

Capítulo 17

Transformación genética de microalgas

Ruth Elena Soria Guerra
Saraí Damaris Dávalos Guzmán
Julieta Ponce Alonso
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

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

Resumen

En las últimas décadas las microalgas han surgido como biorreactores para la producción de proteínas heterólogas. *Chlamydomonas reinhardtii* es considerada la microalga modelo para los procesos de transformación genética; sin embargo, a la fecha se han logrado realizar transformaciones estables a nivel de núcleo y cloroplasto en otras microalgas utilizando técnicas de transformación tales como biobalística, electroporación, vía *Agrobacterium tumefaciens* y/o perlas de vidrio. Para realizar una transformación exitosa es necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de la proteína que se desea expresar y de esta manera elegir el mejor sistema de expresión. En este capítulo se presenta una descripción general del progreso en la ingeniería genética de microalgas, así como algunas estrategias que pueden afectar el rendimiento de la proteína tal como el

uso de diversos promotores y otros elementos regulatorios. Se analiza también la expresión de péptidos hipocolesterolémicos, antihipertensivos y antimicrobianos en microalgas. Finalmente se revisan algunos enfoques emergentes para la producción de proteínas recombinantes en este sistema de expresión.

Introducción

Al igual que las bacterias, levaduras, plantas y otros sistemas de expresión, las microalgas también pueden manipularse para expresar genes heterólogos para la producción de proteínas recombinantes que tienen un valor importante en aplicaciones farmacéuticas o industriales. Hasta la fecha, algunas proteínas de origen animal como anticuerpos, hormonas y vacunas se han expresado en microalgas a niveles económicamente viables.

Las microalgas presentan varias ventajas en comparación con otros sistemas de expresión, entre las que se pueden mencionar su rápida duplicación celular, crecimiento fotoautótrofo o heterótrofo, además, la expresión de proteínas recombinantes puede llevarse a cabo a nivel nuclear, cloroplástico o mitocondrial; así mismo, algunas especies de microalgas han sido catalogadas como GRAS (Generalmente Reconocidas Como Seguras) y a diferencia de las bacterias, las microalgas poseen vías complejas de modificaciones post-traduccionales, y por lo tanto pueden producir proteínas glicosiladas. Las microalgas modificadas genéticamente son adecuadas para el crecimiento en fotobiorreactores cerrados, en los que las condiciones de cultivo como luz, temperatura y nutrientes pueden controlarse eficazmente. El cultivo de microalgas transgénicas en fotobiorreactores también puede evitar que los transgénicos se escapen al medio ambiente, lo que potencialmente puede ocurrir en las plantas superiores por medio del polen. Las microalgas productoras de proteínas terapéuticas u otros compuestos valiosos pueden ser potencialmente administrados por vía oral como algas liofilizadas en polvo con poca o ninguna purificación. Estas ventajas hacen que los sistemas microalgales sean atractivos para la producción de proteínas recombinantes y otros compuestos de alto valor.

La introducción de ADN foráneo dentro del núcleo de la microalga puede conseguirse mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, electroporación o agitación en presencia de perlas de vidrio. Otro procedimiento que ha demostrado ser exitoso para la transformación de cloroplastos y mitocondrias

es la balística. En este capítulo se describen los fundamentos de estas técnicas y algunas aplicaciones.

Transformación nuclear

El fundamento de la transformación genética en algas es causar una permeabilización temporal mediante métodos físicos o químicos en la membrana o pared celular, según sea el caso, permitiendo que el ADN exógeno se integre en la célula. Una de las variables que deben tomarse en cuenta al momento de transformar genéticamente una microalga es su movilidad, forma y tamaño. Generalmente cuando las microalgas tienen un tamaño $<5 \mu\text{m}$ se requieren condiciones extremas para la transfección, en cambio cuando su tamaño es de $10\text{-}50 \mu\text{m}$ las condiciones de transformación son menos dañinas.

La expresión nuclear de transgenes en microalgas ofrece varias ventajas como la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales así como la secreción de las proteínas expresadas al medio. Sin embargo, este tipo de transformación presenta algunas desventajas respecto a otros métodos, por ejemplo, la frecuencia de expresión transgénica en el genoma nuclear de la microalga es extremadamente baja debido a mecanismos de silenciamiento génico, el cual se produce a nivel transcripcional o postranscripcional. Otros mecanismos involucrados en la limitación de la expresión del transgén nuclear para proteínas incluyen la transcripción ineficiente de promotores heterólogos, procesamiento inadecuado de ARN, inestabilidad de ARNm, e inestabilidad de los productos proteicos. Debido a lo anterior se han realizado mejoras significativas en la expresión mediante el uso de mejoras de promotores de genes de *Chlamydomonas*, la cual es considerada la microalga modelo para los procesos de transformación genética; estas mejoras incluyen también la optimización de codones del gen a insertar y la inclusión de intrones; sin embargo, la eficiencia de transformación comparada con otros métodos sigue siendo baja por lo que se necesita una mayor optimización del proceso.

Se han reportado transformaciones nucleares estables en solo tres grupos de microalgas eucariotas: clorófitas, diatomeas y dinoflagelados. La microalga modelo es *Chlamydomonas reinhardtii*, pues su genoma está completamente secuenciado y se ha reportado la transformación genética de su núcleo, mitocondria y cloroplasto. El genoma nuclear de *C. reinhardtii* contiene 100 Mb

distribuidos en 17 cromosomas, es inusualmente rico en el contenido de G+C (65%), sin embargo, a pesar de que se encuentra secuenciado su genoma, la función para la gran mayoría de los genes se desconoce.

En la Figura 17.1, se observan cuatro diferentes técnicas que se han utilizado para la transformación nuclear de *C. reinhardtii*, este apartado se centra en la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*, por electroporación y por cuentas de vidrio, aunque es posible transformar el núcleo por medio de biobalística esta técnica se ha utilizado mayormente para transformar el cloroplasto y mitocondrias de microalgas.

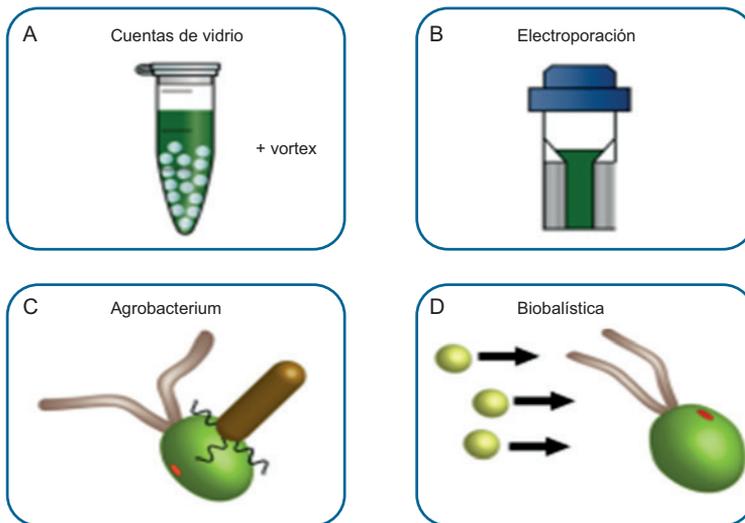


Figura 17.1. Técnicas de transformación nuclear que se han utilizado en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Modificado de Jinkerson y Jonikas, 2015. a) En este modelo se hace uso de perlas de vidrio en cepas deficientes de pared celular; b) se emplea un pulso eléctrico en cepas deficientes de pared celular; c) se utiliza a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; d) se usan nanopartículas de oro en una cámara de vacío.

