la investigación sobre algas para la producción masiva de aceite se centra principalmente sobre esas especies. Sus principales representantes son las diatomeas y las cianobacterias.

#### **1.4.1 *Shizochytrium sp. (clorophyta)***

La microalga *Schizochytrium sp.* pertenece al reino *Chromista* y se encuentra generalmente en ecosistemas marinos. Se caracteriza por ser saprotrófica. También se les ha clasificado dentro de los Stramenophylos, un reino constituido por diatomeas, algas fotosintéticas doradas y otras algas (Cavalier-Smith *et al.*, 1994). Los organismos de este grupo han atraído la atención recientemente debido a su capacidad para producir grandes cantidades de ácidos grasos altamente insaturados conocidos como PUFA's nutricionalmente importantes y en su gran porcentaje del de aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico (DHA n-3). *Schizochytrium sp.* es una microalga marina que puede producir grandes cantidades de aceite (hasta 55% del peso seco de células) en el que el DHA puede comprender tanto como el 45% de los ácidos grasos totales (Cheng *et al.*, 2011). Este aceite comercial se produce para utilizarse en algunas líneas comerciales como en los alimentos, piensos y suplementos nutricionales (Fan *et al.*, 2007).

La microalga *Schizochytrium sp.* es altamente eficiente en el consumo de los nutrientes en presencia de niveles bajos de oxígeno disuelto, con una tasa de 9 duplicaciones por día, que se traduce en más de 200 g/L de biomasa seca acumulada en menos de 4 días (Barclay *et al.*, 2005). Caracterizada por zoosporas bi-flageladas, y por extensiones finas no retráctiles, de tipo filopodios del citoplasma, estas extensiones complejas forman estructuras que están asociados con una tipo red de ectoplásmico compuesto en gran parte de polisacárido exportado. Las células crecen y se dividen para formar un grupo de células cada una de las cuales pueden llegar a ser un soro que producen flagelados

(zoosporas). *Schizochytrium* fue descrito por Goldstein y Belsky en 1964 en hábitats marinos costeros.

#### **1.4.2 *Navicula* sp (Bacillariophyta)**

Son organismos unicelulares que pertenecen al filo de las algas pardodoradas; cuyo nombre científico es Bacillariophyta y se relaciona filogenéticamente con el filo Chrysophita y otros del conjunto Chromista. Por sus características y requerimientos se las consideran las únicas algas verdaderas, ya que no presentan ninguna estructura propia del Reino Animal. Posee el mayor número de especies; aproximadamente unas 500,000; teniendo una amplia distribución mundial y constituyendo el grupo más importante del fitoplancton debido a que contribuyen con cerca del 90% de la productividad de los sistemas. (Kröger, *et al.*, 1999). La mayoría de las diatomeas son unicelulares, aunque pueden existir como colonias en forma de filamentos o cintas (por ejemplo, *Fragillaria*); las diatomeas son los principales productores en la cadena alimentaria; su rasgo característico es que están encerrados dentro de una pared de célula única hecha de sílice (dióxido de silicio hidratado) llamado frústule. A pesar de ser grandes productoras de aceites, el frústule, más bien, la sílice del que está hecho, es un serio inconveniente para una producción industrial de biocombustible, razón por la cual, las diatomeas no son utilizadas para ese bioproceso industrial.

En este caso, las diferentes especies presentan distintas estrategias o formas de unión entre las células. Existen diversas familias dentro de las diatomeas, en donde se encuentra *Navícula* sp.

Estos organismos fotosintetizadores poseen un color dorado oliváceo debido a su juego de pigmentos fotosintéticos, que como en otros chromistas incluye clorofila c1 y c2, así como carotenoides y pigmentos auxiliares. Suelen contener gotas de lípidos que, además de servir de reserva, contribuyen a su flotabilidad (Miao *et al.*, 2006).

Diatomeas marinas producen diversos tipos de aceites naturales son temas muy interesantes de estudio. Varios tipos de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados en la forma de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos se encuentran en las diatomeas (Popovich, 2012).

### 1.4.3 Transformación genética en microalgas

El desarrollo de métodos para la transformación de microalgas ha avanzado significativamente en la última década. Gran parte del progreso se ha debido al trabajo pionero de la transformación del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Lumbreras y Purton 1998; Fuhrmann, 2002). El desarrollo de las herramientas moleculares y la metodología para la introducción de nuevos genes en el genoma ya sea nuclear o de cloroplasto de *C. reinhardtii* ha actuado como catalizador de desarrollos similares en otras especies de algas. Aunque la transformación es posible actualmente para sólo un puñado de especies, incluyendo *C. reinhardtii*, *Volvox carteri*, varias especies de *Chlorella* y la diatomea *Tricornutum Phaeodactylum* han sido transformadas exitosamente para diferentes líneas de investigación y de comercialización.

**TABLA 3.** Especies de microalgas transformadas y el método empleado (Ikarán, 2011).

Especie	Método	Genoma	Transf.	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Kindle <i>et al.</i> , 1989
	Bombardeo	Cloroplast	Pasajera	Boynton, <i>et al.</i> , 1988
	Glass beads	Nuclear		Kindle, 1990
	Whiskers de carburo silícico	Nuclear		Dunahay <i>et al.</i> , 1993
	Electroporación	Nuclear		Shimogawara <i>et al.</i> , 1998
	Agrobacterium	Nuclear	Estable	Kumar <i>et al.</i> , 2004
<i>Volvox carteri</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Schiedlmeier <i>et al.</i> , 1994
<i>Dunaliella salina</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Lü <i>et al.</i> , 2005; Tan <i>et al.</i> , 2005
	Electroporación	Nuclear	Estable	Sun <i>et al.</i> , 2005;
<i>Dunaliella viridis</i>	Electroporación	Nuclear	Estable	Sun <i>et al.</i> , 2006
<i>Haematococcus phuviales</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Steinbrenner & Sandmann, 2006
	Agrobacterium	Nuclear	Estable	Kathiresan <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	Dawson <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorella kessleri</i>	Bombardeo	Nuclear	Estable	El-Sheekh., 1999
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Bombardeo	Nuclear	Pasajera	Jarvis & Brown, 1991
<i>Chlorella saccharophila</i>	Electroporación	Nuclear	Pasajera	Maruyama <i>et al.</i> , 1994
<i>Chlorella vulgaris</i>	Electroporación	Nuclear	Pasajera	Chow & Tung, 1999

Los procesos biotecnológicos para la obtención de microalgas transgénicas aún están en sus etapas iniciales, pero el creciente interés de las aplicaciones industriales que esta tecnología ha despertado ha permitido un rápido desarrollo. Así se han establecido bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST's), obteniendo las secuencias genómicas completas de varias especies de microalgas y se han desarrollado con éxito técnicas de transformación nuclear y plastidial (León-Bañares *et al.*, 2004; Radakovits *et al.*, 2010).

Hasta ahora, hay informes de estabilidad de las transformaciones nucleares en tres grupos de microalgas eucariotas: algas verdes (clorophytas), diatomeas (Bacillariophyta) y dinoflagelados (Dinophyceae) (Smit, 2004). Y en contraste con el gran número de bacterias y levaduras genéticamente modificadas e incluso plantas superiores, sólo unas pocas especies de microalgas eucariotas se han transformado con éxito con una cierta eficiencia.

Hasta ahora se dispone de más de 30 especies que han sido transformadas con éxito, aunque la estabilidad de los transgenes sigue siendo un obstáculo en las transformaciones, hasta ahora existen cuatro métodos de transformación en microalgas que permiten introducir genes de interés, a nivel nuclear o plastidial:

- **Electroporación:** aplicación de pulsos de corriente eléctrica que generan la apertura de poros transitorios en la membrana de modo que la intensidad, duración y número de pulsos permiten controlar la eficiencia de entrada del DNA exógeno.
- ***Agrobacterium tumefaciens*:** la bacteria *A. tumefaciens* es un método común de transformación en plantas, ya que es capaz de transferir una parte de su genoma, el DNA transferente (T-DNA), en el genoma nuclear de las células. Los genes inductores de tumores del T-DNA silvestre son sustituidos por genes de interés.
- **Bombardeo de microproyectiles (biolística):** el DNA recubre partículas de metal (oro o tungsteno) que son disparadas sobre las células de interés impulsadas mediante helio a alta presión.
- **Bolas de cristal:** es el método de transferencia más sencillo donde se agita una suspensión celular en presencia de DNA y bolas de vidrio o whiskers de carburo



silícico de forma que por la acción abrasiva se crean poros transitorios en la membrana plasmática permitiendo la entrada del DNA en el interior de la célula.

## **1.5 VACUNAS EN MICROALGAS**

En la actualidad existen más de 40 000 especies de microalgas identificadas. Cientos de ellas han sido objeto de estudio a nivel fisiológico, metabólico o químico solo unas pocas decenas han sido cultivadas fuera del laboratorio y son muy pocas que han llegado a producirse a escala industrial. En la última década, se ha producido un aumento del interés en la biotecnología para la producción de moléculas valiosas que van desde las proteínas terapéuticas a los biocombustibles, tanto en bacterias, levaduras, plantas superiores, y otros sistemas. Las microalgas también pueden ser diseñadas para expresar genes heterólogos para la producción de proteínas recombinantes que tienen un valor importante en aplicaciones industriales y farmacéuticas. Hasta la fecha, algunas proteínas de mamíferos, tales como anticuerpos, hormonas y vacunas, se han expresado en microalgas a niveles económicamente viables (Álvarez *et al.*, 1989).

Algunas de las principales ventajas de utilizar las microalgas es que presentan varias características ventajosas respecto a los sistemas convencionales de producción de proteínas recombinantes, que las hacen muy atractivas como biorreactores: tiempo corto de producción, bajo riesgo de patogenicidad (no se conocen patógenos o toxinas que pudieran causar contaminación en el producto final, como en el caso de bacterias y células de mamíferos), y se ha demostrado su capacidad para sintetizar proteínas complejas de origen humano así como las ventajas de su utilización como sistemas de producción de vacunas son: la vía de administración (oral); se pueden administrar crudas o en polvo, no requieren de una cadena de frío, proveen inmunidad sistémica y de mucosas, su bajo costo de producción (de 100 a 10000) veces menores). Sólo algunas especies se han utilizado en la producción de vacunas como: a) una vacuna contra la infección de la bacteria *Staphylococcus aureus* fue producida por Dressen y colaboradores (2010) en el cloroplasto de esta microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual fue capaz de provocar inmunidad por vía oral en ratones. Esta vacuna fue estable por un periodo aproximado de año y medio en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente. b) en el año 2012 Henríquez y colaboradores, lideraron un

proyecto que busca generar vacunas orales a través de la utilización de microalgas, las cuales son parte del alimento cotidiano de los salmones la cual consiste en desarrollar pellets microalgales profilácticos terapéuticos, pensados como vacuna oral contra enfermedades producidas por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, el virus de la anemia infecciosa del Salmon y el virus de la Necrosis pancreática infecciosa; ISA e IPN respectivamente.

**Tabla 4.** Resumen de las vacunas de algas producidas y hallazgos significativos.

Antígeno	Hospedador/sitio de Integración	Rendimiento	Hallazgos significativos	referencia
Virus de la fiebre aftosa (VFA) proteína estructural VP1 fusionada a la subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	Cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> cloroplasto genoma	3 a 4 % de TSP	La acumulación de proteínas fue superior al reportado en estudios anteriores de plantas y detectable por Western y ELISA. La unión al gangliósido GM1 era débil pero estadísticamente significativa. Las cepas no eran completamente homoplásmica, lo que los rendimientos más altos puede ser posible.	Sun <i>et al.</i> (2003)
Antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg)	D. Salina Genoma nuclear	Arriba de 3ng/mg de proteína soluble (0.0003% TSP)	El nivel de expresión se cuantificó por ELISA e informó de "alto", pero los resultados reflejan muy baja expresión.	Geng <i>et al.</i> (2003)
Proteína VP28 del virus del síndrome de las manchas blancas	Cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> genoma	Variable, que van desde 0,2 a proteína celular total 20,9% (0,1 a 10,5% TSP)	Los autores informan de una alta variabilidad en los niveles de expresión, a pesar de la integración mismo sitio por recombinación homóloga en el genoma del plástido.	Surzycki <i>et al.</i> (2009)
Proteína de superficie Pfs25 y Pfs28 de <i>P. falciparum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cloroplasto genoma	No cuantificado; visible a través de Western y Coomassie después de purificación por afinidad	Los sueros de los ratones inoculados con Pfs25 bloquearon completamente la replicación dentro de los mosquitos y por lo tanto la transmisión de la malaria	Gregory <i>et al.</i> (2012)
Proteína de superficie de <i>P. falciparum</i> Pfs25 fusionada con la subunidad B de la toxina de cólera	<i>C. reinhardtii</i> cloroplasto genoma	Arriba de 0.09% de TSP	Los ratones alimentados con algas liofilizadas mostraron respuesta de la mucosa de IgA tanto a CTB y Pfs25, pero la respuesta IgG sistémica sólo a CTB. Un sitio de la proteasa furina separó a los dos dominios.	Gregory <i>et al.</i> (2013)
Proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 mutante atenuada (E7GGG)	<i>C. reinhardtii</i> cloroplasto genoma	Arriba de 0.12% de TSP.	En contraste con la más alta expresión de la planta, <i>C. reinhardtii</i> obtener rendimientos mucho más altos y la mayor parte fue soluble. Los extractos de algas crudo provocaron menor respuesta de IgG de la proteína purificada, pero ambas preparaciones permitió la supervivencia del 70% después de la exposición del tumor	Demurtas <i>et al.</i> (2013)
La angiotensina II fusionada con el antígeno de la cápside del virus con hepatitis B (HBcAg)	<i>C. reinhardtii</i> cloroplasto genoma	Arriba de 0.05% de TSP.	El antígeno quimérico era visible por Western blot y se cuantificó por ELISA, pero no en ensayos in vivo o actividad inmunológica se realizaron	Soria-Guerra <i>et al.</i> (2014)

Hoy en día, el número de vacunas que se encuentran desarrollándose va en aumento, pero la mayoría de estas se encuentran en fases de prueba (Obeme, 2010).

Finalmente cabe mencionar que en la revisión realizada en este trabajo no se encontraron antecedentes de vacunas contra la paratuberculosis realizadas en microalgas marinas.

## 2. ANTECEDENTES

La secuenciación de todo el genoma de MAP cepa K-10 ha permitido la identificación de antígenos de proteínas inmunodominantes, que inducen fuertes respuestas inmunes mediadas ya sean de tipo humoral o celular, para su posterior inclusión en las pruebas de diagnóstico o de vacunas basadas en subunidades (Li, 2005).

Los antígenos del complejo 85 (85A, 85B y 85C) obtenidos *de MAP* tienen un 99% de identidad con el complejo 85 de *M. avium* y en otras micobacterias se han encontrado variaciones en la posición de un aminoácido como cisteína (Dheenadhayalan *et al.*, 2002); por otro lado McShane *et al.* (2004) produjeron una vacuna recombinante del antígeno 85A en el virus a partir *de Mycobacterium bovis* y observaron una respuesta inmune cruzada con *Mycobacterium leprae*.

Se ha observado que los antígenos del complejo 85 producen una gran respuesta proliferativa del interferón gamma (INF- $\gamma$ ) en ratones y cabras infectadas experimentalmente, además los péptidos sintéticos Ag85 A y Ag85B son reconocidos fuertemente por las células T despertando una gran respuesta inmune. Por otro lado los antígenos MAP4308c y MAP0586c se han utilizado en vacunas de ADN confirmándose que ambos despiertan una fuerte respuesta inmune tipo Th1 en ratones (Roupie *et al.*, 2008).

En un trabajo realizado por Celis en el 2012 donde se transformaron plantas, la alfalfa se utilizó como un sistema de expresión para antígenos vacunales para la paratuberculosis, esta fue transformada de manera exitosa con las construcciones de los genes MAP1609c y MAP0586c. Produciendo la proteína para su aplicación oral en posteriores estudios (Celis, 2012).

En cuanto a la producción de antígenos en microalgas Bayne y colaboradores en el 2013 mostraron que proteínas hemaglutininas recombinantes de virus de la gripe se expresaron en la microalga *Schizochytrium sp.*, donde *Schizochytrium sp* era capaz de exportar los ácidos de larga duración en las proteínas de membrana en una forma adecuada para la formulación de vacunas. Una proteína hemaglutinina recombinante (rHA) derivada de A / Puerto Rico/8/34 del Virus de la influenza (H1N1) se evaluó como

una vacuna en un modelo de desafío de murino. La inmunidad protectora de desafío letal con el virus homólogo fue provocada por una sola dosis de 1,7, 5 o 15 mg de rHA con o sin adyuvante en las tasas de supervivencia entre 80-100%. Protección total (100%) se estableció en todas las dosis, con o sin adyuvante cuando los ratones se les dio una segunda vacunación. Estos datos demuestran el potencial de *Schizochytrium* sp. Como una plataforma para la producción de antígenos recombinantes útiles para la vacunación contra la gripe.

La provisión de una vacuna eficaz *M. a paratuberculosis* ha sido frustrantemente difícil de alcanzar.

El estudio de microalgas transgénicas sólo fue posible tras el desarrollo de técnicas eficientes para la inserción de genes en el genoma de las microalgas. El primer reporte de vacunas sintetizadas en microalgas era una molécula quimérica que comprende el virus de la fiebre aftosa proteína estructural VP1 y la subunidad beta de la toxina del cólera (CTB), un adyuvante de la mucosa conocido (Sun *et al.*, 2003). Este antígeno se ha expresado previamente en las plantas y se había demostrado la inmunidad oral en ratones (Wigdorovitz *et al.*, 1999), pero el avance de los ensayos fue obstaculizado por bajos niveles de expresión. En *C. reinhardtii*, el 3-4% de TSP (proteína total soluble) fue reportado, pero los rendimientos más altos fueron posibles debido a que las cepas examinadas no eran completamente homoplasmicas (Sun *et al.*, 2003). El siguiente reporte de un antígeno de la vacuna de algas producidas mostró los primeros datos *in vivo* para la inmunidad que confiere eficacia. El virus de la peste porcina clásica (CSFV) proteína de superficie E2 fue expresada a partir del genoma del cloroplasto *C. reinhardtii*, y los extractos de proteínas totales fueron administrados por vía subcutánea con adyuvante de Freud o por vía oral por sonda sin adyuvante. La Inmunización subcutánea reporto que se indujo una respuesta inmune significativa. Sin respuesta sistémica o mucosal inmune se detectó después de la inmunización oral, y se sugirió que un adyuvante de la mucosa pudiera ser necesario para la administración oral para que sea eficaz (Él *et al.*, 2007).

Un sistema de expresión transitoria de un alga marina verde unicelular *Chlorella* sp. MACC/C95, se desarrolló utilizando un gen reportero GUS codificada por el plásmido pBI121. Los resultados demostraron una alta eficiencia de transformación se podría

lograr mediante el uso de electroporación para introducir ADN en las células intactas y el promotor 35S de CaMV para conducir la expresión de genes foráneos en *Chlorella* sp. MACC/C95 (Wang et al., 2007).

Wang y colaboradores (2008), expresaron la descarboxilasa humana glutámica, un conocido antígeno autoinmune de diabetes tipo 1, que se hace reaccionar con sueros de ratones diabéticos no obesos. Sorprendentemente, la expresión detectable se logró utilizando genes de codones no optimizados. Una investigación más a fondo de los factores que afectan a la expresión de antígenos de la vacuna en las algas se encontró que en efecto el codón de optimización es fundamental para un alto rendimiento. También se ha observado que el rendimiento es altamente variable entre los transformantes individuales a pesar del hecho de que la transformación de cloroplastos procede por recombinación homóloga eliminando los efectos de posición dentro del genoma (Surzycki et al., 2009).

Gutman y Niyogi (2004) lograron la transformación de *H. pluvialis* con el método de *A. tumefaciens* y sugieren que las microalgas han surgido como candidatos importantes en aplicaciones biotecnológicas y sistemas modelo para estudiar diversos procesos biológicos y como una "fábrica verde" para la agricultura molecular de valiosas enzimas y proteínas terapéuticas.

El método de transformación mediado por *A. tumefaciens* para la transferencia de genes sólo se había aplicado recientemente para transformar genéticamente el alga verde *C. reinhardtii* (Kumar et al., 2004) y *Haematococcus pluvialis* (Kathiresan et al., 2009) con integración exitosa de  $\beta$ -glucuronidasa y higromicina fosfotransferasa (*hpt*) genes en el genoma nuclear de las células huésped.

La transformación mediante *A. tumefaciens* en microalgas ofrece destacables ventajas frente a otras técnicas empleadas hasta el momento. Utilizando el método de transformación mediada se transformó con éxito *C. reinhardtii* con ( $\beta$ -glucuronidasa), GFP (proteína fluorescente verde) y *hpt* (higromicina fosfotransferasa), con un aumento de cincuenta veces en transformantes resultantes en comparación con el método de perlas vidrio (Kumar et al., 2004). Los genes GUS ( $\beta$ -glucuronidasa), *gfp* y *hpt* se han integrado con éxito en *H. pluvialis* usando este método (Kathiresan et al., 2009).

Cha *et al.*, en el 2012 realizaron un trabajo donde logran la transformaron de manera exitosa de *Chlorella vulgaris*, mediante el uso de un protocolo optimizado mediado por *A. tumefaciens*, en la cual se obtuvo una frecuencia media de transformación de 25% sobre la base de la expresión temporal de GUS. Se obtuvieron nueve transformantes por PCR, y la presencia del fragmento de *hpt* después de dos generaciones de subcultivo sugiere que el T-ADN se integra en el genoma.

En 2012 desarrollaron un novedoso enfoque de transformación de *Schizochytrium* usando *A. tumefaciens* que albergaba el vector binario pCAMBIA2301 que contiene la neomicina fosfotransferasa II (*ntp* II) como el gen marcador de selección que confiere resistencia a G418, los transformantes de *Schizochytrium* se obtuvieron con éxito en las medio que contienen G418. La integración y la expresión de los transgenes se confirmaron por análisis de PCR y ensayo de actividad GUS a fin de validar el sistema de transformación, pCAMBIA2301-EGFP que contiene el gen EGFP introducido en *Schizochytrium*. Donde demostraron que el gen EGFP exógeno se incorporó con éxito en el genoma de *Schizochytrium* (Cheng, 2012).

Cabe mencionar que no se registran hasta ahora la producción de antígenos en las microalgas marinas *Schizochytrium sp* y *Navicula sp*.

### **3.- JUSTIFICACIÓN**

A pesar de existir alternativas para la prevención y el control de la Paratuberculosis mediante vacunas, el almacenamiento, costos de producción, y la poca efectividad de las mismas; son limitantes para su aplicación, por lo que es necesario emplear nuevas alternativas para la producción de antígenos. En este trabajo se pretende analizar el potencial de microalgas marinas como plataforma para la producción de vacunas orales contra este patógeno.

### **4.-HIPÓTESIS**

Si las microalgas constituyen una plataforma eficiente para la producción de antígenos contra la paratuberculosis, entonces al transformar de manera estable a las microalgas *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp empleando construcciones genéticas de los genes MAP1609c y MAP0586c, deberá detectarse la presencia de los genes mediante PCR punto final y la producción de proteína mediante su extracción y cuantificación.



## 5.- OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar la capacidad de producción de antígenos contra la paratuberculosis en un sistema de producción consistente en líneas transgénicas de microalgas marinas transformadas mediante dos métodos de transformación genética con las construcciones de genes codificantes para MAP.

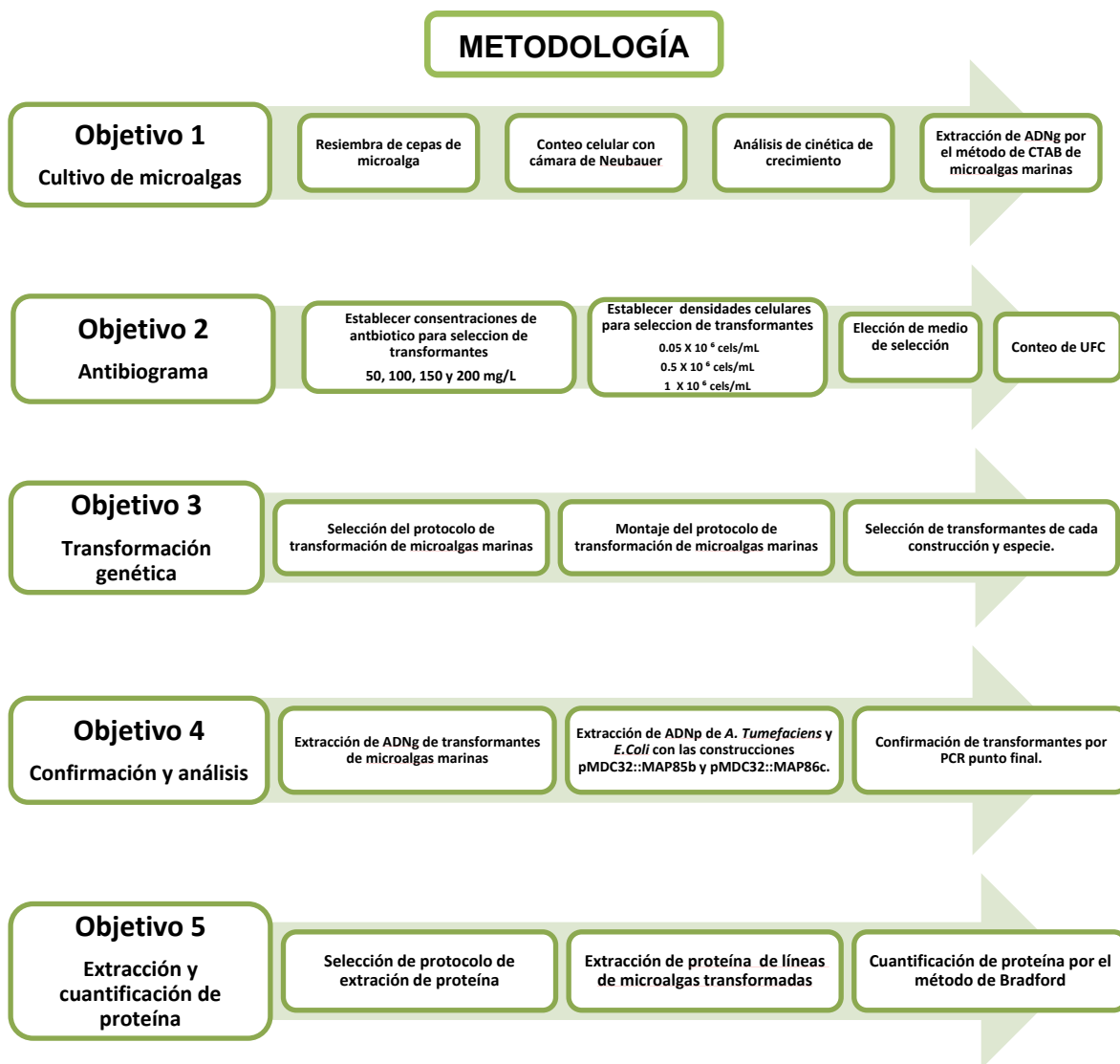
### 5.2 Objetivos particulares:

1. Establecer el cultivo de las microalgas marinas *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp.
2. Establecer variantes para selección de transformantes mediante Antibiograma.
3. Implementar el protocolo de transformación nuclear en las microalgas marinas con las construcciones genéticas, pMDC32::MAP1609c y pMDC32::MAP0586c.
4. Confirmar y analizar por PCR punto final la presencia de los genes que codifican para los antígenos MAP0856c y MAP1609c.
5. Implementar método de extracción y cuantificación de proteína total de líneas transgénicas de microalgas confirmadas con la presencia de los genes.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se implementó un diagrama dividido por objetivos siguiendo las metodologías y técnicas que se utilizaron en cada uno de para la obtención de los antígenos de MAP utilizando como plataforma biotecnológica microalgas marinas mediante metodologías básicas y recurrentes en varias etapas de este trabajo como son las extracciones de ADN, métodos de transformación utilizados, entre otros que se explican más a detalle.

**Figura 2.** Esquema general de trabajo. Metodologías correspondientes a los objetivos establecidos en este trabajo.



## 6.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE MICROALGAS

### 6.1.1 Cepas y cultivo

Las cepas de las microalgas fueron proporcionadas por el Dr. Juan Manuel Pacheco del Laboratorio de microalgas de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), unidad Pichilingue- UABCS en el estado de Baja California Sur. Las microalgas proporcionadas fueron aisladas de muestra de agua del muelle de la unidad Pichilingue-UABCS. *Schizochytrium* sp con las siguientes coordenadas: 24° 16' 11.57'' N, 110° 19' 25.56'' O, y *Navicula* sp aislada de la zona de mangle de Pichilingue del mismo estado con las siguientes coordenadas: 24° 16' 11.43'' N, 110° 19' 23.94'' O. Las cuales se donaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste).

### 6.1.2 Re-activación de cepas de microalgas marinas; *Schizochytrium sp* Y *Navicula sp*

La reactivación de las cepas de las dos especies de microalgas se realizó en el medio de cultivo Guillard F2 (Guillard & Ryther 1962), que contiene agua de mar con una salinidad natural de aproximadamente 35 ‰ filtrada con cordón de 1 µ así como los stocks; macronutrientes (1 ml/L), micronutrientes (1 ml/L), silicatos (1 ml/L) y Vitaminas (0.5 ml/L) (compuestos de cada Stock se presentan con detalle en los anexos). Para el cultivo en caldo se utilizaron matraces de 250 que contenían 50 ml de medio F2, para el cultivo en placa se utilizó el mismo medio adicionado con Bacto™ Agar (15 g/L) al 1.5% realizando el bioensayo por triplicado para cada especie. Se esterilizó el medio y posteriormente se procedió a inocular en los matraces realizando la inoculación con una asada de la cepa, en medio estéril, en la campana de flujo laminar y con mechero para evitar contaminar el nuevo cultivo.

Posteriormente para la siembra en placa, se tomó una azada de cada cepa y se hizo el plaqueo por estriado en cada placa.

Procediendo a la incubación de los cultivos se colocaron en un cuarto de cultivo con las siguientes condiciones; intensidad de luz 32.8 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y una temperatura de 28°C ± 1°C. Por aproximadamente 6 días agitando los

matraces únicamente una vez al día, para evitar su sedimentación y permitir su homogenización.

Al término de los 6 días de incubación con el fin de alcanzar una concentración mayor de células para obtener el cultivo piloto y realizar el conteo de las mismas para la cinética de crecimiento y el antibiograma se realizó una nueva resiembra con el mismo medio F2 Guillard pero esta vez descartando a los silicatos del medio ya que para los fines de este proyecto se desea que la pared celular de las microalgas, en particular, de la diatomea *Navicula sp.* que contiene un gran porcentaje de sílice en su pared a diferencia de *Schizochytrium sp* la cual de acuerdo a la literatura citada no hay diferencias significativas en cuanto a su crecimiento en medio con o sin los silicatos, sean más delgadas y así facilitar la ruptura de la pared e introducir el gen en cuestión, inoculando en los matraces 1ml de la concentración de células de cada microalga obtenido del cultivo previo del cual también se tomó una muestra del concentrado conocer la densidad celular del ml que fue inoculado, tomando este dato como “densidad de inóculo” llevándose a cabo por triplicado nuevamente tanto en caldo como en placa, incubándolas en un cuarto de cultivo con las mismas condiciones ya mencionadas.

### **6.1.3 Conteo celular**

Para el conteo celular se tomó una muestra con una pipeta Pasteur estéril, dentro de la campana de flujo laminar para evitar la contaminación del cultivo, se obtuvo de cada matraz una muestra y esta se colocó entre el porta objetos y la cámara de Neubauer, colocando una muestra en cada uno de los 2 espacios de la cámara, con el Microscopio óptico se localizaron las células con el lente de 20X y posteriormente enfocando con el lente 40X, se contaron las células al inicio del cultivo con la cámara de Neubauer tomando en cuenta los 5 cuadrantes del cuadrulado de la cámara, contando la muestras por triplicado de los tres matraces de cultivo de *Schizocghytrium sp* y *Navicula sp*, realizando el conteo cada 24 horas hasta las 168 horas ( 1-7 días) de re-iniciar el cultivo con la misma técnica para conocer la cinética de crecimiento de estas especies de microalgas, obteniendo la tasa de crecimiento de cada especie y su comportamiento, para observar el tiempo en el que se establece la fase *lag*, la exponencial y la fase

estacionaria. Donde la fase exponencial es la de mayor interés para posteriores bioensayos de transformación genética.

#### **6.1.4 Análisis de cinética de crecimiento**

Con el aproximado de la densidad de inóculo y del crecimiento por día, se realizó un análisis de los datos los cuales fueron capturados en Excel de Office 2010 y el programa Sigma Plot 9.0 para obtener el número aproximado de células por mililitro (céls./ml) en el inóculo y durante el conteo diario (cada 24 hrs), tomando en cuenta de cada replica y de cada especie; la media (MED) y la desviación estándar (DESVEST) para obtener las curvas con relación tiempo (hrs) – densidad (céls/ml).

#### **6.1.5 Antibiograma; resistencia a antibiótico de microalgas transformadas.**

Para el bioensayo de resistencia al antibiótico todo se realizó por triplicado, utilizando las cepas de las microalgas marinas *Schyzochytrium* sp. y *Navícula* sp, que previamente habían sido sometidas a los métodos de transformación ya antes mencionados, se utilizaron cuatro concentraciones comenzando desde 50, 100, 150, y 200 mg/L del antibiótico selección higromicina B (Hyg), antibiótico al cual son resistentes las construcciones pMDC32::MAP85b y pMDC32::MAP86c (Celis, 2012), y utilizando tres densidades celulares de cada especie  $0.05 \times 10^6$  cels/ml,  $0.5 \times 10^6$  cels/ml y  $1 \times 10^6$  cels/ml, se hizo un plaqueo en césped con 50  $\mu$ l de cada densidad celular en medio F2 Guillard preparado con agua marina de aproximadamente 35% de salinidad, que contenía agar al 1.5 % (15 g/L) y las diferentes concentraciones de antibiótico, el antibiograma se realizó de la misma forma para las dos especies. Posterior al plaqueo, se incubaron en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones: intensidad de luz  $32.8 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y una temperatura de 28°C, por 6 días, condiciones que se habían establecido previo a la transformación, revisándolas diariamente. Al término de la incubación se hizo el conteo de colonias que habían crecido. Al obtener los resultados del conteo del antibiograma con el medio F2 se observó que había una gran resistencia al antibiótico y se optó por una nueva alternativa, realizándose un nuevo bioensayo con las mismas variantes de densidades celulares y concentraciones de higromicina B, variando únicamente el medio de crecimiento

cambiando el F2 Guillard por caldo nutritivo NB (Nutrient broth) (8 g/L), después de los 6 días de incubación, se realizó nuevamente el conteo de colonias de cada placa del bioensayo, observando el número de colonias y capturando los datos en el programa de Excel.