Los promotores más utilizados para llevar a cabo la transformación nuclear son los de los genes HSP70A (Proteína de choque térmico 70 A, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein 70 A), psaD (Proteína D del fotosistema I, por sus siglas en inglés photosystem I protein D) y RSCBS2 (Subunidad pequeña 2 de la RUBISCO, por sus siglas en inglés Ribulose bisphosphate carboxylase small su-

bunit 2). Así mismo también se ha demostrado que los promotores quiméricos tienen altos niveles de transcripción y expresión, un ejemplo de este tipo de promotores y uno de los más utilizados en la transformación nuclear es HSP70A/RSCB2. Por otra parte, se ha reportado que las secuencias intrónicas en los genes heterólogos mejoran la expresión independientemente de la orientación o posición. En el núcleo, la expresión génica también puede ser inducida por una serie de factores, incluidos el choque térmico (HSP70A) o por adición de metales utilizando promotores que induzcan la expresión de genes en presencia de estos, como por ejemplo el promotor inducible *CYC6* (por sus siglas en inglés Cytochrome C6) que se induce en presencia de níquel y cobalto.

En la Tabla 17.1 se presentan algunos ejemplos de genes reporteros y marcadores que se han expresado en la microalga modelo y que han sido base para transformar otras microalgas.

Tabla 17.1. Ejemplos de marcadores y genes reporteros utilizados en microalgas (Modificado de León y Fernández, 2007).

Gen	Descripción	Fuente del gen
<i>aadA</i>	Adenil transferasa (resistencia a espectinomicina)	Eubacteria
<i>als</i>	Acetolactato sintasa (resistencia a herbicidas con sulfonilurea)	<i>Chlamydomonas</i>
<i>aphvIII</i>	Aminoglucósido 3' fosfotransferasa (resistencia a paramomicina)	<i>Streptomyces rimosus</i>
<i>ble</i>	Proteína de unión a bleomicina (resistencia a zeocina)	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa (resistencia a cloranfenicol)	Transposon T9
<i>gfp</i>	Proteína verde fluorescente (gen reportero)	<i>Aequorea Victoria</i>
<i>gus</i>	B-glucoronidasa (gen reportero)	<i>Escherichia coli</i>
<i>hpt</i>	Higromicina B fosfotransferasa (gen de resistencia a higromicina)	<i>Escherichia coli</i>
<i>luc</i>	Luciferasa (gen reportero)	<i>Horatia parvula</i>
<i>nptII</i>	Neomicin fosfotransferasa II (gen de resistencia a neomicina)	<i>Escherichia coli</i>

Las microalgas han llamado la atención como una plataforma potencial de bajo costo para la producción de una amplia gama de productos comerciales. Productos que incluyen biocombustibles, nutracéuticos, terapéuticos, industriales, productos químicos y alimentos para animales. En la Tabla 17.2, se presentan algunas proteínas terapéuticas producidas en microalgas a nivel nuclear.

Tabla 17. 2. Proteínas terapéuticas producidas en microalgas
(Modificado de Dehghani *et al.*, 2019).

Proteína terapéutica	Hospedero	Evaluación de funcionalidad
Anticuerpo monoclonal contra hepatitis (CL4) con y sin señal de retención al retículo endoplásmico	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Anticuerpo IgA contra el virus de Marburg	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Hormona de crecimiento de pescado	<i>Chlorella sp.</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Factor Oostático Modulador de la Tripsina	<i>Chlorella sp.</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Eritropoyetina humana	<i>C. reinhardtii</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B	<i>P. tricornutum</i>	Prueba realizada <i>in vitro</i>
Antígeno P24 del HIV-1	<i>Chlamydomonas sp.</i>	No reportado
Proteína VP2 del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV)	<i>Chlorella sp.</i>	No reportado

Vía *Agrobacterium tumefaciens*

El sistema de transformación nuclear de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) fue adaptado para transformar microalgas utilizando el vector de expresión p-CAMBIA 1301, se ha demostrado que este tipo de transformación es uno de los métodos más eficientes para transformar genéticamente las microalgas marinas y de agua dulce. Este método ofrece varias ventajas como alta eficiencia, aplicación simple e integración preferencial en regiones transcripcionalmente activas.

Algunas de las microalgas que se han transformado mediante este método son *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus acutus* TISTR8447, *Chlorella vulgaris*, *S. acutus* y *N. oculata*. El fundamento de la transformación de microalgas por *A. tumefaciens* es parecido al propuesto al de agro-infección en plantas, en donde la agrobacteria transfiere un segmento de ADN de su

plásmido Ti (del inglés Tumor Inducing, inductor de tumores) (Fig.17.2) conocido como ADN-T, para que se integre al azar en el núcleo del organismo hospedero. El proceso de transformación comprende seis grandes pasos que son resumidos en la Figura 17.3.

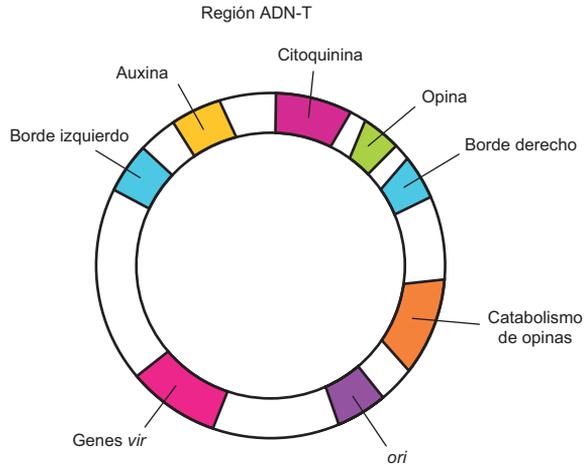


Figura 17.2. Plásmido Ti. Genes *vir*: genes de virulencia; *ori*: origen de replicación (Tomado de Hernández-Esquivel, 2015).