**Tabla 4.** Relación de bioensayo de resistencia antibiótico. **Hyg** : Higromicina B

<b>Bioensayo con medio F2 y Caldo nutritivo (NB)</b>			
<b>Concentración Hyg / cels/ml</b>	0.05 X 10 <sup>6</sup> cels/ml	0.5 X 10 <sup>6</sup> cels/ml	1 X 10 <sup>6</sup> cels/ml
<b>0 (control)</b>	3 placas	3 placas	3 placas
<b>50 mg/L</b>	3 placas	3 placas	3 placas
<b>100 mg/L</b>	3 placas	3 placas	3 placas
<b>150 mg/L</b>	3 placas	3 placas	3 placas
<b>200 mg/L</b>	3 placas	3 placas	3 placas

## 6.2 TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 6.2.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de Lisis Alcalina

(Modificado de Sambrook y Russell, 2001)

Se tomaron 3 ml de cultivo bacteriano que contenía el plásmido de interés y se centrifugo durante 3 min a 14 000 xg a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y resuspendió la pastilla celular en 300 µl de Solución I de Birboin refrigerada (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM). Posteriormente se agregaron 300 µl de Solución II (SDS 1% y NaOH 0.2, preparada al momento y se esperó de 4 a 6 min hasta que la solución se observó transparente o clara. Se añadieron 450 µl de solución III (Acetato de Sodio 3M, pH 5.2) previamente refrigerada a 4°C, invirtiendo para mezclar e incubar en hielo por 5 min. Se centrifugó por 5 min a 14 000 xg a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml, adicionando el mismo volumen transferido de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, mezclando con vortex hasta homogenizar completamente centrifugándose a 14 000 xg por 5 minutos a 4°C, se transfirió la fase

acuosa a un tubo eppendorf nuevo. Posteriormente se precipitó con isopropanol 0.6 veces del volumen que se tenía, se mezcló con vortex y después se dejó reposar por 2 min, se centrifugó a 14 000 xg por 5 min a 4°C, removiendo el sobrenadante por decantación y removiendo el restante de Isopropanol con micropipeta. Se agregó 1 ml de etanol al 70% invirtiendo el tubo varias veces, centrifugo a 14 000 xg durante 2 min a 4°C decantando después cuidando que no se perdiera la pastilla celular. Finalmente se dejó evaporando el etanol con el calor de un foco de 60 W, agregando al final de la evaporación un volumen de agua 30 µl de H<sub>2</sub>O Mili Q estéril para resuspender la pastilla.

### **6.2.2 Extracción de ADN genómico (ADNg) de microalgas marinas cepas silvestre por método (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) CTAB.**

Del cultivo de microalgas se tomaron 50 ml de cultivo y se concentraron a 3500 rpm por 10 min decantando hasta obtener únicamente el pellet de células posteriormente se lavaron 2 veces con 500 µl de agua destilada estéril, centrifugando después de cada lavado con las mismas condiciones, se tomó 1.5 ml de pellet total que se obtuvo al final pasándose a un tubo eppendorff de 1.6 ml, y se centrifugaron las células a 10 000 rpm por 2 min, se decantó, obteniendo un pellet el cual se resuspendió en 700 µl de buffer de lisis CTAB 2X pH 8.0 (2 % (w/V) CTAB, 1.4M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA), y se centrifugó a 5000 rpm durante 2 min, posteriormente sin decantar el buffer, el pellet de células se maceró con un pistilo de plástico hasta que fuera homogénea la mezcla de las células con el buffer, al término de la maceración se incubaron las células a 65°C por 30 min invirtiendo los tubos con las células cada 5 minutos para mantener la misma temperatura en todo el tubo, pasados los 30 min se agregaron 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) homogenizando por inversión, centrifugando después por 10 min a 10000 rpm, al término de la centrifugación se recuperó la fase superior en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y estéril, al nuevo tubo se le agregó 500 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron por 30 min a -20°C, terminada la incubación se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min, y se decantó el sobrenadante, para lavar la pastilla agregando 1 ml de Etanol al 70%, y nuevamente centrifugar a 13000 rpm durante 15 min, decantando al final y quitando el exceso de etanol, se dejaron secar en campana

de extracción para la evaporación total del etanol. Al final la pastilla se resuspendió en 20 µl de agua Milli Q estéril, y se almacenó a -20°C para su posterior cuantificación de ADNg en el NanoDrop.

## **6.3 TRANSFORMACIÓN DE MICROALGAS MARINAS**

### **6.3.1 Selección del protocolo de transformación de microalgas**

Para la transformación nuclear de *Schizochytrium* sp. y *Navicula* sp. Con las construcciones genéticas pMDC32::MAP85b y pMDC32::MAP86c (Construcciones proporcionadas realizadas por el Biólogo Rodrigo Celis García del Instituto Politécnico Nacional (IPN), realizadas en del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste (CIBNOR) y proporcionadas por el Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez Investigador del CIBNOR), se seleccionaron dos métodos de transformación, electroporación y transformación mediada por *A. tumefaciens* a fin de conseguir un método óptimo para la comparar la eficiencia de transformación de dichas microalgas, tomando en cuenta las referencias y literatura de transformación por estos dos métodos (Che *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012).

## **6.4 MONTAJE DEL PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE MICROALGAS**

### **6.4.1 Transformación por Electroporación**

Para implementar el protocolo de transformación por electroporación se utilizaron las células de *Schizochytrium* sp. y *Navícula* sp con cuatro días de edad que fueron cultivadas del medio líquido F2 posteriormente los cultivos de *Schizochytrium* sp. y *Navícula* sp, se concentraron centrifugándose a 3500 rpm durante 10 minutos para concentrar y decantar a 15 ml cada uno, el contenido de los 3 tubos de se vació en un solo tubo falcón de 45 ml para centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y decantar hasta eliminar todo el sobrenadante y dejar solo el pellet de células, se le agrego al pellet 20 ml de agua destilada estéril y se resuspendieron con vortex por 10 seg, para posteriormente volver a centrifugar y obtener únicamente el pellet, este paso se realizó



2 veces con el fin de lavar las células eliminando las sales del medio de cultivo F2 que contenía agua marina.

Terminados los pasos anteriores se agregó 10 ml de solución osmótica que contiene sorbitol y manitol, seguido de eso se lavó y eliminando el sobrenadante, se centrifugó a 3000 rpm 10 min y se decantó tratando de solo dejar el pellet. Nuevamente se le agregó 5 ml de solución osmótica a cada pellet de cada especie de microalga y se dejó reposar durante 1 hora, pasado el tiempo se centrifugó a 3000 rpm 10 min hasta concentrar únicamente el pellet, al resultado del pellet se le agregó 5 ml del Buffer de electroporación y se resuspendió en un vortex, a partir de esto se tomó una pequeña muestra para cuantificar con la cámara de Neubauer en el microscopio y saber la densidad que se tenía al electroporar.

Se tomaron 100  $\mu$ l de células *Schizochytrium* sp. y *Navícula* sp y 5  $\mu$ l de plásmido MAP85b y MAP86c, en un tubo eppendorf de 0.6 ml se mezclaron los plásmidos con las células, para las dos especies y las dos construcciones. Estas a su vez se resuspendieron y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0.2 cm, la electroporación se llevó a cabo con el electroporador Gene Pulser®II, utilizando los siguientes parámetros, voltaje de 1.8 kV, resistencia de 200  $\Omega$ , una capacitancia de 50  $\mu$ F, con un solo pulso de tiempo constante. Después de la electroporación se tomaron 10  $\mu$ l las células electroporadas y para recuperar las células se colocaron en tubos falcón de 50 ml con 5 ml de medio NB sin antibiótico, Fueron incubadas en un agitador con movimiento constante de 150 rpm a 27°C , después de la incubación por 6 días de las células electroporadas, se concentró el medio con las células y del concentrado se tomaron 50  $\mu$ l de cada construcción y especie para el plaqueo en medio NB con agar al 1.5%, con 200 mg/L de Hyg B, dejándolas incubar por 6 días con las siguientes condiciones: intensidad de Luz 32.8  $\mu$ Em<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y una temperatura de 28°C, por 6 días, revisándolas diariamente observando su crecimiento con las diferentes concentraciones de higromicina B y las densidades celulares de las microalgas marinas, para la posterior selección de transformantes.

#### **6.4.2 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**

Para llevar a cabo la transformación de microalgas mediado por *A. tumefaciens*, se llevó a cabo el siguiente protocolo basado en el trabajo de Cha y colaboradores en 2012, haciendo pequeñas modificaciones al protocolo de acuerdo a las características que presentan y necesitan las microalgas con las que se está trabajando en este proyecto.

De las placas que contenían las construcciones genéticas pMDC32::MAP85b y pMDC32::MAP86c, se tomó con un asa la bacteria transformada con los genes MAP1609c (MAP85b) y MAP0586c (MAP86c) y se inoculó lo que se tomó con el asa en tubos de cristal de 25 ml con 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con 5 µl de antibiótico kanamicina (1 µl/ml), colocándolos en agitación a 150 rpm por 24 horas a una temperatura de 30°C y en obscuridad para su crecimiento. Uno por cada construcción.

Después de las 24 h de poner a crecer en tubos de cristal de 15 ml a *A. tumefaciens* con las construcciones en medio con antibiótico, se concentraron los tubos de cada construcción genética a 5000 rpm durante 5 min. Obtenido el pellet se le agregó 1 mL de medio de inducción (MI) (NB + Agua destilada + Acetosiringona) que contenía una concentración del inductor de los genes de virulencia; acetosiringona a 200 µM, y se resuspendió el pellet con el MI incubando a temperatura ambiente la mezcla de *A. tumefaciens* con el MI.

Posteriormente y durante la incubación de *A. tumefaciens* con el MI, se concentraron las células de las microalgas de un cultivo celular de 50ml en un tubo falcón decantando el medio hasta obtener 2 ml de concentrado, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 2 min, decantando el sobrenadante del medio hasta 500 µl que contenía una pastilla celular con un aproximado de  $2.5 \times 10^6$  cels/ml por cada construcción.

A la pastilla de las células de microalgas se le adicionó 1 ml de *A. tumefaciens* con las construcciones genéticas con el MI previamente resuspendido e incubado a temperatura ambiente, re-suspendiendo con un vortex. Se centrifugó el medio con las células por 5 min a 5000 rpm, y se decantó el medio hasta 600 µl, los cuales fueron divididos en 3 tubos eppendorf de 1.5 ml con 200 µl cada uno por cada construcción ya que se hizo por triplicado la transformación.

Los tubos que contenían los 200  $\mu\text{l}$  de medio (MI) con las células de microalgas se concentraron a 50  $\mu\text{l}$ , se plaquearon los 50  $\mu\text{l}$  en placas con medio de recuperación (NB + Agua Marina + 200  $\mu\text{M}$  de acetosiringona) y se cubrieron con aluminio para mantenerlas en obscuridad dejándose incubando por 3 días a una temperatura de 28°C. Todo se llevó acabo por triplicado.

Para continuar con la transformación, pasados los 3 días de incubar las cajas plaqueadas, se procedió a la eliminación de la bacteria *A. tumefaciens* con medio que contenía (NB + agua marina + cefotaxima [500 mg/L]), se destaparon las cajas y en campana de extracción se vaciaron a cada placa 7 ml del medio para descontaminar, diluyendo por toda la caja y con ayuda de un asa de cristal de triangulo se removieron todas las células de la placa y se recuperó las células y el medio en tubos falcón estériles de 50 ml, se sellaron y cubrieron con aluminio nuevamente para incubarlos en un agitador a 150 rpm por 2 días a 28°C.

Pasados los 2 días de incubación con cefotaxima [500 mg/L], agitación y en obscuridad, se plaquearon con medio que contenía el antibiótico de selección (NB + agua marina + higromicina [200 mg/L]), el plaqueo se hizo por triplicado para cada construcción, una placa con cefotaxima (NB + agua marina + cefotaxima [500 mg/L]) para saber si se había eliminado del todo la bacteria *A. tumefaciens* y otra placa únicamente con medio NB (NB + Agua marina). El plaqueo se hizo con 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión, y se incubaron por 6 días, que es el tiempo que se encontró que crecen de manera óptima la microalgas de este trabajo, dejándose con las siguientes condiciones: intensidad de luz 32.8  $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 h luz: 8 h obscuridad y una temperatura de 28°C, revisándolas diariamente, para posteriormente hacer la selección de transformantes.

**Tabla 5.** Relación de número de placas que se hicieron para cada medio con y sin antibiótico para cada construcción.

Construcción genética pMDC32::MAP85b		
<b>NB</b>	Cefotaxima 500 mg/L	Hygromicina 200 mg/L
<b>1 placa</b>	1 placa	3 placas

Construcción genética pMDC32::MAP86c		
<b>NB</b>	Cefotaxima 500 mg/L	Hygromicina 200 mg/L
<b>1 placa</b>	1 placa	3 placas

### 6.4.3 Selección de transformantes de *Schizochytrium sp* Y *Navicula sp*

Para la selección de las clonas de cada CONSTRUCCIÓN, tanto para la transformación por Electroporación como para la transformación mediada por *A. tumefaciens* se realizó de la misma manera; de las placas con medio (NB+ agua marina + Hyg [200 mg/L]) y para el control únicamente medio NB (NB + agua marina) en las que se encontraban cada construcción, se seleccionaron un aproximado de 20 colonias de todas las que habían crecido en presencia del antibiótico de selección, se procedió a tomar con un palillo estéril, cada colonia seleccionando en placas con plantillas que estaban seccionadas en 28 cuadros de 1 cm<sup>2</sup>, picando cada colonia. Primeramente plaqueando en las placa que no contenían antibiótico y con el mismo palillo se picó en la placa que sí contenía antibiótico (Hyg 200 mg/L), esto, para no contaminar la placa de antibiótico con la que no tenía. Esta selección se hizo para cada construcción genética, para los dos métodos de transformación y por duplicado.

Al finalizar la selección de las 20 colonias se pusieron a crecer las células en las cajas en condiciones establecidas; intensidad de luz 32.8  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y una temperatura de 28°C, por 6 días revisándolas diariamente para observar su crecimiento y saber si hay posibles escapes, posteriormente se hizo la selección de clonas de cada especie.

Al obtener las clonas de cada transformación se procedió a re-sembrar en placas de forma individual con medio NB y con el antibiótico de selección (Hyg 200 mg/L), para seguir con la selección y confirmar el crecimiento en presencia del antibiótico, en el caso del medio líquido se inoculó con una azada en un matraz con 50 ml de F2 sin antibiótico para observar el crecimiento, dejando crecer a condiciones para su óptimo crecimiento ya mencionadas con anterioridad.

#### **6.4.4 Confirmación y verificación de líneas transformadas por PCR (Reacción En Cadena De La Polimerasa) punto final**

Se realizaron dos PCR punto final (Reacción en cadena de la polimerasa); el universal y el específico para confirmar que el tamaño de la amplificación de la microalga sea el esperado (~500pb) y el específico para confirmar la inserción del gen ~1000pb para cada uno de los dos genes. Utilizando el ADN<sub>g</sub> extraído de las líneas transgénicas obtenidas de la transformación por los dos métodos utilizados, para el PCR universal, y oligonucleótidos universales (secuencias en anexos) y el programa de PCR descritos por Troedsson *et al.*, (2008); Univ F-1131 y Univ R- 1629 que amplifican la región de la subunidad ribosomal 18S en microalgas.

En cuanto al PCR específico, se utilizaron los oligonucleótidos específicos FMAP85bXbaI - RMAP855bXbaI para el gen MAP1609c (85b) y MAPF86c - MAPR86c para el gen MAP0586c (86c). (Ver anexos).

**Tabla 6.** Programas utilizados para amplificación.

**a)** Programa de amplificación para región sub-ribosomal 18s de microalgas.

<b>Paso</b>	<b>Proceso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
1	Desnaturalización	95°C	5 min
2	Desnaturalización	95°C	30 s
3	Alineamiento	50°C	30 s
4	Extensión	72°C	1 min
5	No. de ciclos	Desde paso 2, 34 ciclos	
6	Extensión final	72°C	5 min
7	Espera final	25°C	∞

b) Programa de amplificación para oligonucleótidos específicos de los genes MAP1609c y MAP0586c.

<b>Paso</b>	<b>Proceso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
1	Desnaturalización	94°C	3 min
2	Desnaturalización	95°C	1 min
3	Alineamiento	60°C	1 min
4	Extensión	72°C	1 min
5	No. de ciclos	Desde paso 2, 35 ciclos	
6	Extensión final	72°C	5 min
7	Espera final	25°C	∞

## 6.6 SELECCIÓN DE MÉTODO Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE LAS MICROALGAS *Schizochytrium sp.* Y *Navicula sp*

Para el bioensayo de extracción de proteína total de las líneas transgénicas de *Schizochytrium sp.* Y *Navicula sp* se realizó de la siguiente manera: se probaron tres métodos de extracción 1) sonicación, 2) perlitas de vidrio y 3) maceración de células con pistilos.

Para los tres métodos se comenzó utilizando un volumen de 360 µl de un concentrado de 100 ml de cultivo de células de microalgas para cada uno de los tubito eppendorff, uno por cada método, el concentrado se centrifugo a 5000 rpm dejando únicamente el pellet de células.

Posteriormente al centrifugado, al pellet se le agregó 500 µl de buffer TBE 1X a cada tubo de este paso en adelante cada método se llevó a cabo por separado.

- 1) **Sonicación:** para este método se utilizó el sonicador con 300 hertz de amplitud, durante periodos de tiempo de 10 segundos se sonicó y 10 segundos inmediatos se incubó en hielo, haciendo seis repeticiones este método consiste en utilizar una onda de cierta amplitud que rompe la pared celular de las microalgas y así liberar la proteína de interés.

- 2) **Perlitas de vidrio:** en este método se utilizaron perlitas de vidrio de 0.1 mm de diámetro las cuales se colocaron en un microtubo de 1.5ml. El tubo cerrado se agita vigorosamente a una alta velocidad en el FastPrep a 5.5 m/s durante 20 segundos repitiéndolo 2 veces. Este método causa una colisión entre las perlas y la muestra dando paso al rompimiento mecánico de las células.
  
- 3) **Maceración** con pistilos: para este último método al microtubo eppendorff que contenía el pellet de las células y los 500 µl de buffer TBE, se maceraron las células manualmente con un pistilo homogenizando y presionando las células entre la pared del tubo y el pistilo para lograr una mayor ruptura de células de microalgas, por un tiempo aproximado de 4 minutos por cada muestra.

A partir de este paso se hizo de la misma manera para las muestras de cada método de extracción, las muestras ya tratadas con el método se colocaron en un vortex a temperatura ambiente por un periodo de tiempo de 20 minutos.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos, para luego recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo estéril, dejándose en incubación a -20°C. Pasando la incubación se filtró cada muestra con filtros de 0.42 µm, pasándolo con una jeringa de 1ml. Por último se dejó incubando en hielo para su posterior cuantificación y el resto se guardó en congelador de -80°C.

## **6.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD (BRADFORD 1976)**

### **6.7.1 Preparación de la curva estándar con la proteína BSA (Albumina Sérica Bovina)**

Se realizó una curva estándar antes de la cuantificación de la proteína de las microalgas para tomarla como referencia para la cuantificación de las muestras de proteína extraída previamente de las líneas de microalgas transformadas con los genes 85b y 86c.

Se preparó una solución stock de BSA a una concentración de 1mg/ml, posteriormente se realizaron 12 diluciones desde 0 (blanco) hasta 8 µg/ml, las diluciones se hicieron por triplicado.

Se colocó en cada placa de ELISA 160 µl de la dilución y 40 µl de Bradford (Bio Rad) para obtener un total de 200 µl, así por triplicado por cada dilución, homogenizando el reactivo Bradford con la dilución de la proteína con la micropipeta, cuidando que no quedaran burbujas para que no se viera afectada la cuantificación, se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente para posteriormente darle lectura en el lector de placas espectrofotómetro y observar la intensidad de la coloración azul con respecto a la concentración de proteína al formar el complejo proteína-colorante. Es decir, a mayor cantidad de proteína, mayor cantidad de producto de reacción y por lo tanto, mayor intensidad de color. Las lecturas obtenidas se capturaron, obteniendo el promedio de cada dilución para realizar una gráfica donde las concentraciones de absorbancia se colocan en el eje de las “y” y la concentración de proteína en el eje de las “x”.

### **6.7.2 Cuantificación de proteína total de microalgas transformadas**

Para las diluciones de las muestras de proteína de las microalgas *Schizochytrium* sp. y *Navicula* sp se utilizaron tres: 1:20, 1:50 y 1:100. Se prepararon 550 µl para cada dilución utilizando la muestra (extracto de proteína) y como complemento agua destilada, colocando 160 µl en la placa de ELISA y 40 µl de Bradford teniendo en total 200 µl, y realizando el ensayo por triplicado para cada dilución de cada extracto, se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se hizo la lectura en el espectrofotómetro.



## 7.- RESULTADOS

### 7.1 Establecimiento del cultivo de microalgas marinas

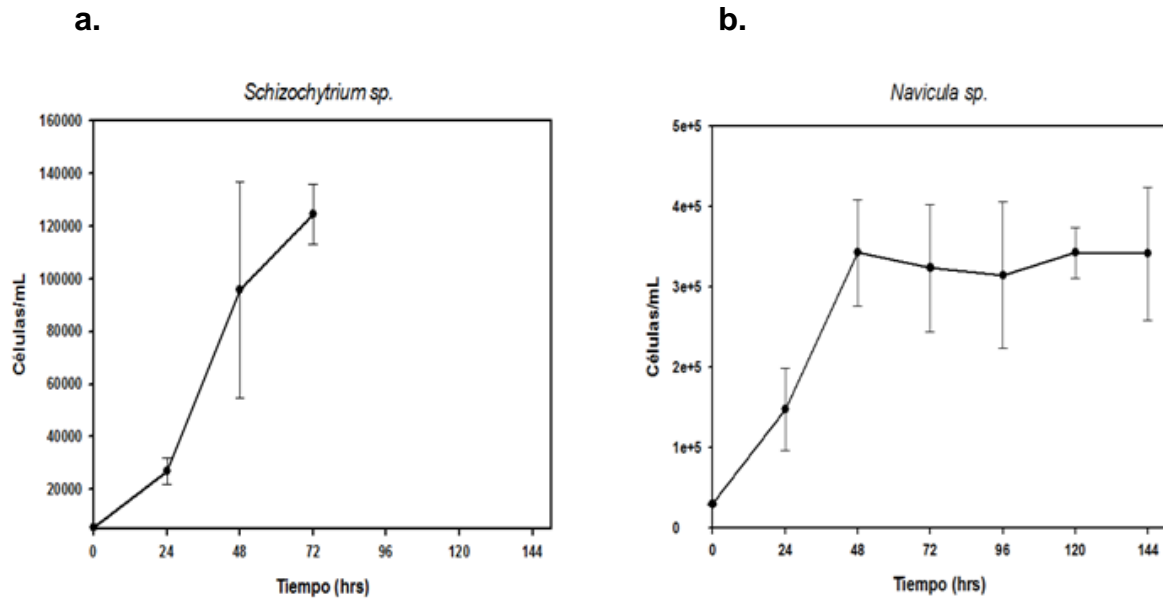
Se observó durante este bioensayo, que, tanto *Schizochytrium* sp y *Navícula* sp crecen en óptimas condiciones de luz y foto-periodos establecidos como se menciona en la literatura.

Durante el bioensayo del establecimiento del cultivo de las microalgas se observó, en el caso de *Schizochytrium* sp tiene una coloración verde, de un tamaño aproximado de 5.0 µm de diámetro para *Navícula* sp observándose una coloración parda con un tamaño aproximado de 2.0 a 3.0 µm.

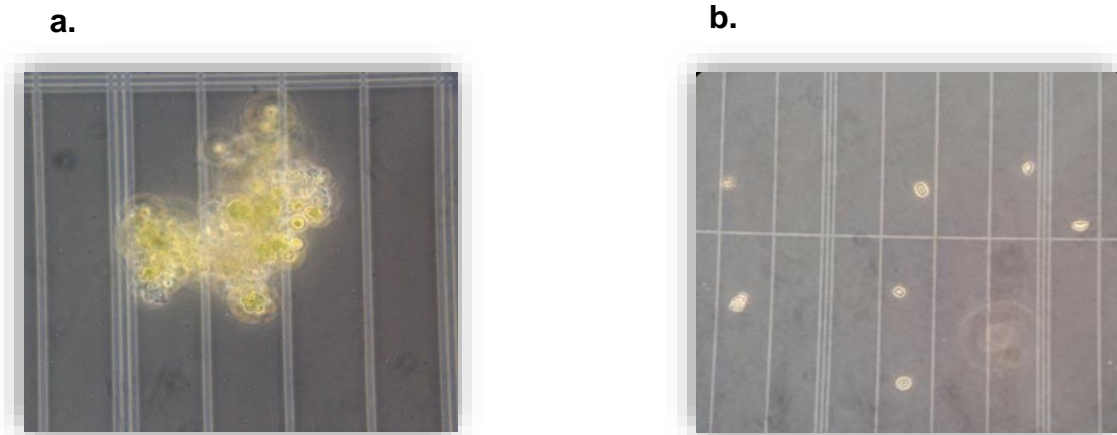
Se observó que se necesita un tiempo aproximado de 6-7 días para su buen crecimiento observando que se presenta la fase exponencial entre las 48 h y 72 h para *Schizochytrium* sp (ver figura 3), observando que a partir de las 72 horas hay un crecimiento pero las células forman conglomerados y disminuye el número de células individuales lo cual limita el conteo celular en los días posteriores a las 72 horas debido a estas aglomeraciones que se presentan. Obteniendo una densidad final de  $1.5 \times 10^6$  cels/ml para *Schizochytrium* sp (ver figura 4).

En cuanto a *Navícula* sp se observó que en el tiempo de 24-48 horas es el tiempo en donde se da el mayor crecimiento de células, para esta diatomea no se encontró problema en cuanto el conteo celular.

La cinética de estas microalgas se observó que es muy dependiente del medio de cultivo para su crecimiento y del tiempo del cultivo en la cual se obtenga la colecta para su transformación, ya que en los primeros días no hay un crecimiento abundante ni suficiente para proceder con algún otro bioensayo como extracción de ADN<sub>g</sub> al igual que en los últimos días después de que se observa la fase exponencial de crecimiento, tampoco es suficiente ya que el crecimiento disminuye y ya se observan células muertas.



**Figura 3.** Graficas de la cinética de crecimiento de cada microalga.  
**a.** *Schizochytrium* sp. **b.** *Navícula* sp.



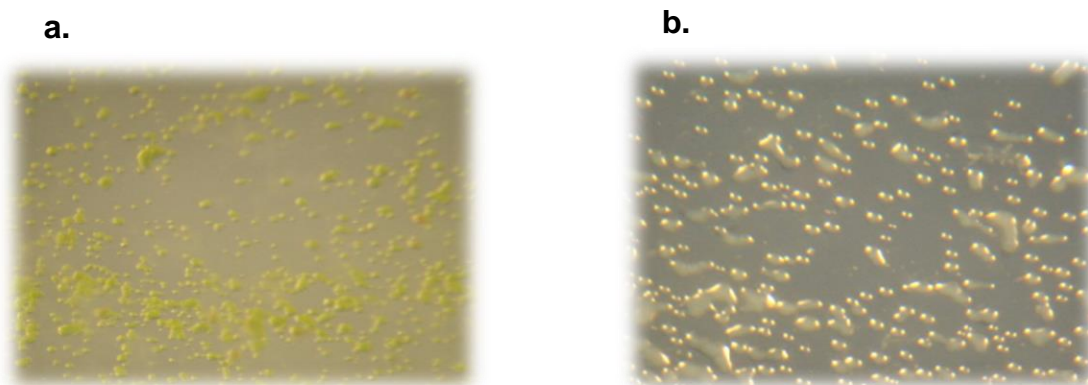
**Figura 4.** Fotografías al microscopio de las microalgas en la cámara de Neubauer.

- a.** Aglomeración de células de *Schizochytrium* sp.
- b.** Células distribuidas de *Navícula* sp

## 7.2 Bioensayo de resistencia a Higromicina (Hyg); Antibiótico de selección

Para este bioensayo se esperaba que las microalgas inhibieran su crecimiento celular en presencia del antibiótico de selección en el cual los genes de interés son resistentes.

Observándose que en el control (sin antibiótico) había un crecimiento normal de células, durante los 6 días que se mantuvo el cultivo en la cámara de cultivo para su crecimiento, sin embargo se obtuvo que tanto para *Schizochytrium sp* y *Navicula sp* en el medio F2 con las densidades celulares  $0.05 \times 10^6$  cels/ml,  $0.5 \times 10^6$  cels/ml y  $1 \times 10^6$  cels/ml con las cuatro concentraciones del antibiótico de selección 50, 100, 150 y 200 mg/L. Las microalgas en las concentraciones más bajas de antibiótico crecían en colonias de color blanco, aun con la concentración más alta de antibiótico de 200 mg/L (Figura 2), lo cual para este trabajo el que no hubiera crecimiento celular era de gran importancia ya que no podrían seleccionarse las líneas que eran resistentes al antibiótico. En las placas de este bioensayo que contenían medio F2 y antibiótico en diferentes concentraciones no mostraron diferencias significativas en cuanto al crecimiento celular a pesar de las variaciones en las densidades celulares y concentraciones de antibiótico higromicina B.

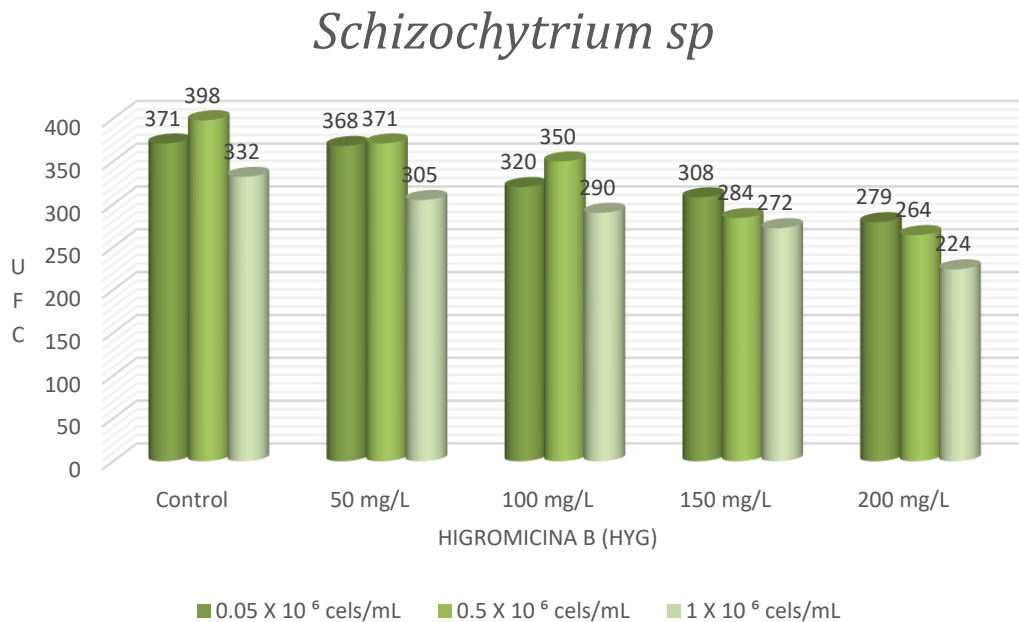


**Figura 2.** Crecimiento de colonias de microalga aún en presencia de antibiótico (200 mg/L) en medio F2.

**a.** *Schizochytrium sp*.

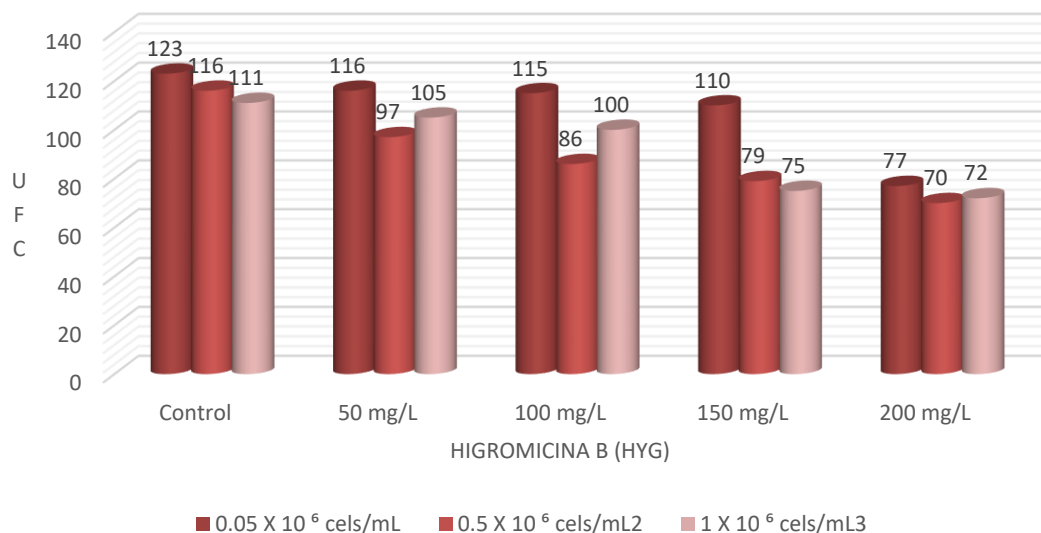
**b.** *Navicula sp*.