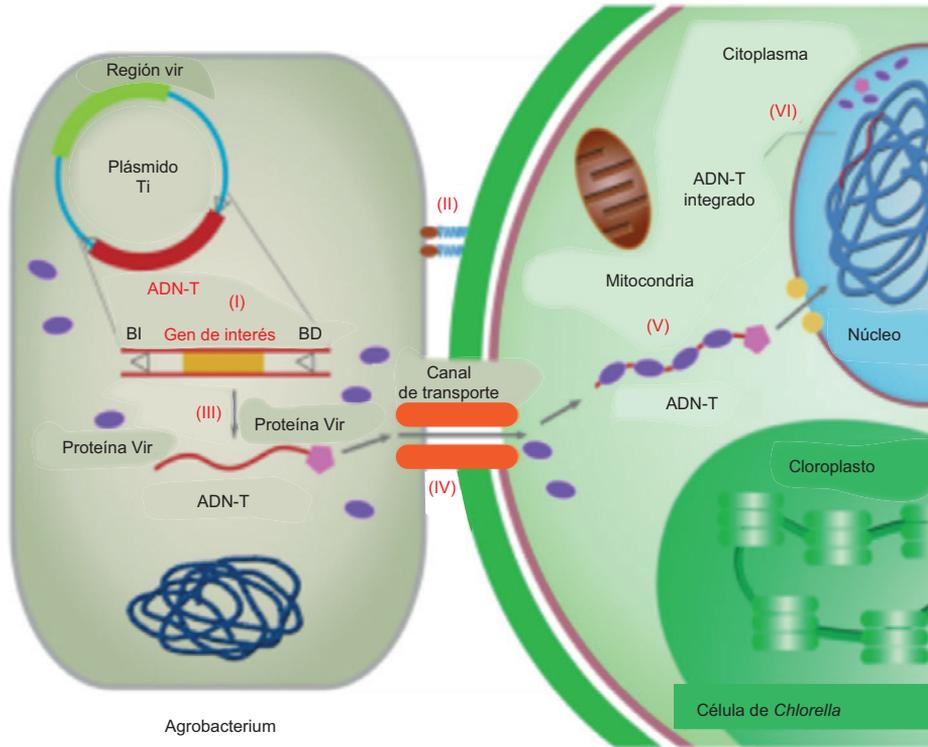


Figura 17.3. Modelo putativo de transformación nuclear de *Chlorella* vía *Agrobacterium* (modificado de Yang *et al.*, 2016). El proceso de transformación comprende seis grandes pasos. (I) El gen de interés se clona entre el borde izquierdo (BI) y el borde derecho (BD) del ADN-T, este plásmido recombinante se introduce a *Agrobacterium*. (II) Ocurre el reconocimiento célula-célula y fijación de *Agrobacterium* a las células huésped de *Chlorella*. (III) Con la activación de la región de genes *vir*, ocasionada productos químicos de respuesta, tal como la acetosiringona, el ADN-T es generada por ciertas proteínas *Vir*. (IV) el ADN-T viaja a través del citoplasma de células de *Chlorella* (V) y es directamente importado a su núcleo. (VI) Una vez en el núcleo, el ADN-T es despojado de las proteínas de acompañamiento innecesarias e integrado en el genoma de *Chlorella*.

Los genes alojados en el ADN-T pueden expresarse en las células huésped de manera transitoria o estable. El pico de expresión que ocurre dentro de 2 a 4 días después de la infección de los tejidos del huésped generalmente se define como expresión transitoria. La expresión transitoria ocurre antes de la

integración del ADN-T en el genoma del huésped y, por lo tanto, no se puede transmitir de forma estable a la progenie. La expresión estable requiere más tiempo para integrar el ADN-T en el genoma del huésped y por lo tanto ocurre de 10-14 días después de la transformación.

Para llevar a cabo este tipo de transformación no es necesario realizar una lesión en la célula como suele realizarse en plantas, únicamente se añade un compuesto fenólico que induzca la activación de las proteínas *vir* del plásmido Ti de *Agrobacterium*. El compuesto más utilizado es acetosiringona (AS), más no es el único. Por otra parte, se ha demostrado que algunas microalgas pueden ser transformadas sin la presencia de AS, como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Haematococcus pluvialis* sin embargo hay microalgas que solo se transforman en presencia de AS como *Chlorella vulgaris* que requiere de 50-300 μM de acetosiringona.

El pH es un factor importante que debe considerarse al momento de realizar una transformación vía *Agrobacterium*, un pH ácido generalmente se considera adecuado para la transformación, ya que un pH ácido puede inducir la virulencia de *Agrobacterium*. Sin embargo, el pH óptimo depende de la microalga y la cepa de *Agrobacterium* que se utilice, ya que los requisitos de pH para la inducción óptima de los genes *vir* son diferentes para diferentes cepas de *Agrobacterium*.

Para lograr una transformación estable es necesario optimizar los codones del gen exógeno ya que esto promueve de manera significativa la expresión de la proteína deseada, además es necesario elegir un adecuado marcador de selección. Esto incluye genes que confieran resistencia a antibióticos, herbicidas o varias enzimas metabólicas que controlen el crecimiento bajo condiciones específicas. Además, la expresión del gen endógeno podría ser eliminado si las clonas transgénicas no se mantienen bajo condiciones de selección constantes.

Protocolos

Protocolo para la transformación genética vía *Agrobacterium*

A continuación, se describe un protocolo para transformar microalgas (particularmente *N. oculata* CCAP 849/7, *C. vulgaris* OW-01 y *S. acutus* UTEX 72) vía *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 17.4).

1. Cultivar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 conteniendo la construcción de interés en medio agar para levaduras y mohos (Yeast Mold Agar, YM, por sus siglas en inglés) hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) de 0.5 (a 600 nm).
2. Cultivar las microalgas hasta que alcancen una DO de 0.2 (a 750 nm), posteriormente, cosechar la biomasa por centrifugación y sembrarla en medio Tris Acetato Fosfato (TAP) sólido.
3. En condiciones estériles adicionar 200 μL de la *A. tumefaciens* y 200 μL de acetosiringona 100 μM . Con ayuda de un asa de vidrio estéril realizar un estriado en ángulo recto.
4. Incubar este co-cultivo durante 48 horas en obscuridad a 25 °C.
5. Posterior al co-cultivo recuperar las microalgas y resembrarlas en medio TAP con agente de selección (de acuerdo con el vector que se esté utilizando) y un bacteriostático (250 mg/L de cefotaxima) para eliminar la bacteria.
6. Cultivar a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Las colonias resistentes al agente de selección se resembrarán cada dos semanas.
7. Después de tres resiembras corroborar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) la presencia del gen de interés utilizando oligonucleótidos específicos.

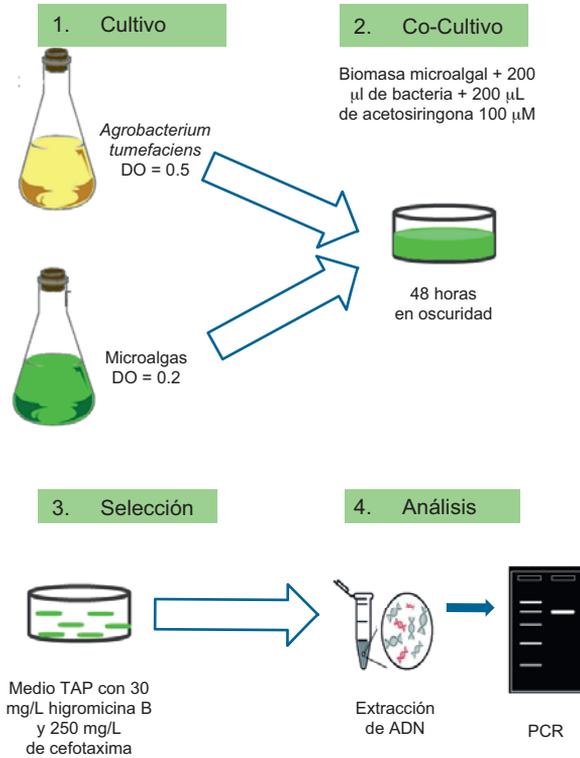


Figura 17.4. Protocolo de transformación de microalgas vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Electroporación

La electroporación es un método físico que se basa en la electropermeabilización mediante la aplicación de un campo eléctrico externo fuerte (medido como $V\text{ cm}^{-1}$) a través de un par de electrodos en una cubeta de electroporación o celda generando microporos temporales en la membrana celular permitiendo el paso de moléculas hacia las células. Los parámetros de electroporación, como el campo fuerza, duración del pulso y tiempos de pulso; así como la temperatura, ósmosis y estado celular; y la concentración de plásmido de ADN, se han considerado esenciales para la efectividad de la electroporación.

La transferencia del material genético exógeno hacia la célula puede ser obstruido por la pared celular, o la forma y el tamaño de las células, debido a lo anterior las condiciones de electroporación deben optimizarse indivi-

dualmente para cada especie. Al momento de estandarizar la técnica para la electro-transformación debe considerarse que la resistencia del buffer de electroporación debe superar los 600 Ω , ya que la intensidad del voltaje pudiera superar la capacitancia del equipo. La concentración de sales o de buffer amortiguador incide directamente en la resistencia del mismo, a mayor concentración de éstas, menor es la resistencia y viceversa.

Esta técnica ha sido utilizada para transformar protoplastos de microalgas, mutantes deficientes de pared celular y otras células de algas con paredes delgadas. Sin embargo, se ha reportado la transformación exitosa de microalgas sin usar cepas mutantes de pared celular, como es el caso de *Phaeodactylum tricornutum*, ya sea por electroporación o electroporación de pulsos múltiples. En este caso, las células se cultivaron sin sílice, que probablemente influyó en la estructura de la pared celular. En general, reduciendo el grosor de la pared celular mejora la transformación de la microalga por electroporación.