También se observó de manera específica el número de colonias que crecieron durante el bioensayo, mostrando que hay una tendencia proporcional en cuanto a la disminución del crecimiento celular con las densidades celulares y las concentraciones de higromicina B, de manera en que entre más concentración de antibiótico y mayor densidad celular hay un menor crecimiento celular, sin embargo el antibiótico no inhibió de manera total el crecimiento de las microalgas tanto para para *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp (Ver gráfica 1a y 1b).



**Gráfica 1a.** Relación del crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Schizochytrium* sp en medio F2 en presencia las concentraciones de higromicina B con 3 diferentes densidades celulares.

## *Navicula sp*

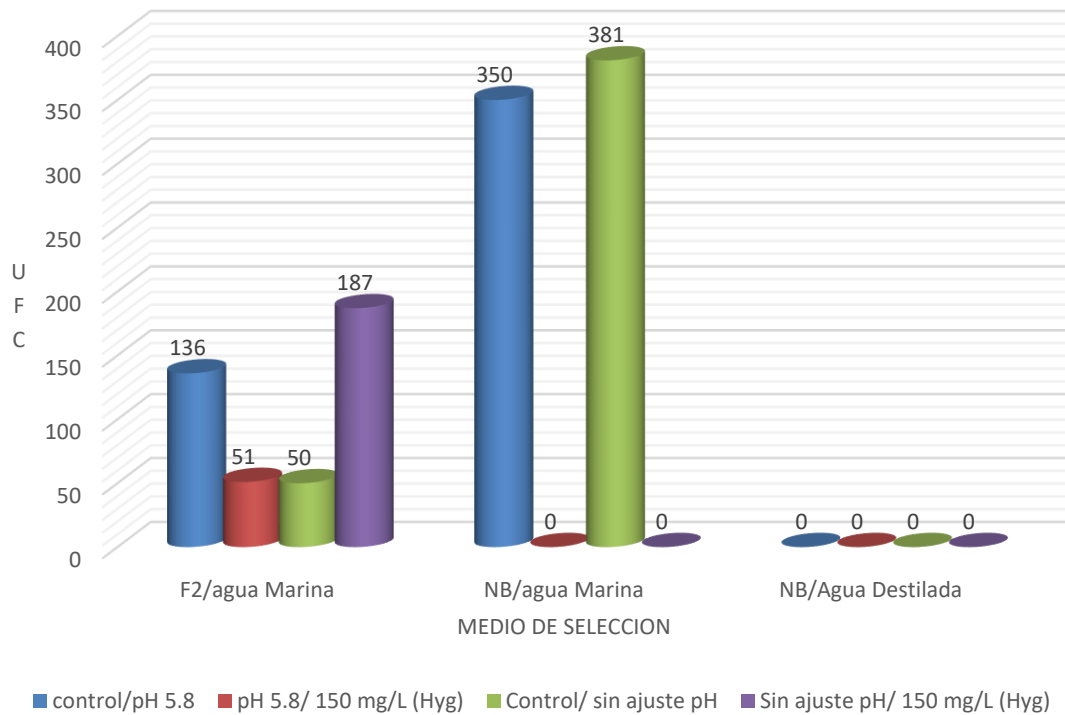


**Gráfica 1b.** Relación del crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Navicula sp* en medio F2 en presencia las concentraciones de higromicina B con 3 diferentes densidades celulares.

Ya que para este bioensayo se obtuvo que aun en la concentración más alta de antibiótico había crecimiento celular, se realizó un nuevo bioensayo donde cabe mencionar que se realizó con los dos medios pero utilizando como control al medio F2, realizando el bioensayo únicamente en la microalga *Schizochytrium sp* cambiando el medio de cultivo de F2 a Caldo nutritivo el cual se probó con las mismas concentraciones de antibiótico y densidades celulares, cambiando el medio, utilizando diferentes variantes como el pH y dos diferentes tipos de agua; agua marina y agua destilada. Combinando los parámetros con los dos tipos de agua y los medios de cultivo, y así determinar la concentración en donde se inhibía en crecimiento celular (Ver tabla 8).

**Tabla 8.** Bioensayo donde se probaron diferentes parámetros y medios para conocer cuál es el más óptimo para el crecimiento en presencia de antibiótico.

BIOENSAYO CON MEDIO F2 Y NB					
Medio		pH 5.8		Sin ajustar pH	
		0	[150 mg/L Hyg]	0	[150 mg/L Hyg]
Guillar F2	Agua Marina	136 ± 9	51 ± 22	50 ± 5	187 ± 15
Caldo nutritivo	Agua Marina	350 ± 16	0	381 ± 26	0
	Agua Destilada	0			



**Grafica 2.** Relación del crecimiento de las microalgas con diferentes medios de cultivo y diferentes parámetros para selección de transformantes.

Las colonias contadas en los dos medios de cultivo crecieron en cada placa con el antibiótico tanto para F2 como para NB, comprobando que el antibiótico de selección (Hyg) ,con las concentraciones y las densidades celulares, aun con 200 mg/L de higromicina había crecimiento celular con medio F2 dado que en los dos bioensayos realizados se probaron con pH ajustado y sin ajustar, utilizando agua marina y agua destilada para ver cuál era el medio óptimo para su crecimiento, a diferencia del bioensayo donde se utilizó caldo nutritivo (NB), en este bioensayo se observó que había crecimiento en 150 mg/L de colonias blancas sin coloración verde como las colonias normales de *Schizochytrium* sp las cuales indicaban que era poco el crecimiento celular cabe mencionar que para 200 mg/L ya no se mostraba crecimiento. Del cual se pudo seleccionar tanto el medio de selección, la concentración de resistencia a higromicina B y las densidades celulares para obtener las líneas de microalgas transformadas con los genes de interés de este trabajo.

Resultado del bioensayo

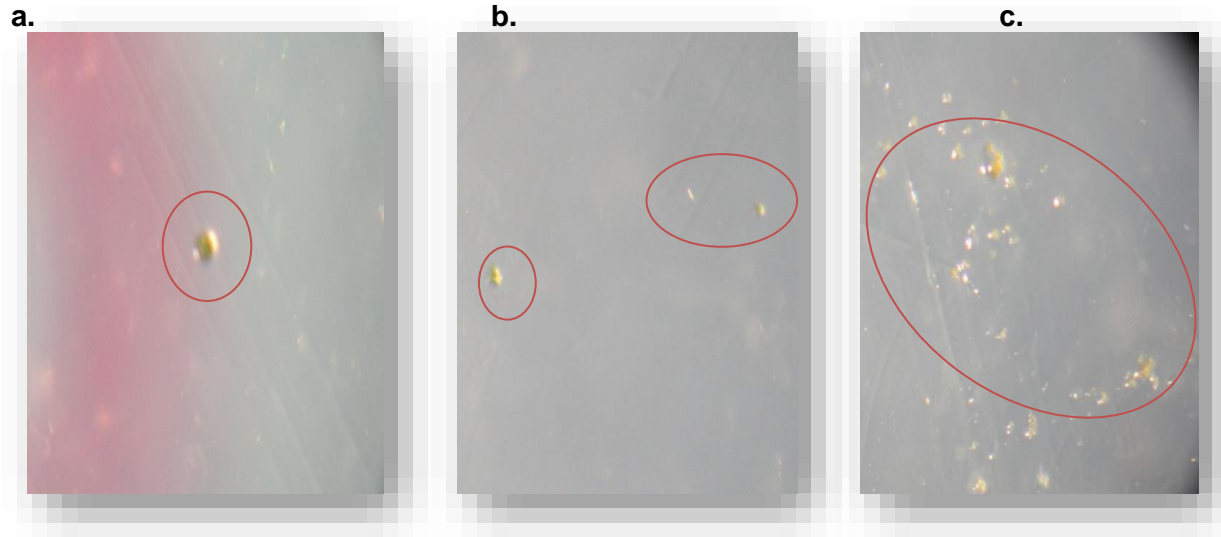
- El pH, uso de agua marina y destilada no fueron los factores en cuanto el crecimiento de las microalgas marinas con la concentración de antibiótico.
- No hubo presencia de colonias de microalgas en el medio NB/ Agua marina con [200 Hyg]

## **7.3 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES POR ELECTROPORACIÓN Y**

### ***A. tumefaciens***

#### **7.3.1 Transformantes por electroporación.**

Para la selección de transformantes; de las 20 colonias que se picaron y se pusieron a crecer con y sin antibiótico, posterior a los 6 días de crecimiento y de la individualización de cada clona, se obtuvo de *Schizochytrium* sp dos clonas identificadas como B-11 y B-12 y para *Navícula* sp se obtuvo una clona identificada como E-11, estas clonas se obtuvieron de la transformación únicamente de la construcción pMDC32::MAP86c. No se obtuvieron transformantes para la construcción pMDC32::MAP85b.



**Figura 3.** Clonas que se obtuvieron de la transformación por electroporación.

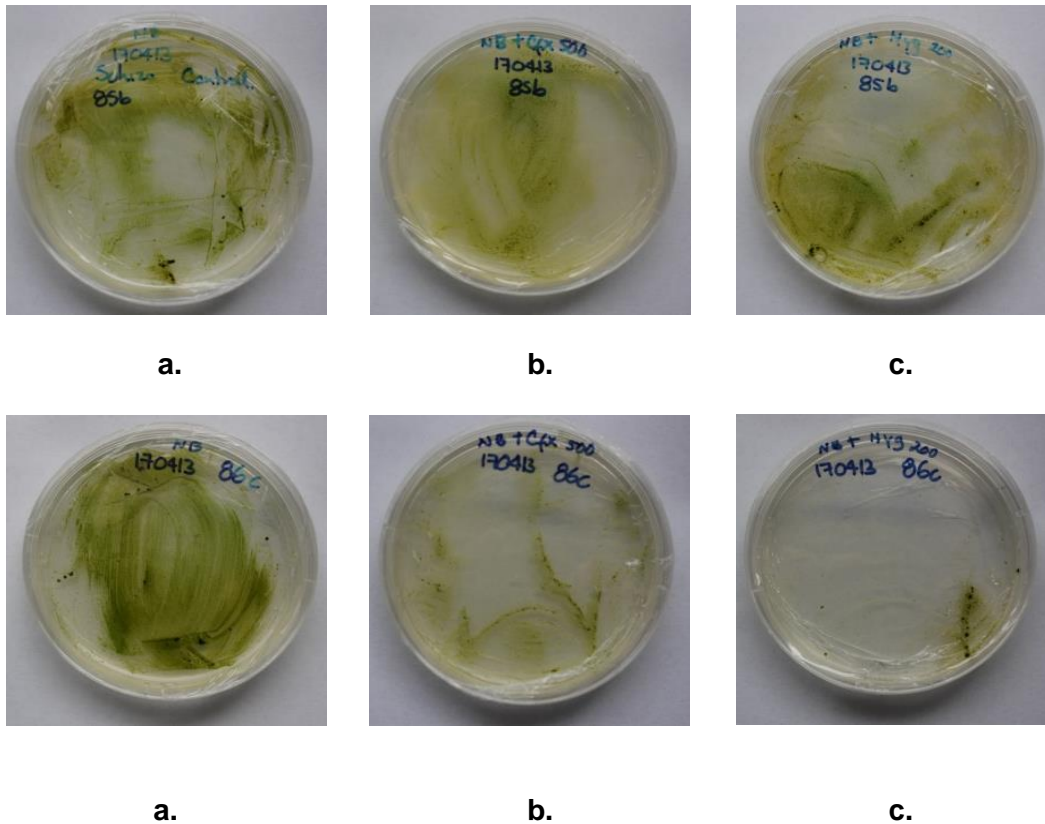
**a. y b.** Clona B-11 y clona B-12 de *Schizochytrium* sp respectivamente,  
**c.** clona E-11 de *Navícula* sp

Las clonas fueron tomadas para inocularlas en medio F2 para su rápido crecimiento celular, para su micro-escalado y obtención de biomasa para extracciones de ADNg.

### **7.3.2 Transformación de microalgas y obtención de Transformantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**

Los resultados de la transformación por *A. tumefaciens* fueron que después de los 6 días de incubación se notó que en las placas que tenían el medio NB que fueron utilizadas como control para cada construcción se notó que hubo un crecimiento abundante de la microalga ya que no se vio afectada por la presencia de ningún antibiótico (Ver figura 4).



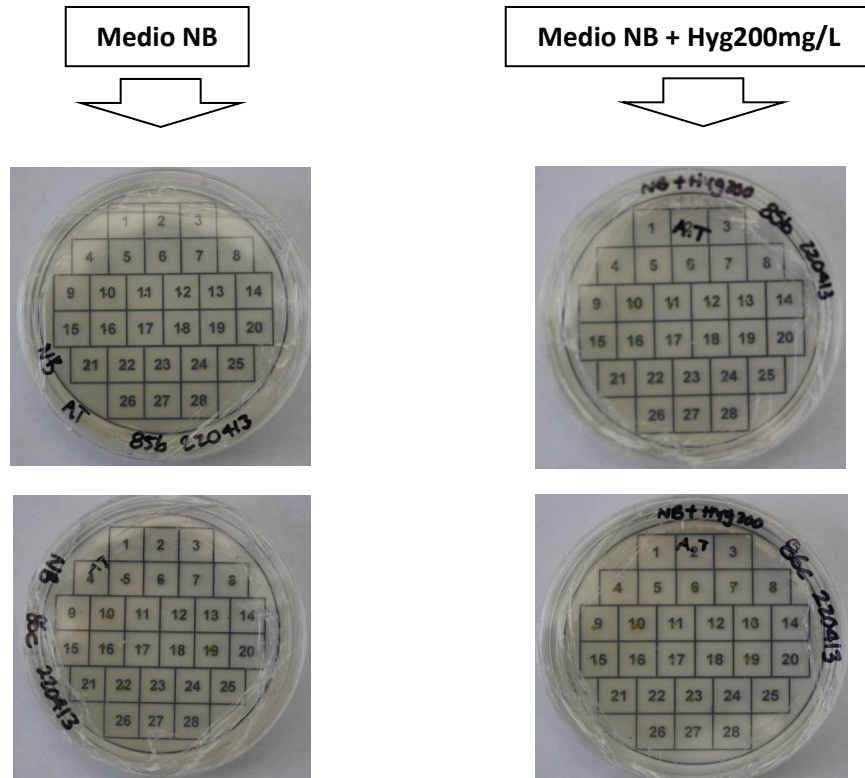


**Figura 4.** Construcciones genéticas en presencia de antibiótico con su respectivo control de la transformación por *A. tumefaciens*. **Arriba:** pMDC32::MAP85b, **Abajo:** pMDC32::MAP86c **a.** Control; NB, **b.** NB + Cfx 500mg/L, **c.** NB + Hyg 200mg/L.

En el caso de las placas que contenían medio NB + Cefotaxima [500 mg/L] se observó que únicamente creció la microalga sin la presencia de la bacteria que se utilizó para el co-cultivo de la transformación así mismo para utilizarla como un control de para saber si se había eliminado la bacteria de todas las placas que se crecieron con las microalgas después de la transformación.

En cuanto a las placas con medio NB + Hyg [200 mg/L] se observó que el crecimiento era escaso, por lo cual se dedujo que había gran posibilidad de que se haya logrado la transformación. De las 28 colonias picadas con 6 días de crecimiento y después de la individualización, se obtuvieron clones de las dos construcciones genéticas pMDC32::MAP85b y pMDC32::MAP86c, únicamente de la microalga *Schizochytrium* sp,

para la construcción pMDC32::MAP85b se obtuvieron 4 clonas identificadas como X-1, X-2, X-3 y X-4 y de la construcción pMDC32::MAP86c se obtuvieron 5 clonas identificadas como Y-1, Y-2, Y-3, Y-4 y Y-5 respectivamente para cada clona (Ver figura5).

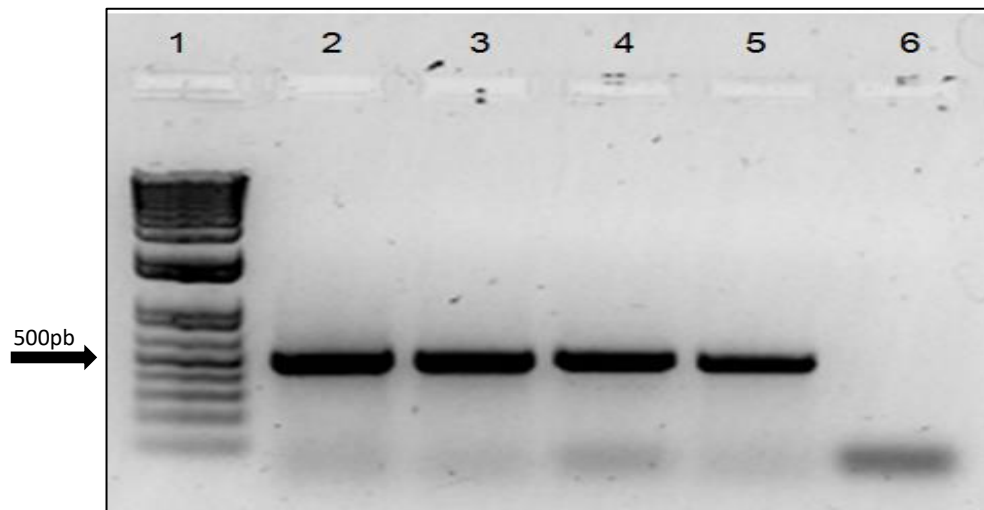


**Figura 5.** Placas de *Schizochytrium* sp. con colonias recuperadas de la transformación por *A. tumefaciens*. Arriba: pMDC32::MAP85b, Abajo: pMDC32::MAP86c.

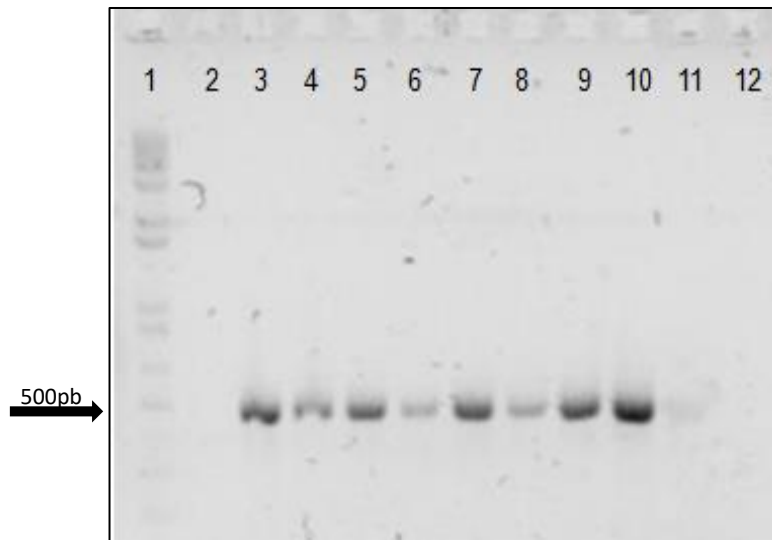
### 7.3.3 Verificación de transformantes de microalgas con los genes MAP1609c y MAP0586c

La verificación de microalgas transformadas se llevó a cabo, pero antes de realizar dicha verificación se hizo una extracción de ADN genómico por el método de CTAB. Una vez extraído el ADNg de las clonas obtenidas de cada especie de microalgas; *Schizochytrium* sp y *Navícula* sp de la transformación por electroporación, se realizó un PCR con los oligonucleótidos universales específico para microalgas; Univ F-1131 y Univ R-1629 (Troedsson *et. al* 2008) con el programa previamente seleccionado.

La confirmación de la transformación de los dos métodos se llevó a cabo por PCR punto final y con el ADN<sub>g</sub> se obtuvo el producto esperado de 500 pb, cabe mencionar que de la clona B-12 de *Schizochytrium sp* no se pudo extraer la suficiente biomasa algal para realizar la extracción y eso como consecuencia no logró amplificar ya que la concentración mínima para este trabajo era de 4.5 ng/μl lo cual ya se había realizado la cuantificación mínima para poder amplificar una reacción de PCR (Figura 6 y 7).



**Figura 6.** Comprobación de amplificación de la subunidad ribosomal 18S de *Schizochytrium sp* y *Navicula sp* presuntamente transformadas por electroporación, Gel de agarosa al 1%. PCR Universal.1, Marcador de peso Molecular Kb plus. 2, clona B-11 de *Schizochytrium sp*. 3, clona E-11 de *Navicula sp*. 4, Control (+) de *Schizochytrium sp* cepa silvestre (WT). 5, Control (+) de *Navicula sp* (WT). 6, control (-) Agua MilliQ.



**Figura 7.** Comprobación de amplificación de la subunidad ribosomal 18s de *Schizochytrium* sp y *Navícula* sp presuntamente transformadas mediante *A. tumefaciens*. Por PCR universal. Gel de agarosa al 1%. Las letras de la clave corresponden a la clave que se puso para diferenciar las construcciones genéticas: 1, marcador de peso molecular Kb plus. 2-6 son X1-X5 clonas de *Schizochytrium* sp respectivamente. 7-10 son Y1-Y4 de clonas de *Shizochytrium* sp respectivamente. 11, control (+) de *Schizochytrium* sp WT. 12, control negativo agua MilliQ.

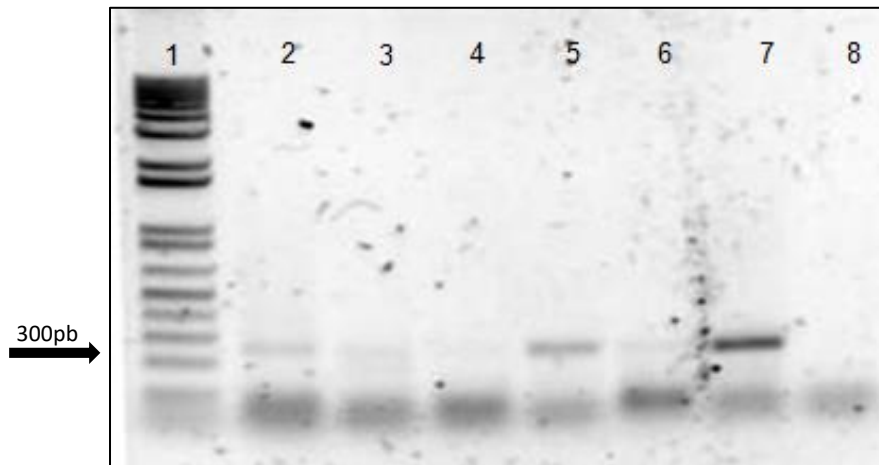
**X:** pMDC32::MAP85b

**Y:** pMDC32::MAP86c

Las 5 líneas obtenidas de MAP1609 (85b) y las 7 líneas de MAP0586 (86c) obtenidas de los dos métodos de transformación, crecieron en medio con Higromicina B; sin embargo únicamente fue posible la confirmación por amplificación del gen de 5 líneas provenientes del MAP1609 (85b) ya que se tuvieron dificultades para la confirmación de la transformación por electroporación, debido a que los tres pares de oligonucleótidos específicos para construcción pMDC32::MAP0586 que se tenían diseñados no amplificaron del tamaño del producto esperado, lo cual no nos confirmaba la inserción del gen, si no únicamente se llevó a cabo la confirmación por la selección de los transgenes en el medio de selección con el antibiótico higromicina B (200 mg/L).

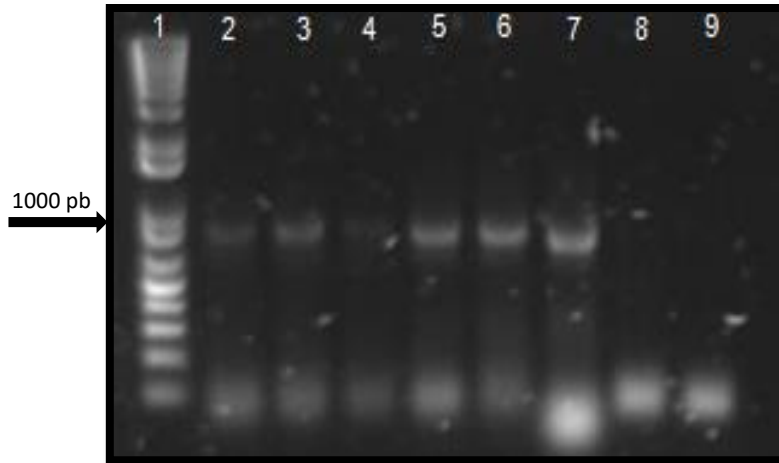
Por lo tanto para la confirmación por PCR específico de las 4 clonas obtenidas mediadas por *A. tumefaciens* únicamente obtenidas en *Schizochytrium* sp con la construcción

pMDC32::MAP0586 no se realizó PCR, ya que previamente se realizó con las de electroporación y no hubo amplificación (Figura 8).



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1%, donde se muestra que no amplifico los oligonucleótidos específicos MAP0586c con las clonas obtenidas por electroporación. 1, Marcador de peso molecular Kb plus. 2, *Schizochytrium* sp WT. 3, *Navicula* sp WT. 4-5 Clonas B-11 y B-12 de *Schizochytrium* sp respectivamente. 6, clona E-11 de *Navicula* sp. 7 control (+) L4 86c de alfalfa transformada con pMDC32::MAP0586. 8, Control (-) agua MilliQ.

En el caso de las 5 presuntas líneas transformadas de MAP1609 (85b) de *Schizochytrium* sp obtenidas mediante la transformación mediada por *A. tumefaciens* se confirmó la presencia del gen en todas las líneas con los oligonucleótidos específicos MAP85bXbaI reverse y forward ya que el producto esperado era de aproximadamente 1000 pb, además de que todas crecieron en presencia de antibiótico de selección por lo que podemos asumir que todas ellas se encuentran transformadas (Figura 9).



**Figura9.** Confirmación de líneas transformadas de *Schizochytrium* sp con MAP1609 (85b) por *A. tumefaciens*. Se muestra el producto de ~1,000 pb. 1, marcador de peso molecular Kb plus. 2-6 clonas de *Schizochytrium* sp. 7 control (+) Plásmido MAP85b. 8, control (-) *Schizochytrium* sp WT. 9, control (-) agua MilliQ. Gel agarosa al 1%.

#### 7.4 Extracción y cuantificación de proteína total de *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp

Los extractos de proteína, de los tres métodos probados, 1) sonicación, 2) perlitas de vidrio y 3) maceración de células con pistilos. Se obtuvo de la extracción únicamente de la cepa silvestre de *Schizochytrium* sp ya que sólo se estaba probando la eficiencia del método de extracción, las siguientes concentraciones de µg/ml.

Se observó que no hay diferencias significativas en cuanto a la cuantificación de las de las extracciones en los tres diferentes métodos ya que en los tres había una concentración proteína de 0.250 µg/µl para la dilución 1:20, 0.504 µg/µl para la 1:50 y 1.231 para la dilución 1:100.

**Tabla 8.** Cuantificaciones de proteína total de *Schizochytrium* sp WT por los tres métodos probados para la extracción.

1) Sonicación: concentraciones obtenidas con las tres diferentes diluciones 1:20, 1:50 y 1:100

Muestra	1:20	1:50	1:100
Abs 595 nm (réplicas)	0.353	0.352	0.359
	0.351	0.349	0.361
	0.333	0.294	0.319
Promedio	0.345	0.331	0.346
Conc. µg/ml	12.423	11.709	12.457
Conc. µg/µl	0.248	0.585	1.245

2) Método perlitas de vidrio

Muestra	1:20	1:50	1:100
Abs 595 nm (réplicas)	0.354	0.331	0.346
	0.331	0.342	0.345
	0.374	0.342	0.332
Promedio	0.353	0.338	0.341
Conc. µg/ml	12.797	12.049	12.185
Conc. µg/µl	0.255	0.240	1.218

3) Método maceración de células con pistilos

Muestra	1:20	1:50	1:100
Abs 595 nm (réplicas)	0.359	0.369	0.375
	0.349	0.373	0.342
	0.329	0.374	0.319
Promedio	0.345	0.372	0.345
Conc. µg/ml	12.423	13.767	12.406
Conc. µg/µl	0.248	0.688	1.240

De acuerdo a las cuantificaciones obtenidas de los tres métodos se optó por la sonicación como método de extracción ya que el protocolo estaba más estandarizado y era mucho más práctico.

Las cuantificaciones de las líneas ya confirmadas con la inserción del gen se realizaron por sonicación como ya se ha mencionado

Se realizó la extracción de las 5 clonas de 85b y de las 7 de 86c de *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp incluyendo en la extracción a las cepa silvestre de cada especie, tomando en cuenta la dilución 1:20 como la más óptima para posteriores ensayos como ELISA e inmunoblot.

**Tabla 9.** Concentraciones de proteína total en ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de las líneas transgénicas obtenidas

Muestra /Especie	Línea	Antígeno	[ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
<i>Schizochytrium</i> sp	WT	-	0.4614
	X-1	85b	0.1125
	X-2	85b	0.0929
	X-3	85b	0.0933
	X-4	85b	0.0996
	X-5	85b	0.1146
	B-11	86c	0.3644
	B-12	86c	0.2549
	Y-1	86c	0.1531
	Y-2	86c	0.1551
	Y-3	86c	0.1519
	Y-4	86c	0.1427
	<i>Navicula</i> sp	WT	-
E-11		86c	0.9738



## 8. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, las microalgas marinas son organismos que necesitan de condiciones específicas para su crecimiento como lo son la luz, el pH, la temperatura, entre otras, lo cual *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp las cuales son alga verde y diatomea respectivamente necesitan de ciertas condiciones para su crecimiento lo cual concuerda con Brown *et al.*, (1989).

En cuanto al crecimiento de las microalgas, la microalga *Schizochytrium* sp a diferencia de *Navicula* sp mostró un crecimiento temprano, a los 2 días demostrando que la cinética de crecimiento es mucho mayor a comparación de la diatomea que es de 4 días. Se observó que la cinética de crecimiento es dependiente del medio de cultivo para su crecimiento y del tiempo en que se haga la colecta para su transformación

Para la cuantificación celular *Schizochytrium* sp mostró aglomeraciones a las 72 horas posteriores al inicio de la incubación celular, lo que no permitía la cuantificación, probándose diluciones diferentes para separar las células aglomeradas, lo cual no mostro diferencia en la separación de las células para su cuantificación, adicionalmente se comenta que la ausencia de silicatos en el medio F2 no presenta ninguna diferencia significativa en cuanto a su crecimiento, al final de los conteos se obtuvo una densidad celular de un aproximado de  $2.5 \times 10^6$  cels/ml al cabo de 6-7 días para las dos microalgas. Observando también que las células tomaban una coloración verde en el caso de la alga verde *Schizochytrium* sp y color pardo en la diatomea *Navicula* sp. también se pudo observar que el movimiento de los cultivos no afectaba de manera significativa si se mantenían en movimiento constante en un agitador a 100 rpm como lo menciona Wang y colaboradores en el 2007 o si únicamente se movían los cultivos una vez al día para permitir su homogenización y evitar la sedimentación de las células.

Para la cuantificación celular y cinética de crecimiento hasta la fecha no hay reportes para estas microalgas.

Durante el ensayo de resistencia a higromicina B que es el antibiótico de selección, se observó que para el medio de selección de transformantes, el F2 Guillard adicionado con una concentración de 200 mg/L de Hyg permitía el crecimiento celular de manera muy buena y con mucha eficiencia, lo cual para este proyecto ese medio y con esas

condiciones no era óptimo para la selección de transformantes por lo que se optó por el Caldo nutritivo (NB) con un pH normal en el agua marina que va de 7 a 8, en el cual con la misma concentración de antibiótico si había una inhibición en el crecimiento celular lo cual nos permitía seleccionar las líneas que contenían el gen de interés, aunque cabe mencionar que para crecer los cultivos para las extracciones de ADN y de proteína el medio F2 era el indicado para un rápido crecimiento celular, por lo cual después de cada selección de transformantes en medio NB con Hyg, la individualización de las clonas y su escalado para posteriores bioensayos se realizó en medio ese medio.

En cuanto a las densidades celulares no hubo utilizadas no hubo diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de crecimiento en presencia del antibiótico, lo cual se puede deber a que los nutrientes que le brinda el medio F2 a las células aumentan en gran manera el crecimiento de las mismas, a pesar de la concentración tan elevada de antibiótico de 200 mg/l a diferencia de los reportes con la microalga *Chlorella sp* donde se reporta una concentración de 50mg/l como concentración máxima para inhibir el crecimiento celular de células transformadas por electroporación, reportado por Wang *et al* en el 2007.

En cuanto a los parámetros usados para la electroporación de las células se observó que el modelo de electroporador, el voltaje, así como la resistencia y la capacitancia son parámetros que determinan la capacidad de transformación como lo menciona Wang y colaboradores en el 2007.

La intensidad del pulso está determinada por el voltaje aplicado y la conductividad del medio. El grado de permeabilidad de la membrana, por su parte, depende del campo eléctrico aplicado y del tipo celular. Altos niveles de permeabilidad facilitan la entrada del ADN, pero disminuye la viabilidad de las células, lo cual en este estudio se mostró que la permeabilidad de las células es relativamente baja y que se permitió la entrada del ADN, lo cual muestra una viabilidad de las células, sin embargo; no garantiza la producción de la proteína de interés, lo cual deja abierto el panorama para posteriores estudios en la traducción de la proteína.