La formación de poros hidrofílicos estables o inestables depende principalmente de la intensidad del campo eléctrico, el número de pulsos, el tiempo entre los pulsos, etc. Después de la aplicación del campo eléctrico externo que rodea el medio celular, los iones pueden moverse y acumularse como cargas en la superficie de la membrana celular. Esta acumulación de cargas puede crear un campo eléctrico dentro de la membrana celular. Como resultado, la intensidad del campo eléctrico generado dentro de la membrana celular es completamente diferente del exterior de la membrana celular. Esta diferencia de potencial se denomina potencial transmembrana (TMP), que es linealmente proporcional al campo eléctrico externo y al diámetro de la celda.

Es importante elegir apropiadamente los promotores, terminadores y optimizar los codones, pues esto puede aumentar la eficiencia de la transformación. Existen reportes en los que se ha demostrado que las bajas concentraciones celulares, las bajas intensidades de luz y la transferencia de pequeños fragmentos de ADN producen mayor eficiencia de transformación, lo cual podría deberse a que las altas intensidades de luz reducen la funcionalidad del antibiótico y a que una alta concentración celular podría reducir el contacto de las células con las placas selectivas resultando en falsos positivos.

Usualmente el sistema básico de electroporación (Fig. 17.5) utiliza una gran cantidad de células (típicamente del orden de millones) que se colocan en una celda entre un par de electrodos (escala de mm a cm) en una cámara de aislamiento y se aplica un alto voltaje (de 50 a 1000 V cm^{-1}). La desventaja

de este método es que una gran cantidad de células podrían dañarse o lisarse gravemente debido al estrés sometido, como calentamiento, generación de burbujas, cambio de valor de pH causado por un campo eléctrico ultra alto; todo esto provoca una baja viabilidad celular y baja eficiencia de transfección.

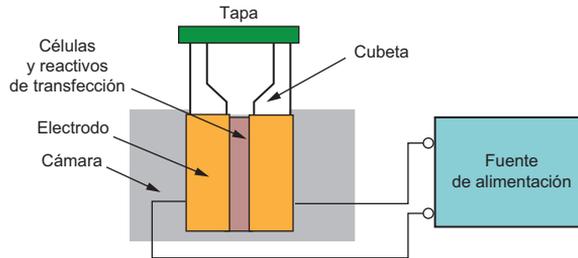


Figura 17.5. Sistema de electroporación (Modificado de Chang, 2018).

Recientemente en una investigación se transformó el núcleo de *Euglena gracilis* mediante electroporación obteniendo la mayor cantidad de transformantes usando un voltaje de pulso de 3 kV y 20 μ g de ADN plasmídico por transformación. Sin embargo, la frecuencia de transformación fue baja en comparación con la electroporación realizada con otras algas como *Nannochloropsis gaditana* y *Scenedesmus obliquus*, lo cual puede deberse a que en estas últimas microalgas se utilizaron enzimas digestivas y proteolíticas para degradar la pared celular y hacerlas más permeables.

Lo anterior demuestra que para tener una mayor eficiencia de transformación es necesario pre-tratar la pared celular de las microalgas antes de realizar la electro-permeabilización; sin embargo, esto puede complicarse pues no todas las microalgas están caracterizadas y por lo tanto no se tiene la información completa de la composición de la pared celular por lo que las enzimas a utilizar para degradar esta serían diferentes según la especie. Por ejemplo, para *C. reinhardtii* se ha reportado el uso de lisina y para *Chlorella vulgaris* se ha utilizado lizosima. A pesar de las desventajas anteriormente mencionadas, la electroporación es uno de los métodos más eficientes, produciendo hasta 100 veces más transformantes comparado con el método de transformación por cuentas de vidrio.

Protocolo para la transformación genética por electroporación

A continuación, se presenta un protocolo para la electroporación de la microalga *Neochloris oleabundans*.

1. Crecer un cultivo de *N. oleabundans* hasta una DO de 0.4-0.5 (a 750 nm).
2. Centrifugar las células a 1,000 g por 10 min, retirar el medio de cultivo hasta dejar un volumen máximo de 5 mL. Transferir 500 μ L del cultivo concentrado a un tubo de 1.5 mL.
3. Centrifugar a 14,000xg por 10 min. Decantar el exceso de medio de cultivo y lavar la pastilla celular con 500 μ L de buffer de electroporación (500 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 200 mM Manitol, 200 mM Sorbitol, pH 7.6).
4. Resuspender las células con vortex. Centrifugar nuevamente el cultivo y decantar el exceso de buffer. Resuspender la pastilla celular en 60 μ L de buffer de electroporación.
5. Agregar de 5 a 20 μ g de ADN plasmídico a la pastilla celular del paso anterior.
6. Transferir el volumen total de las células junto con el ADN plasmídico a las celdas de electroporación y dejar incubar en hielo por 5 min.
7. Configurar el electroporador a 0.7 kV cm⁻¹ y 2 ms de duración, colocar la celda en el electroporador y dar el pulso eléctrico.
8. Incubar la celda en hielo durante 5 min, posteriormente agregar 350 μ L de caldo nutritivo (Nutrient Broth, NB, por sus siglas en inglés) y mezclar.
8. Transferir el cultivo a un tubo de 1.5 mL y dejar incubando al menos 30 min en agitación constante a 27°C.
9. Tomar 25 μ L del cultivo y sembrar en medio NB con antibiótico.
10. Dejar incubando a 27°C con fotoperíodo de 16:8 h luz: oscuridad hasta el desarrollo de colonias.
11. Después de varias resiembras corroborar mediante PCR la presencia del gen de interés.

Transformación utilizando cuentas de vidrio

Otro de los métodos para transferir material genético a una microalga es mediante la agitación por perlas o cuentas de vidrio. Se considera un proceso simple, de bajo costo y no es necesario el uso de equipos especializados. La permeabilización de las células es obtenida mediante la agitación en presencia de ADN, perlas de vidrio y Polietilenglicol (PEG) pues se ha demostrado que el PEG mejora la eficiencia de transformación de 5 a 12 veces más en células de *Chlamydomonas* deficientes de pared celular. Esta técnica fue desarrollada originalmente para levaduras, sin embargo, ha sido utilizada para la transformación de mutantes deficientes en la pared celular o células de tipo silvestre de *Chlamydomonas* después de la degradación enzimática de la pared celular. Los métodos de agitación generalmente emplean de 30-100 millones de células microalgales en un volumen de 0.4 mL, 300 mg de perlas de vidrio (500 μm de diámetro), un 5-13% de solución de PEG (peso molecular 4,000-8,000 kDa) y ADN del plásmido de interés (25-50 μg). Se ha demostrado que el método de perlas de vidrio es más eficiente para transformar el núcleo de *Dunaliella salina* obteniendo un 5.9% de eficiencia de transformación comparado con el método de electroporación (cerca del 2%) y por balística (menos del 1%). Además, se ha observado que el número de transformantes depende de las concentraciones de PEG variando entre 3.5 y 5%.

El método de perlas de vidrio también puede combinarse con el de electroporación, en la figura 17.6 se muestra el uso de perlas de vidrio como pre-tratamiento de la pared celular y posteriormente electroporación de las células de *Thraustochytrid*.