La transferencia del T-DNA es un proceso conocido y regulado, cuyo éxito depende de múltiples factores relacionados tanto con la propia bacteria como con el material vegetal

a infectar (Valderrama *et al.*, 2005; Birch, 1997; Potrycus, 1991). Se ha descrito que el pH ácido en el medio de cultivo induce la expresión de los genes *vir* de *A. tumefaciens* (Lin *et al.*, 2008; Kumar & Rajam, 2007). Del mismo modo, la adición de AS se suele relacionar con una mayor virulencia de *A. tumefaciens*, aunque esto no es indispensable cuando las propias células liberan compuestos fenólicos, tal como ocurre con los sistemas vegetales (Gelvin, 2000). Se ha demostrado que la expresión de los genes *vir*, indispensables para iniciar el proceso de infección de *A. tumefaciens*, está afectada por numerosos factores como las condiciones físico-químicas del medio de cultivo, la presencia de compuesto fenólicos como AS, o el tiempo de contacto de *Agrobacterium* con el huésped (Rámirez *et al.*, 2009). La eficiencia de transformación en este trabajo se observó que en este trabajo la eficiencia de transformación obtenía por *A. tumefaciens*, es menor a comparación de lo obtenido por Ikarán en el 2011 donde hace una transformación genética *Neochloris oleoabundans* mediada por *A. tumefaciens*.

Por lo tanto y de acuerdo al número de líneas transgénicas obtenidas por los dos métodos de transformación la eficiencia más alta de transformación se obtuvo mediante la electroporación ya que se obtuvieron más clonas de ese método a diferencia de la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

No se encontraron registros en la literatura citada de eficiencias de transformación utilizando pMDC32 en microalgas transformadas.

En cuanto a las líneas obtenidas en este trabajo con las construcciones utilizadas genéticas de pMDC32::MAP1609 y pMDC32::MAP0586 hubo una transformación con las mismas de manera exitosa al igual que en el trabajo de Celis en el 2012 donde transformó de manera estable a alfalfa con estas construcciones que codifican a misma proteína de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* donde se utilizó como un sistema de expresión de los antígenos vacúnales.

La confirmación de las microalgas realizada por PCR no se confirmó para la construcción pMDC32::MAP0586c ya que los oligonucleótidos específicos no amplificaron el producto esperado como también se confirma en el trabajo realizado por Celis en 2012, donde las líneas de alfalfa transformada con esta construcción únicamente se confirmaron por medio de selección. A diferencia de la construcción pMDC32::MAP1609c que se confirmó por medio de selección y con PCR punto final.

Para la producción de antígenos en *Schizochytrium* sp se obtuvo que la proteína total obtenida de las líneas transgénicas es de ~1ug/gl de proteína total soluble en comparación a la producción de proteína de otras microalgas como menciona Gregory et al, en el 2012 donde produjeron una proteína de superficie Pfs25 y Pfs28 de *P. falciparum* en *C. reinhardtii*. Lo cual muestra como un sistema de expresión recombinante a las características que posee *Schizochytrium* sp, como la flexibilidad de la pared celular y la motilidad, que pueden contribuir a la exportación o extrusión de complejos a la membrana (Perkins, 1972).

Para *Navicula* sp, no se encontraron registros de transformación por *A. tumefaciens*, ni registros de extracción de proteína total soluble.

## 9. CONCLUSIONES

- El medio de selección NB para microalgas marinas suele presentar buenas perspectivas para la selección de transformantes en microalgas marinas en presencia de antibiótico
- La transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* representa un buen modelo para la producción de proteínas heterólogas, ya que tiene mayor eficiencia de transformación en comparación con la electroporación.
- La sonicación representa un buen método de extracción de proteína total soluble en microalgas.
- Las microalgas marinas representan un buen sistema de expresión y producción debido a su rápido crecimiento, en cuanto a *Schizochytrium sp* y *Navicula sp.* representan microalgas con características para su fácil escalado y su producción de vacunas recombinantes.
- Los oligonucleótidos utilizados que amplifican la subunidad ribosomal 18S en microalgas marinas se considera una buena herramienta para amplificar regiones de microalgas.
- La presencia del transgén fue confirmada en la transformación utilizando el medio de selección y técnicas moleculares como PCR, con la construcción genética pMDC32::MAP1609c excepto con la construcción pMDC32::MAP0586c.

## **10. PERSPECTIVAS:**

Se espera que mediante los análisis inmunoprotéomicos, las líneas de microalgas marinas transformadas; *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp sean un modelo eficiente no solo con la presencia del gen de interés sino también de traducción y representen un buen sistema para la producción de la proteína de interés con las construcciones pMDC32::MAP85b y pMDC32::MAP86c, y así mismo para la producción de vacunas recombinantes de aplicación oral en futuros trabajos, haciendo retos para confirmar su nivel de inmunogenicidad.

## 11.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. (2003) Cellular and Molecular Immunology, 4th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Barclay W, Weaver C, Metz J (2005) Development of a docosahexaenoic acid production technology using *Schizochytrium*: a historical perspective. In: Ratledge C, Cohen Z editors. Single Cell Oils. Champaign: AOCS Press 36–52
- Barclay, W. (1992) Process for the Heterotrophic Production of Microbial Products with High Concentrations of Omega-3 Highly Unsaturated Fatty Acids, U.S. patent 5,130,242. U.S. Patent Office, Washington, DC.
- Bayne A-CV, Boltz D, Owen C, Betz Y, Maia G, et al. (2013) Vaccination against Influenza with Recombinant Hemagglutinin Expressed by *Schizochytrium* sp. Confers Protective Immunity. PLoS ONE 8(4): e61790.
- Beard, P. M., K. Stevenson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. M. Rhind, M. C. Sinclair, L. A. Wildblood, D. G. Jones, and J. M. Sharp (2001) Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Clin Micro-biol. 39:3080-3084.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Brányiková I, Marnáľková B, Doucha J, Brányik T, Binová K, Zachleder V, Vítová M (2011), Microalgae—novel highly recient starch producers. Biotechnol Bioeng
- Cavalier-Smith, T.; Allsopp, M. T.; Chao, E. E. (1994) Thraustochytrids are chromists not fungi: 18s rRNA signatures of Heterokonta. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, 346, 378-397.
- Cheng R, Ma R, Li K, Rong H, Lin X, Wang Z, Yang S, Ma Y. (2012). Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. Microbiol Res. 2012 Mar 20;167(3):179-86.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR y Coutu JA. (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. J.Clin.Microbiol., 20(5):966-71.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. (1994) Paratuberculosis. Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology ;7 :328-345.

- Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, Hoiby N, Harms BA, Thomsen OO, Skibsted U y Binder V. (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J.Clin.Microbiol.*, 38(12):4373-81.
- Costa JAV, de Morais MG (2010) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol* 102:2–9
- D. yero corona, (2005) De la secuencia de un Genoma Bacteriano a la identificación de candidatos vacúnales. Instituto Findlay, centro de investigación-producción de vacunas.
- De Zoete M, Cavaignac SM. (2002) *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol.*
- Demurtas, O. C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R., and Giuliano, G. (2013). A *Chlamydomonas* -derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS ONE* 8:e61473. doi: 10.1371/journal.pone.0061473
- Donghee Cho, Sung-Jae Shin. (2007). Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Sciencedirect*
- Dreesen, I. A., Charpin-El Hamri, G., and Fussenegger, M. (2010). Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J. Biotechnol.* 145, 273–280. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009. 12.006
- Fabio Bagnoli, Barbara Baudner. (2007), Designing the Next Generation of Vaccines for Global Public Health A Journal of Integrative Biology Fletcher
- Fan, K. W.; Chen, F. (2006) Production of high-value products by the marine microalgae thraustochytrids. In *Bioprocessing for Valueadded products from renewable resources*; Yang, S. T., Ed.; Elsevier Science: New York; Chapter 11.
- Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V, Farley JE, Howell A, Knauf M *et al.* (2004) Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun*; 72(4):2088-2100.
- Geng, D. G., Wang, Y. Q., Wang, P., Li, W. B., and Sun, Y. R. (2003). Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 15, 451–456. doi: 10.1023/B:JAPH.0000004298.89183.e5
- Gregory, J. A., Li, F., Tomosada, L. M., Cox, C. J., Topol, A. B., Vinetz, J. M., *et al.*



- Guillard, R. R. and Ryther, J. H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8: 229-239.
- Honda, D.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Raghukumar, S.; Nakagiri, A.; Schaumann, K.; Higashihara, T. (1999) Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. J. Eukaryotic Microbiol. , 46,637-647.
- Janis Kuby; Thomas J. Kindt. (2007) Panorama general del sistema inmunitario, En Thomas J. Kindt. Inmunología de Kuby (6a edición). México: McGraw-Hill interamericana. pp. 1-22.
- John P. Bannantine and Michael L. Paustian (2005) Identification of Diagnostic Proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by a Whole Genome Analysis Approach
- John P. Bannantine, Valentina Rosu, (2005) Antigenic profiles of recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease
- Joilyne Ferreira, (2008) Vacunas derivadas del análisis de los genomas: Vacunología inversa. Sciencedirect
- Kohler H, Gyra H, Zimmer K, Drager KG, Burkert B, Lemser B, et al. (2001) Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health;48(3):185–95.
- Kroger, N., Deutzmann, R., & Sumper, M. (1999). Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. Science, 286, 1129-1132.
- Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao RJ, Rajam MV. (2004) Genetic transformation of the green algae-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci 166:731– 738
- Levy-Frebault, V.V., Portaels, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 315-323.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, et al. (2005) The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA; 102:12344-9.
- Loera, Q.M y E.J. Olguin,. (2010) Las microalgas aleaginosas como fuente de Biodiesel; retos y oportunidades. Revista de Biotecnología ambiental y algal 1:91-116

- Mata, T. M., A.A Martins y N.S. Caetano.. (2010) Microalgae for Biodiesel Production and other applications: A Review, en *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232.
- Mayfield, S. y S. Franklin (2005), "Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae" *Vaccine*, 23, 1828-1832
- Mayfield, S., S. Franklin y R. Lerner (2003), "Expression and assembly of a fully active antibody in algae", *PNAS*, 100(2), 438-442.
- Merkal, R.S. (1984) Paratuberculosis: advances in and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*
- Merkal, R.S., Whipple, D.L., Sacks, J.M., Snyder, G.R. (1987) Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States.
- Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgae oil. *Bioresource Technology*, 97, 841–846.
- Morris CR, (2004) Reber AJ, Petersen JL, Vargas SE, Solheim JC. Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. *Immunol Res.*
- Morrison, N.E. (1995) Circumvention of the mycobactin requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.*
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F.. (2004) Culture of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease.
- Olsen, I., Johansen, T.B., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S.F., Djonne, B. (2004). A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 98, 297-306.
- Perkins FO, Amon JP (1972) The ultrastructure of holdfasts, "rhizoids" . And "slime tracks" in thraustochytriaceous fungi and *Labyrinthula* spp. *Arch Mikrobiol* 84: 95–118. doi: 10.1007/BF00412431. PLoS ONE 7:e37179. doi: 10.1371/journal.pone.0037179
- Popovich, C. A., Damiani, C., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2012). Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): Evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1–10.

- Portaels, F. (1995). Epidemiology of mycobacterial diseases. Clin. Dermatol. 13, 207-222.
- Potvin G, Zhang Z (2010), Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. Biotechnol.
- Rappuoli R. (2001) Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. Vaccine; 19(17-19):2688-2691
- Roessler PG, Matthews TD, Ramseier TM, Metz JG (2006) Product and process for transformation of Thraustochytriales. US Patent No. 7,001,772.
- Rosa Leon and Emilio Fernandez. (2007) Nuclear Transformation of Eukaryotic Microalgae Historical Overview, Achievements and Problems. chapter 1, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media
- Roupie V, Leroy B, Rosseels V, Piersoel V, Noël-Georis I, Romano M, Govaerts M, Letesson JJ, Wattiez R, Huygen K. (2008) Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding MAP0586c and MAP4308c of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* secretome. Vaccine. 2;26(37):4783-94.
- Roupie V, Viart S, Leroy B, Romano M, Trincherro N, Govaerts M, Letesson JJ, Wattiez R, Huygen K. (2012) Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and Map infected mice. Vet Immunol Immunopathol. 15;145(1-2):74-85.
- Ryan KJ, (2004), Ray C, Sherris Medical Microbiology (4th ed. edition). McGraw Hill.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Beneman, J. & Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. US Department of Energy.
- Shin, S.J (2005)., Chang, C.F., Chang, C.D., McDonough, S.P., Thompson, B., Yoo, H.S. and Chang, Y.F. In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Infection and Immunity
- Skulberg OM. (2008) Bioactive chemicals in microalgae, In: Richmond A, ed. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Soria-Guerra, R. E., Ramírez-Alonso, J. I., Ibáñez-Salazar, A., Govea-Alonso, D. O., Paz-Maldonado, L. M. T., Bañuelos-Hernández, B., *et al.* (2014). Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in *Chlamydomonas reinhardtii* as a candidate hypertension vaccine. Plant Cell Tissue Organ Cult. 116, 133–139. doi: 10.1007/s11240-013-0388-x

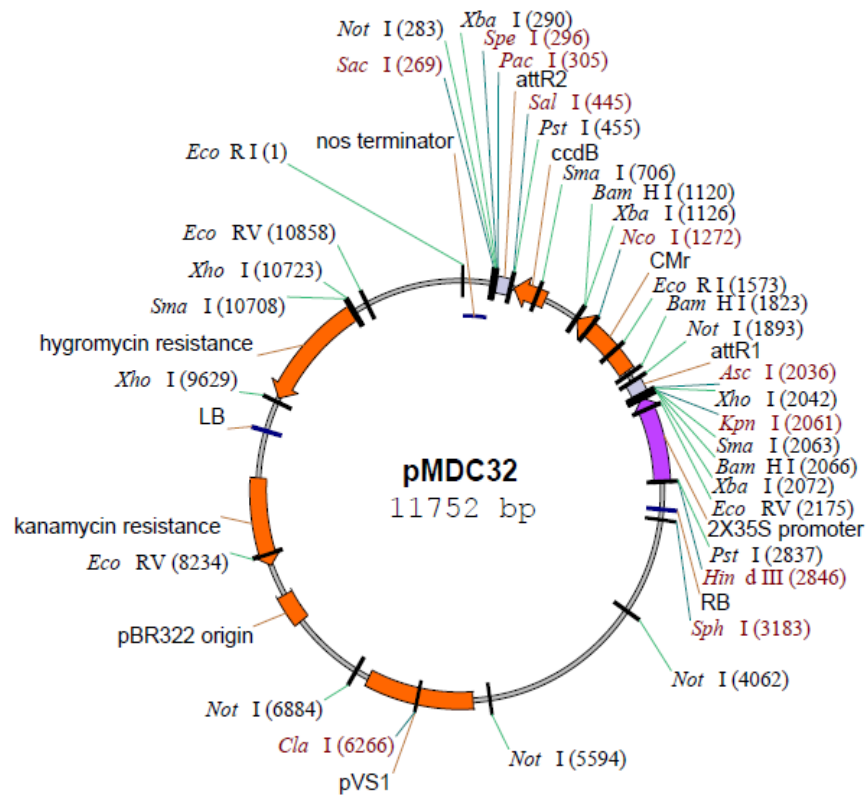
- SP, Muto M, Mayfield SP, (2007) Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae. *Advances in experimental medicine and biology*, vol 616: transgenic microalgae as green cell factories. Landes Bioscience and Springer Science Business Media LLC, New York, NY, pp 90–98
- Specht E, (2010), Miyake-Stoner S, MayWeld SP Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*.
- Sun, M., Qian, K. X., Su, N., Chang, H. Y., Liu, J. X., and Chen, G. F. (2003). Foot and mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol. Lett.* 25, 1087–1092. doi:10.1023/A:102414011450
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J. D., et al. (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 37, 133–138. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.005
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 254-260.
- Timpe, A., Runyon, E.H. (1954) The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 202-209.
- Troedsson C, Lee RF, Stokes V, Walters TL, Simonelli P, Frischer ME. (2008) Development of a denaturing high-performance liquid chromatography method for detection of protist parasites of metazoans. *Appl Environ Microbiol.* Jul;74(14):4336-45.
- Valentin-Weigand P., Goethe R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infection.* 1: 1121-1127.
- Valérie Rosseels and Kris Huygen. (2011), *Mycobacterial Immunology*, Expert Review, Vaccines 7(6), 817 – 832 (2008). Volume 15, Number 9,
- Wang C, Wang T, Su Q, Gao X (2007) Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation. *Biotechnol Bioprocess Eng* 12:180–183
- Wentink GH, Bongers JH, Zeeuwen AA, Jaartsveld FH (1994). Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl Veterinarmed*;41(7–8):517–22.

Yokomizo, Y., Merkal, (1983) R.S., Lyle, P.A.. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 44, 2205-2207.

Ziortza Ikarán Zugazaga, Chantanachat & H.C. Bold (2011). Transformación genética de *Nanochloris oleoabundans* S. (clorofita) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de master en Biotecnología. Universidad pública de Navarra.