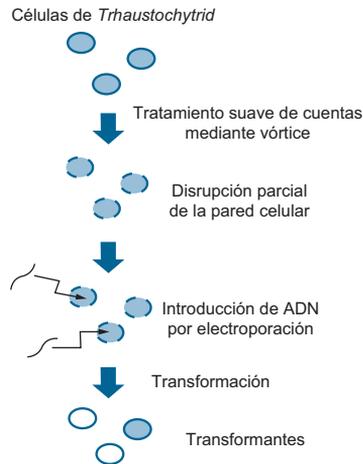


Figura 17.6. Método de transformación con cuentas de vidrio y electroporación.

Un protocolo similar, utilizando carburo de silicio (SiC) en lugar de cuentas de vidrio para perforar células ha tenido éxito en microalgas con pared celular en cepas de *C. reinhardtii*, produciendo una eficiencia de hasta 10^{-5} microalgas transformantes con pared celular y hasta 10^{-4} transformantes en cepas sin pared celular. A diferencia de la agitación de las células con perlas de vidrio, agitando con SiC durante 10 minutos dan como resultado poca pérdida en la viabilidad celular. Sin embargo, a pesar de que la viabilidad celular después de la agitación es mejor, debido a la baja eficiencia de transformación, alto costo de materiales y problemas de salud asociados con el manejo del SiC generalmente se prefiere el uso de las cuentas de vidrio.

Protocolo para la transformación genética utilizando cuentas de vidrio

Se presenta un protocolo para transformar el núcleo de *C. reinhardtii* mediante cuentas de vidrio.

1. Crecer las células de *Chlamydomonas* en medio mínimo (HS) hasta una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/mL.
2. Recolectar las células por centrifugación a 5000 rpm por 5 min.
3. Resuspender las células en medio sin nitrógeno a una relación v/v 1/100.
4. Añadir en un tubo 300 μ L de células, 100 μ L de polietilenglicol al 20%, 1-2 μ g ADN linealizado y 300 mg de perlas de vidrio estériles.
5. Agitar vigorosamente en vórtex 15-30 segundos.
6. Plaquear en medio selectivo e incubar a 25 °C, con un fotoperiodo de 16h luz/ 8h oscuridad.
7. Las colonias transformantes aparecerán a los 6 días de su cultivo.
8. Corroborar mediante PCR la presencia del gen de interés.

Transformación de cloroplastos

Es generalmente aceptado que el cloroplasto de las células vegetales y de algas, evolucionó de una bacteria fotosintética que se estableció por endosimbiosis dentro de una célula huésped eucariota no fotosintética hace más de mil millones de años. Desde entonces, el genoma de esta bacteria ha experimentado una reducción en la complejidad, ya sea por la pérdida de genes o la transferencia de genes al núcleo del huésped, de modo que los cloroplastos modernos poseen múltiples copias de un genoma circular pequeño (120-200 kb) que comprende unos 100-250 genes. La mayoría de estos genes codifican componentes del aparato de transcripción-traducción del cloroplasto o componentes centrales del aparato fotosintético. Estos productos genéticos son homólogos a los que se encuentran en las cianobacterias actuales, también así la disposición y la expresión de los genes también reflejan la ascendencia procariota del cloroplasto.

Estas características convierten al cloroplasto en un objetivo atractivo para la ingeniería genética ya que el nivel de ploidía es extremadamente alto. La inserción de genes en el cloroplasto posibilita la expresión de estos a niveles elevados, dando como resultado la obtención de proteína recombinante en mayor cantidad. Un dato importante de esta transformación es que los transgenes se integran en los genomas del cloroplasto por recombinación homóloga y no se ven afectados por el silenciamiento génico, también es importante mencionar que no existe “efecto de posición” un fenómeno muy común en la transformación nuclear. El cloroplasto tiene la capacidad de expresar múltiples transgenes a partir de un solo operón como resultado de la traducción

eficiente de ARN mensajero policistrónico (ARNm) en el plástido. A la fecha, la balística y la captación de ADN inducida por polietilenglicol (PEG) producen una transformación estable de plastidios.

La primera transformación exitosa de cloroplasto se reportó en *Chlamydomonas reinhardtii*; su cloroplasto abarca el 40% del volumen de toda la célula. La transformación de cloroplasto tiene numerosas aplicaciones como la producción de proteínas terapéuticas, vacunas y sobreexpresión de enzimas.

Para la transformación del cloroplasto es de gran ayuda la elección de un gen reportero o un agente selectivo pues indica probables transformantes, lo cual reduce la búsqueda de clonas transplastómicas. Los genes de resistencia mayormente utilizados son el gen *aadA* (aminoglucósido adeniltransferasa) que confiere resistencia a la espectinomicina y la estreptomycinina, los genes *nptII* y *aphA-6* (aminoglucósidos- fosfotransferasa) resistencia a kanamicina y el gen *badh* (betaína aldehído deshidrogenasa) en combinación con betaína aldehído también es utilizada como agente de selección.

Los vectores de transformación de cloroplasto se desarrollan de manera que se logre la expresión del gen de interés mediante recombinación homóloga, en una ubicación determinada y precisa en el plastóma o ADN de cloroplasto. Cuando el ADN que contiene la secuencia de interés se inserta a los plásmidos, solo se transforman unas pocas copias del plastóma, lo que resulta en una transformación heteroplasmática; sin embargo, mediante el subcultivo de las células bombardeadas *in vitro* bajo selección, todas las copias del plastóma contendrán

el transgén que conduce al estado de homoplastía, donde todos los plastómas del cloroplasto presentes en la célula estarán transformados (Figura 17.7).

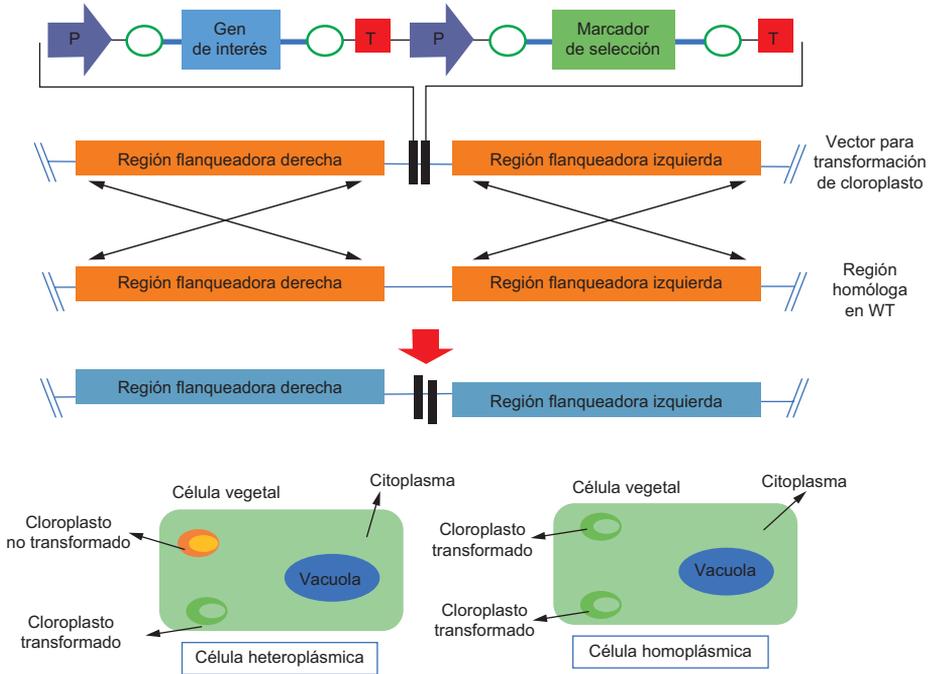


Figura 17.7. Diagrama representativo de la transformación de cloroplasto. Diseño simple de un vector de transformación para cloroplasto, donde el casete de selección y de expresión se coloca entre dos regiones específicas del plástido. Estas regiones se toman de plástidos WT (no transformados) cuyo plastóma será manipulado, esto permitirá un evento cruzado que integrará las secuencias de ADN entre ellas. Las flechas moradas en el vector de expresión de cloroplasto representan promotores (P) y la dirección de la transcripción; los recuadros rojos corresponden a los terminadores (T). Las regiones no traducidas (UTRs) están representadas por círculos blancos y las líneas delgadas entrecruzadas simbolizan la recombinación homóloga. Al final se observan dos células vegetales, una heteroplásmica y otra homoplásmica (Adaptado de Adem *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente el organismo pionero para la clonación exitosa en el cloroplasto fue la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* dando lugar a una gran cantidad de publicaciones reportando la producción de

diferentes proteínas recombinantes (Tabla 17.3). Debido a los resultados satisfactorios se ha observado un creciente interés en otras especies de microalgas como potenciales productores de proteínas recombinantes, un ejemplo de ello es la microalga *Chlorella vulgaris* utilizado como alimento en la acuicultura debido a su alto contenido proteico y de ácidos grasos. Debido a su rápido crecimiento y bajo costo es un candidato prometedor para su uso como bio-reactor para la producción a gran escala de proteínas de alto valor agregado.

Otra microalga de interés biotecnológico es *Scenedesmus* ya que se ha reportado que la transformación del cloroplasto de *S. obliquus* y *S. acutus* es un blanco potencial para la modificación genética. *Nannochloropsis oculata* es una microalga unicelular utilizada como alimento para peces, la cual presenta un solo cloroplasto; en esta microalga se han realizado modificaciones genéticas para producir bactericidas para que los peces se protejan de patógenos sin necesidad de utilizar antibióticos.

Tabla 17.3. Proteínas recombinantes expresadas en microalgas
(Tomado y modificado de Barrera y Mayfield, 2013).

Proteína	Fuente original del gen	Plataforma de expresión
Dominio C-terminal del antígeno principal apical AMA1 fusionado a una almidón sintasa (GBSS)	<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Dominio C-terminal de la proteína principal de superficie (MSP1) fusionada con una almidón sintasa (GBSS)	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Dominio de unión D2 de fibronectina de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionado con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB-D2)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Anticuerpo IgG1 (83K7C)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Ácido glutámico descarboxilasa 65 (hGAD65)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Proteína	Fuente original del gen	Plataforma de expresión
Proteína amiloide A sérica bovina (M-SAA)	<i>Bos taurus</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Proteína E2 del virus de la peste porcina (CSVF-E2)	Virus de la peste porcina clásica	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Metalotioneína-2 (hMT-2)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Anticuerpo monoclonal HSV8-lsc	<i>Homo sapiens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Subunidad B de la toxina del cólera fusionada con la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (CTBVP1)	<i>Vibrio cholerae</i> , virus de la fiebre aftosa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Protocolo para la transformación de cloroplastos de microalgas por el método de biobalística.

La transformación por balística se realiza mediante el uso de una pistola de partículas (genes) en una cámara de vacío, utilizando procesos físicos para transferir el ADN a las células vivas. Debido a la ausencia de restricciones biológicas, la transformación por balística no se limita a tipos celulares, especies o genotipos específicos, tampoco existen limitaciones en los vectores o en el tamaño de ADN a insertar, secuencia o conformación. El principio físico en el que se basa este tipo de transformación representa una tecnología de transformación genética universal y se ha utilizado con éxito en casi todos los grupos de organismos. La balística (también llamada biobalística) brinda la oportunidad de transformar de manera estable los genomas pequeños de los dos orgánulos celulares que contienen ADN, mitocondrias y plástidos.

El método de biobalística se basa en la utilización de microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos con el ADN que se desea transferir y que son disparados sobre los cultivos a altas velocidades, atraviesan la pared y la membrana celular y llevan al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma. En esta sección se describen los diferentes pasos de un protocolo de biobalística para la transformación de microalgas .

Preparación de cultivos para la balística

La cepa que se desea transformar deberá ser cultivada en medio líquido de acuerdo con las necesidades nutrimentales de la microalga seleccionada. El

cultivo debe encontrarse en fase exponencial el día que se llevará a cabo el disparo con el equipo de balística.

Preparación de la suspensión de micropartículas de oro

Las partículas de oro que se utilizan para el bombardeo deben ser preparadas por lo menos con un día de anticipación.

1. Pesar 50 mg de partículas de oro 0.6 μ m (Bio-Rad) en un tubo de 1.5 mL.
2. Agregar 1 mL de etanol grado reactivo al 100% y mezclar en vortex durante 3 minutos, centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
3. Descartar el sobrenadante y añadir 1 mL de etanol grado reactivo al 70%, mezclar con vortex durante 2 min.
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 min, agitando cada 5 min.
5. Centrifugar por 3 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 1 mL de agua estéril, y mezclar con vortex durante 1 min, hasta que las partículas queden suspendidas completamente.
7. Dejar a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que las partículas sedimenten en el fondo.
8. Centrifugar durante 2 min a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
9. Repetir el lavado cinco veces, o hasta que la pastilla se suspenda con facilidad.
10. Finalmente agregar 850 μ L de glicerol al 50%. La suspensión de partículas de oro preparadas se almacena a -20°C hasta el momento de usarlas.

Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés

1. Mezclar en vortex la suspensión de partículas de oro previamente preparadas
2. Tomar 50 μ L de estas partículas y en estricto orden agregar: 10 μ L de ADN plasmídico (a una concentración 1 μ g/ μ L), 50 μ L de CaCl₂ 2.5M recién preparado y 20 μ L de espermidina 0.1M; después de añadir cada solución agitar con vortex durante 5 segundos, posteriormente mezclar con vortex durante 20 min a 4°C.
3. Agregar 200 μ L de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar en vortex durante 5 s.

4. Centrifugar durante 30 s a 13,000 rpm.
5. Desechar el sobrenadante y repetir los lavados con etanol 5 veces.
6. Suspender las partículas en 35µL de etanol al 100% y dejar en hielo hasta su uso.

NOTA: Este material es suficiente para 6 bombardeos y debe ser preparado el mismo día que se realizará el experimento. Macro y micro acarreadores, así como los discos de ruptura se esterilizan con etanol absoluto por 10 minutos. Dejar secar antes de usar (Figura 17.8).

Condiciones de biobalística para microalgas

- Discos de ruptura: 1100 psi
- Distancia: 9 cm
- Vacío: 15 pulgadas Hg
- Partículas de oro: 1 µm de diámetro

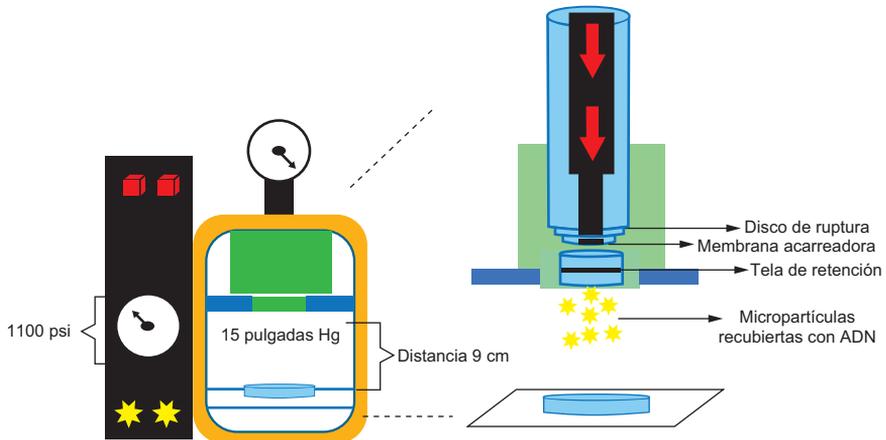


Figura 17.8. Esquema del equipo de biobalística, el diseño permite modificar las condiciones de disparo.