# ANEXOS

## ANEXO I. Vector de clonación pMDC32



## ANEXO II. Secuencias de Oligonucleótidos

a) Secuencias de oligonucleótidos universales para microalgas

Primer's	Secuencia
<b>Univ F-1131</b>	AAA CTY AAA GRA ATT GAC GG
<b>Univ R-1629</b>	GAC GGG CGG TGT GTR C
<b>Bases degeneradas: Y representa C o T; R representa A o G.</b>	

## b) Secuencias de oligonucleótidos específicos

Primer's	Secuencia
<b>MAP86c R</b>	5'TATAAGAATTCTGCGGGTGCGCCGCCACGTAGTCGG
<b>MAP86C F</b>	5' GGAAGATCTTGGTGAGCAATCGGCGCACC
<b>MAP85bXbaI F</b>	5' GTTACCGCAGTACACCCACAG
<b>MAP855bXbaI R</b>	5' CCCGACCAATTCATCTATGC

## ANEXO III. Secuencias de los genes utilizados

### a) Secuencia Del gen MAP1609c

MAP1609c - Péptido señal 876 pb (32.12 kD)

```
GTTTTTCGCGTCCGGGCCTGCCCGTCGAGTACCTGCAGGTGCCCTCCGCGGGAATGGGCCGCGACATCAAGGTCCAGT
TCCAGAGCGGGCGGCAACGGCTCCCCCGCGGTGTATCTGCTGGACGGCCTGCGGGCTCAGGACGACTACAACGGCTGG
GACATCAACACCCCGGCCTTCGAGTGGTACTACCAGTCCGGCCTGTGCGGTGATCATGCCCGTCGGCGAACAGTCCAG
CTTCTACGCGGACTGGTACCAGCCCGGTGCGGCAAGGCCGGTTGCTCCACTTATAAGTGGGAGACCTTCCTGACCA
GCGAGCTGCCGTCGTACCTGGCCTCCAACAAGGGTGTGAAGCGCACCGGCAGCGCCGAGTCGGCATTTCGATGTCC
GGATCCTCGGCGATGATCCTGGCCGTCAACCATCCCGACCAATTCATCTATGCCGGATCGCTCTCGGCGCTGCTCGA
CCCGTCCCAGGGCATGGGGCCGTGCTGATCGGTCTGGCGATGGGTGACGCCGGCGGCTACAAGGCCGACGCCATGT
GGGGCCCGTCCAGCGACCCGGCCTGGCAGCGCAACGACCCGAGCCTGCACATCCCGAGCTGGTTCGGCCACAACACC
CGGCTGTGGGTGTACTGCGGTAACGGGACACCGTCGGAGCTGGGTGGCGCCAACATGCCCGCCGAGTTCCTGGAGAA
CTTCGTGCGCAGCAGCAACCTGAAGTTCAGGACGCCTACAACGGCGCCGGCGGCCACAACGCCGTGTTCAACTTCA
ACGCCAACGGAACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGAGCCAGCTCAACGCCATGAAGCCCGACCTGCAGGGCACCCCTG
GGCGCTCCCCGGGCGGCGGCGGATAA
```

### b) Secuencia Del gen MAP0586c

Gen + Péptido señal 942pb (34.54 kD)

```
GTGAGCAATCGGGCGCACCGCACCCTCGTCGCCCGCGCGGTCTGGTTCGCGCTCGCCGGCTGTTTCGCCGT
CGCACCCGTCGGCCGCGCCGCGCCCAACCGCGACGCGGACCGCCGCGCCCTCGGGCGCCGGCGTTCGCGAAT
GCTGCCCCGCGACGCGGATACGCCCCGGTGGCGCGCAGCCGCGGCTGGCCTCCGACCCGGCCAGCTCGGC
GACGACCTCGTCGCCGACGAGCGCGCCCTGCGCGACCCGGGTACGTCCGAGCCGGCCCTGACGGCGGCCG
CGCACCGCGAACAGGCGGCCCTACCGGCCATCGCCCGCCATCCGGAGTGGGAGGCGGCCGCGCGGGGGCG
GATCCCGCCCGAGCTCATTGACGTCTACGACCGCAACGTTCGACGCCCGCCGCGAGCTCACCAGCTTACT
CCGGTGCAGAACACCTTGCCGGCGTGGCGAATCGAGCCCGCCGCCCCCGCCGACGAGCTGCTCGGCTACT
ACCACCAGGCCGAGGCGGAGTCCGGTGTGCGGCTGGAACCTGGCGGGCGATCAACTTCATCGAGACGCG
GTTTCGGCAGCATCGTCGGCGCGAGCACCGCGGGCGCGCAGGGGCCGATGCAGTTCCTGCCGTCGACCTTC
GCCGGCTACGGGCAGGGCGGCGACATCCACTCGCCGCGCGACAGCATCCTGGCCGCGGGCCGCTACCTGG
CGGCCAACGGTTTCGCCGCCGATCGGGACCACGCCATCTACGCCTACAACCACGCGAGCGAATACGTGCG
CGCGGTTCGACAGTATGCGGGCGCTGATGGCCGCCGACCCCGCAACCTTCGCCGCTACTACCGGTGGGAC
GTCTACTGCTTACGACGGCGGGCGACGTGTTGCTGCCCATCGGTTACGACGCGTTCGTACCGATCCCGG
CCGCCGACTACGTGGCGGCGCACCCGAGTGA
```

## **ANEXO IV Protocolos de Extracción.**

### **PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE MICROALGAS**

#### Reactivos

Nitrógeno líquido

EDTA 0.5 M (50 ml)

9.305 g EDTA disódico

Disolver en 40 ml de agua y ajustar el pH con NaOH. Llevar a un volumen final de 50 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 5X (1 Lt)

54 g Trisma base

27.5 g Ácido Bórico

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

TBE 1X (100 ml)

20 ml TBE 5X

80 ml Agua Destilada

#### Material

Perlitas de vidrio

Morteros con pistilo

NOTA: Manejar los extractos a 4 °C.

1. Homogenizar la muestra en mortero frío y con la ayuda de perlitas de vidrio.
2. Agregar 10 mL de Buffer TBE 1X por cada 1 g de polvo de alfalfa.
3. La suspensión se remueve durante 1 h.
4. Centrifugar a 12000 x g durante 10 minutos a 20-25 °C.
5. El sobrenadante se filtra utilizando un filtro para jeringa con poros de 0.45 µm de diámetro.
6. Almacenar en congelación a -20 °C.



## ANEXO V. métodos de cuantificación

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

#### Material

Micropipeta multicanal

Tubos 1.6 ml

Puntas de 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l y 1 ml

Placa de ELISA

#### Reactivos

Buffer de extracción (blanco)

Reactivo de Bradford (Bio-Rad)

#### Preparación de curva estándar:

1. Preparar una solución stock de albúmina sérica bovina (ABS fracción V) a una concentración de 1mg/ml.
2. Realizar diluciones de acuerdo a la tabla 1. Hacer diluciones de la muestra de 1:10, 1:100 y 1:1000.
3. Encender el lector de placas 15 minutos antes de realizar la lectura.
4. A 160  $\mu$ l de cada dilución se le adicionan 40  $\mu$ l de reactivo de Bradford y se mezcla cuidadosamente evitando la formación de burbujas en la placa.
5. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se leen las muestras a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placas.
6. Graficar la concentración de proteína contra la absorbancia correspondiente para obtener una curva patrón que se utilizará como referencia para calcular la concentración de proteína en las muestras problema.

Concentración $\mu$ g/ml	$\mu$ l de solución estándar	$\mu$ l de agua destilada
0	0	1000
2.75	2.75	997.15
3.75	3.75	996.15
5	5	995
7.5	7.5	992.5
10	10	990
15	15	985
20	20	980
30	30	970
40	40	960
60	60	940
80	80	920

## ANEXO VI Cuantificación de Proteínas

Cuantificaciones de la proteína total soluble de las microalgas

### a) Cuantificación de microalgas WT

Microalgas sin transformar						
Muestra	Schizo WT 1:20	Schizo WT 1:50	Schizo WT 1:100	Nav WT 1:20	Nav WT 1:50	Nav WT 1:100
Abs 595 nm (replicas)	0.574	0.455	0.418	1.69	1.341	0.954
	0.559	0.454	0.412	1.701	1.32	0.972
	0.53	0.413	0.366	1.727	1.322	0.968
Promedio conc.	0.55433333	0.44066667	0.39866667	1.706	1.322	0.96466667
µg/ml	23.0721387	17.2715013	15.1281573	81.843992	62.247704	44.0122693
Conc. µg/µl	0.46144277	0.34543003	1.51281573	1.63687984	3.1123852	4.40122693

### b) Cuantificación de *Schizochytrium* sp y *Navicula* sp transformadas con pMDC32::MAP0586c

pMDC32 :: MAP 0586c									
Muestra	B-11 1:20	B-11 1:50	B-11 1:100	B-12 1:20	B-12 1:50	B-12 1:100	E-11 1:20	E-11 1:50	E-11 1:100
Abs 595 nm (replicas)	0.474	0.417	0.403	0.405	0.393	0.378	1.086	0.739	0.592
	0.476	0.423	0.387	0.34	0.356	0.37	1.129	0.749	0.584
	0.428	0.386	0.366	0.311	0.346	0.372	0.954	0.693	0.573
Promedio	0.45933333	0.40866667	0.38533333	0.352	0.365	0.37333333	1.05633333	0.727	0.583
Conc. µg/ml	18.2240987	15.6384773	14.4477307	12.746664	13.41008	13.8353467	48.6902027	31.883664	24.535056
Conc. µg/µl	0.36448197	0.78192387	1.44477307	0.25493328	0.2682016	1.38353467	0.97380405	1.5941832	2.4535056

c) Cuantificación de *Schizochytrium sp* transformada con pMDC32::MAP0586c

Y: pMDC32 :: MAP 0586c													
Muestra	blanco	Y-1 1:20	Y-1 1:50	Y-1 1:100	Y2 1:20	Y-2 1:50	Y-2 1:100	Y-3 1:20	Y3 1:50	Y-3 1:100	Y4 1:20	Y4 1:50	Y4 1:100
Abs 595 nm (replicas)	0.536	0.782	0.861	0.767	0.819	0.816	0.823	0.798	0.799	0.798	0.786	0.788	0.801
	0.467	0.81	0.815	0.766	0.791	0.821	0.785	0.785	0.799	0.779	0.777	0.771	0.771
	0.477	0.766	0.773	0.76	0.759	0.772	0.78	0.768	0.744	0.76	0.737	0.754	0.753
Promedio	0.4933333 3	0.786	0.816	0.764	0.789	0.803	0.796	0.783	0.780	0.779	0.766	0.771	0.775
prom- blanco		0.292	0.323	0.271	0.296	0.3097	0.3027	0.290	0.287	0.2857	0.273	0.277	0.2817
Conc. Ug/mL		153.189	423.963	707.387	155.17 1	405.945	792.972	151.927	375.76 5	747.027	142.73 8	362.7	736.216
Conc. Ug/uL	0	0.153	0.423	0.707	0.155	0.405	0.792	0.151	0.375	0.747	0.142	0.362	0.736

d. Cuantificación de *Schizochytrium sp* transformada con pMDC32::MAP1609c

X: pMDC32 :: MAP 1609c															
Muestra	X1 1:20	X1 1:5 0	X1 1:100	X2 1:20	X2 1:50	X2 1:100	X3 1:20	X3 1:50	X3 1:100	X4 1:20	X4 1:50	X4 1:100	X5 1:20	X5 1:50	X5 1:100
Abs 595 nm (replicas)	0.54 1 8	0.51 2 8	0.513	0.517	0.528	0.514	0.508	0.514	0.541	0.526	0.522	0.514	0.508	0.483	0.471
	0.52 8	0.52 8	0.498	0.496	0.5	0.508	0.504	0.504	0.503	0.501	0.496	0.488	0.524	0.479	0.483
	0.49 7	0.47 8	0.466	0.463	0.477	0.491	0.466	0.477	0.47	0.48	0.474	0.461	0.544	0.495	0.507
Promedi o	0.52 2	0.50 6	0.492	0.492	0.501	0.504	0.492 6	0.498	0.504	0.502	0.497	0.487	0.525	1.322	0.487
Prom- blanc	0.18 2	0.16 6	0.152	0.152	0.161	0.164	0.152	0.158	0.164	0.162	0.157	0.147	0.185	0.982	0.147
ug/mL	112. 5	255. 2	465.9	92.96	248.1	504.9	93.39	242.7	506.0	99.69	241.0	450.7	114.6	1584.	448.5
ug/uL	0.11 25	0.25 5	0.465	0.092	0.248	0.504	0.093	0.242	0.506	0.099	0.241	0.450	0.114	1.584	0.448

Cuernavaca, Morelos a 26 de marzo de 2021.

**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 la Pasante de Biólogo: **LIZETH VALLADARES ROSAS**. Con el título del trabajo: **PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS VACUNALES DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN MICROALGAS MARÍNAS**. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por **Tesis**, como lo marca el artículo 4° 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: M. EN C. ROBERTO TREJO ALBARRÁN

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. CARLOS ANGULO VALÁDEZ

\_\_\_\_\_

SINODAL 1: M. EN M.R.N. ESAU LEYVA SÁNCHEZ

\_\_\_\_\_

SINODAL 2: BIÓL. SAMUEL ARÉCHAGA OCAMPO

\_\_\_\_\_



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

**ROBERTO TREJO ALBARRAN | Fecha:2021-03-28 14:11:18 | Firmante**

e+JdpmKptsHEjDDTEUrGcMnGxt+KE4ERQAV2YQEpJLT5oQvUJf8MjSSEpv35mdLEzabEMeyAUVFZcMYxpn1QLI4qLZ7ZvQvs1EXmc0vzs861H5FnLq5jHoeXKpigMt5+xAN4dO5nUQu2FM8aFLBZOwRh8awGPliYvGPOvottmlXw/K72joje0DG2pUMgBauuFuQwBRsXQV5dG0pjZU4sXdL3TumzPFK02dyG9YS+cme7QWf+fdIEhekjqi9kRbcmpZjoPGAPgk/QLLPTG2MFAF+EKcTnXnmG/7OjMwrAU9aRQFHauLZik6zhEgnLPYJZg0k5iA4CKh82HySUqsxA==

**CARLOS ELIUD ANGULO VALADEZ | Fecha:2021-03-29 12:42:23 | Firmante**

gJZyDhO9WxmWZX2kpiNFJtrmWgvDnyA74i7m62tJBPB7zkxyJCQf1JQo0Tdc22BnOJuyoB21F/SlpedUZWyI3Jrx/vKxb49uWi7BbAlk8pVIDFKEw4AZ05Y8maTKE4izTfIC98A5877lvj185g2clscZilraxj+7fgkxYciGy1I7nGFSY6n4t6Uv0dBVr8HmXSWWyx/6tXOIArQNYB6IVKWMiigd9Nn4ZESkzAbod6tIWUyP+LDAUGtL+HLof1SsUVP+v5JcD46CGoXe+wIMBrLtvK7bFwce/lpi0XAJs8yD9CiwCwEe4x446PS3erwVCB1Tj1+DmX4qytWh9KA==

**ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA | Fecha:2021-03-30 08:54:36 | Firmante**

SchAEigUPAX8r0scob/1UJIIVMjPAOsmegNHu8q8hhwAzhA3zufmAcqfTmCYxqPlwI9UJ7hqVYtdhHyLxCMZtv+v1ptPwpGX3UAH26E1biqjOa9/lwEfyP7nkuFu6IXhBE8jWHiz2N6batn14sfgnxCAJHOjrf6K7vWhMYN8RflzxGqt7Tf7rEFTIASIB04ZaO5YWeNVjGin/WbUs4V/TmHebINvZ2dt3LyebeLUOEYQLFCuTjMqxuz1+atCxQK01lJNMmTUZsXtXKraQwOH P5xfoqB0Rp8xnnavtKElelWef77m2ZRwKPYcE2YbCKChfRkXUbu2F7jgZL476tg==

**ESAU LEYVA SANCHEZ | Fecha:2021-04-13 17:04:17 | Firmante**

w1N6DQ5DH6iaTpdQBUAobF94g3WDQvmzcpG59+MHB2te2y0Fd5yjfSQsB+hDd0ySrMbxo+T7X0kuORm8AVCRKpZSVHGEws6TV0rYj7eGiUuuMLna7pOPbefKoI7W+0u/4ICa3zOagj1s9E52PevM21YvxcRSIAjCN+ZcGtuynYD0eWf0XexsaywU8j2VnV/KuC3gbtKD86nJ03sV8PxoTd6hUVaL4i8nUCTIV3ChQDoWSOawXRAfPtb0ktgnk2VAeDxaLc/RXMteQQjbyE0HguqCRLYHF/s7/17/2tiqkJT0OQjxTyH5K/Uv50RrQ0+tcNPoyR5Fd/8Z4nvJjaGlg==

**SAMUEL ARECHAGA OCAMPO | Fecha:2021-04-21 13:40:29 | Firmante**

dCjdTmuww+VG2NV8eVgng9sIG3ngghKo1o7LxJ5MvwcJl8H6TncSVHeYwkdsco1SJ0n1hynmzfJKN7HgjQWeSudNyRV/RGOGI1hNXiTpNO75xYSMXI22Rzn1mWLWzP1TIPAcdB5LwKqUWL2TVIrLrFj6yBmrTQik8HyOPr7a+jjEjBTLqeD1RFpjdwiw2E+v8Plmvh+Z+sJRB8pfunEEF1zrQkufX7LDb+I6INrT/kPFIMoJkbMnlCPOgCwGhD41DbosXphzyRZ4E9Z7T2wTftP1ynkgEoY+Vu5lwCyAhZQeoyqY8khzsRelA+Po8GobcWQPwqH+Oc6IPFchpJp/Q==

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



BoPcpZ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/h7BOPBmgHS0RxyFUuPz0KWNSIlyjd70i>