Resultados esperados de la técnica de balística.

Posterior al bombardeo es necesario esperar 3 días para resembrar las microalgas en medio selectivo, después de la segunda resiembra se podrá empezar a descartar las clonas no resistentes, pues estas no sobrevivirán a la exposición del agente de selección. Las resiembras deben llevarse cada 15 días, después de la resiembra número 5 las cepas resistentes se crecen en medio líquido para comenzar con la caracterización molecular de las transformantes. Un primer análisis consiste en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Debido a que se conoce la longitud y la secuencia de nucleótidos que se insertó en el genoma del cloroplasto, es posible diseñar oligonucleótidos específicos que ayudarán a amplificar el transgén, comprobando de esta manera la presencia del gen de interés (Fig. 17.9).

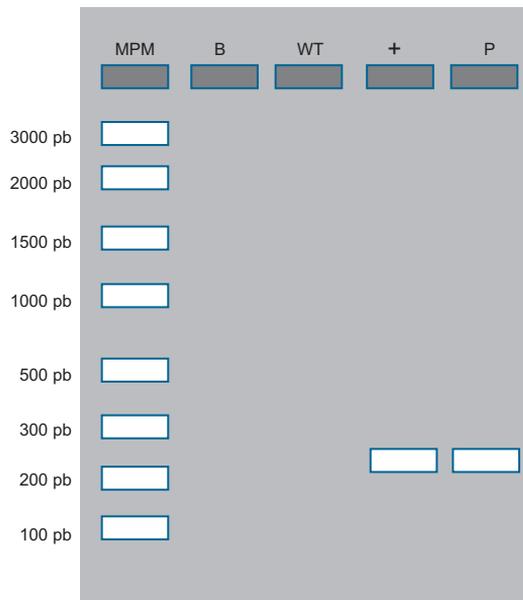


Figura 17.9. Esquema del análisis de un gel por electroforesis para la identificación de un fragmento de 230 pb donde MPM: marcador de peso molecular; B: blanco de reacción; WT: cepas no transformadas de la microalga de elección; +: Plásmido utilizado para la transformación; P: Muestra problema.

Obtención de clonas homoplásticas

Cuando ocurre la transformación en los plástidos, solo algunas copias en el ADN del cloroplasto contienen la secuencia objetivo, a lo que se le conoce como transformación heteroplásmica. Eventualmente todas las copias de ADN del plastóma con las resiembras consecutivas en medio selectivo adquirirán el transgén en todas las copias del plastóma, esto permitirá la obtención de clonas homoplásticas.

Esta identificación puede llevarse a cabo también mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que hibriden en genes constitutivos localizados río arriba y río abajo del sitio de inserción esperado (Fig. 17.10).

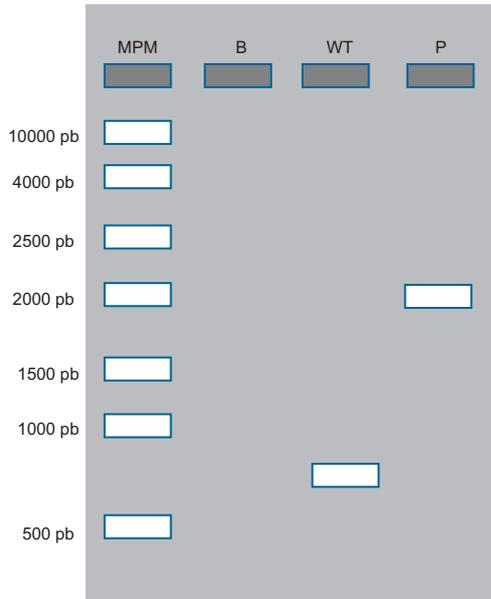


Figura 17.10. Esquema del análisis de homoplasia de la microalga de elección, se muestra en la imagen MPM: marcador de peso molecular; B: blanco de reacción; WT (cepa no transformada de la microalga de elección); P: cepa transformada y homoplástica.

Proteínas recombinantes producidas en microalgas

Péptidos hipocolesterolémicos

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un problema de salud pública por su alta prevalencia y constituyen la principal causa de muerte de la población adulta en la mayoría de los países. Aunque las tasas de mortalidad cardiovasculares han disminuido en países altamente desarrollados en las últimas décadas, las muertes y las enfermedades cardiovasculares han aumentado a un ritmo acelerado en los países subdesarrollados y en desarrollo. Entre otros factores, las enfermedades cardiovasculares se correlacionan principalmente con hipercolesterolemia.

Las hipercolesterolemias o también llamadas “dislipidemias” son una serie de enfermedades que se caracterizan por una alteración en los niveles sanguíneos del colesterol total, y/o del colesterol HDL (High Density Lipoprotein) y/o del colesterol LDL (Low Density Lipoprotein), y que algunas veces se acompaña, además, de niveles altos de triglicéridos. Las hipercolesterolemias pueden ser genéticas y se caracterizan por niveles especialmente elevados de colesterol y/o triglicéridos. También pueden ser secundarias a dietas inadecuadas, altas en grasas, especialmente saturadas y ácidos grasos trans; estos últimos están presentes en los denominados aceites animales o hidrogenados. Además, las personas con hipotiroidismo no tratado, enfermedades renales y diabetes mellitus pueden presentar dislipidemias. El tratamiento contra la hipercolesterolemia generalmente implica costos debido a la medicación continua y a las restricciones dietéticas a largo plazo. Durante mucho tiempo se ha trabajado en el desarrollo de nuevos medicamentos o en la explotación de los péptidos bioactivos presentes en los alimentos, que puedan ayudar en la prevención de las enfermedades.

Las proteínas presentes en la dieta son tradicionalmente conocidas como fuentes de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de diversas funciones corporales. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han adquirido un valor agregado debido al conocimiento de la actividad de los péptidos fisiológicamente activos. La actividad de dichos péptidos está basada en la composición de sus aminoácidos y su secuencia. De manera particular, las proteínas que se encuentran en la leche son consideradas la mayor fuente de péptidos bioactivos y son los más estudiados, dentro de los

péptidos derivados de la leche se encuentran los péptidos identificados como hipercolesterolémicos tales como lactostatina (IIAEK), enterostatina (VPDPR), DPR y LPYP; cada uno con mecanismos de acción diferente (Tabla 17.4).

Tabla 17.4: Secuencias de aminoácidos de péptidos reportados con actividad hipocolesterolémica (Modificado de González-Ortega *et al.*, 2014).

Secuencia	Referencia
VPDPR	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
GLDIQK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
VYVEEKPTPEGDLEILLQK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
ALPMH	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
IIAEK	Nagaoka <i>et al.</i> , 2001
LPLPR	Takenaka <i>et al.</i> , 2001
LPYP	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
WGAPSL	Zhong <i>et al.</i> , 2007

La lactostatina (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys: IIAEK) fue el primer pentapéptido identificado como hipocolesterolémico y es derivado de la beta-lactoglobulina de la leche bovina. Actúa disminuyendo en suero lipoproteínas de baja densidad y tiene una mayor actividad hipocolesterolémica que el β -sitosterol, un fármaco conocido para el tratamiento de la hipocolesterolemia. Se ha propuesto que el mecanismo de acción es el siguiente: cuando el péptido lactostatina llega al hígado, regula la concentración de calcio intracelular, esta concentración está relacionada con la señalización de las MAPK; un grupo de ubiquitinas quinasas que al ser fosforiladas activan la enzima colesterol-7-hidroxilasa, involucrada en la ruta de síntesis del colesterol, dando como resultado el aumento de su actividad, oxidándose para formar sales biliares. Las sales biliares se secretan al intestino y se conjugan con los lípidos que se encuentran en él para formar micelas, éstas se absorben a través de las células de las mucosas intestinales por difusión pasiva para formar quilomicrones, en el sistema linfático estos quilomicrones permiten la captura del colesterol, principalmente el colesterol LDL.

Debido a que la síntesis química de péptidos es muy cara y difícil de escalar y a que se ha demostrado que la lactostatina es una molécula prometedora

para la prevención de la hipercolesterolemia, se ha planteado que las microalgas son un enfoque prometedor alternativo para ser utilizadas como fábricas de péptidos mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Además de la lactostatina, otros péptidos hipocolesterolémicos se han expresado en diversas plataformas (Tabla 17.5).

Tabla 17.5: Péptidos hipocolesterolémicos producidos en diferentes sistemas de expresión (Modificado de González-Ortega *et al.*, 2015).

Péptido	Sistema de expresión	Producción	Prueba de funcionalidad	Referencia
IIAEK	Arroz	2 mg/g de semilla seca	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratas a una dosis de 300 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Cabanos <i>et al.</i> , 2013
IIAEK	Arroz	1.6 mg/g de semilla seca	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratas a una dosis de 300 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Wakasa <i>et al.</i> , 2011
IIAEK	<i>E. coli</i>	29.9% de Proteína Total Celular	No reportado	Prak y Utsumi, 2009
VPDPR	<i>E. coli</i>	20% Proteína Total Celular	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratones a una dosis de 100 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Takenaka <i>et al.</i> , 2000, 2003
LPYPR	Soya	0.2 % Proteína Total Soluble	No reportado	Nishizawa <i>et al.</i> , 2008
LPLPR	<i>E. coli</i>	20% Proteína Total Celular	Contracción del íleo en cerdos	Takenaka <i>et al.</i> , 2001
LPYPR	<i>E. coli</i>	15% Proteína Total Celular	No reportado	Takenaka <i>et al.</i> , 2000
DPR	<i>E. coli</i>	15% Proteína Total Celular	Efecto hipocolesterolémicos después de la administración oral en ratones a una dosis de 50 mg kg ⁻¹ de peso corporal / día	Takenaka <i>et al.</i> , 2004, 2003
IIAEK	<i>C. reinhardtii</i>	2.2 a 5.5% Proteína Total Soluble	No reportado	López-Limón <i>et al.</i> , 2014

Se ha publicado el diseño de un gen sintético optimizado para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*, el cual contiene nueve repeticiones en tándem del péptido lactostatina y una etiqueta de histidina para facilitar su caracterización. Dicho gen fue clonado en los vectores p463 y p464, los cuales son específicos para el cloroplasto de *C. reinhardtii*. El vector p463 contiene el promotor *rbcl* mientras que el vector p464 contiene el promotor *atpA*. Las construcciones obtenidas fueron confirmadas por PCR, perfil de restricción y secuenciación. Estas construcciones fueron utilizadas para transformar el cloroplasto de la microalga mediante biobalística. Las posibles transformantes fueron seleccionadas después de 5 rondas de selección en medio con espectinomicina (100 mg/L). Después de la extracción de ADN genómico, las transformantes se identificaron por PCR y se cuantificó la proteína recombinante por ensayo de ELISA obteniendo una producción de entre 2.2 a 5.5% de proteína total soluble recombinante utilizando el vector p463 y p464, respectivamente. También fue posible identificar a la proteína por ensayos de Western blot. Para aumentar la presión de selección, en cada resiembra de las microalgas transformadas se fue incrementando la concentración de espectinomicina, siendo capaces de crecer hasta en 1500 mg/L de este antibiótico. Estos resultados demuestran que el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* puede servir como una plataforma de expresión para la producción de péptidos con actividad hipocolesterolemica. Sin embargo, aún no se reporta la funcionalidad de dicho péptido.

Péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo de alta prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV). Se estima que cerca de 1.13 billones de personas padecen hipertensión. El término “hipertensión arterial” se refiere a la elevación crónica de la presión sanguínea sistólica, se produce cuando el corazón se contrae; la presión diastólica, se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro; cuanto más alta se mantiene la presión (sistólica o diastólica) mayores son la morbilidad y la mortalidad de las enfermedades cardiovasculares.

Los valores normales de ambas presiones, sistólica y diastólica, son particularmente importantes para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro o los riñones y para la salud, y el bienestar en

general. La HTA se está convirtiendo en un problema de salud cada vez más común debido al aumento de la longevidad y la prevalencia de los factores que contribuyen a su desarrollo como la obesidad, la inactividad física y la dieta poco saludable. Dentro de las estrategias que se siguen para el tratamiento de la HTA se encuentran una variedad de modificaciones en el estilo de vida del paciente que incluyen la pérdida de peso en personas con sobrepeso, la actividad física, la moderación de la ingesta de alcohol, en el consumo de frutas y hortalizas frescas y la reducción de la ingesta de grasa saturada y sodio en la dieta. La decisión de iniciar un tratamiento farmacológico depende de los niveles de la presión arterial y del riesgo cardiovascular global del paciente.

Los principales medicamentos utilizados para el tratamiento de reducción de la presión arterial son los siguientes: diuréticos, betabloqueantes, antagonistas del calcio, inhibidores de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina), antagonistas de la angiotensina II y bloqueadores alfa adrenérgicos. Algunos de estos medicamentos poseen ciertas contraindicaciones o se deben utilizar con precaución en ciertas condiciones (Tabla 17.6).

Tabla 17.6.- Contraindicaciones y precauciones de fármacos antihipertensivos (Modificado de WHO, Hypertension guidelines; 2019)

Fármaco	Contraindicaciones	Fármaco	Precauciones
IECA	Embarazo Hipertensión Estenosis bilateral de arteria renal	α - bloqueadores Clonidina	Insuficiencia cardíaca congestiva Síndrome de abstinencia
β bloqueadores	Bloqueo auriculoventricular de alto grado Bradicardia severa Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El fenómeno de Raynaud	Metildopa Reserpina Bloqueadores de canales de calcio	Hepatotoxicidad Depresión Úlcera péptica Insuficiencia cardíaca congestiva

Además de los fármacos, en varios estudios se ha reportado que ciertos péptidos bioactivos presentan actividad antihipertensiva, los cuales se han obtenido a partir de las proteínas de distintos alimentos, tanto de origen animal como vegetal. Los principales péptidos antihipertensivos son aquellos que provienen de las proteínas derivadas de la leche y del huevo.

El primer péptido antihipertensivos reportado en el huevo fue un octapéptido con la secuencia de aminoácidos Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL). Esta secuencia está presente en la ovoalbúmina, que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo. El péptido en cuestión mostró actividad vasodilatadora parcialmente dependiente de endotelio en arterias mesentéricas caninas y se denominó ovokinina. La ovokinina mostró efectos antihipertensivos cuando se administró en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en dosis altas. El efecto antihipertensivo de este péptido se potenciaba cuando el péptido se administraba oralmente a las ratas emulsionado en yema de huevo. Se postuló que los fosfolípidos de la yema de huevo aumentaban la disponibilidad oral de la ovokinina porque mejoraban su absorción intestinal y porque protegían al péptido de la digestión por las peptidasas intestinales.

El segundo péptido aislado de las proteínas del huevo fue un hexapéptido con actividad relajante vascular que se caracterizó como el fragmento 2-7 de la ovokinina; su secuencia es: Arg-Ala-Asp-His-Phe-Leu (RADHPF). Esta secuencia se purificó a partir de un hidrolizado de ovoalbúmina con quimiotripsina. Este péptido causa relajación del endotelio de las arterias mesentéricas de las ratas espontáneamente hipertensas. Esta relajación esta principalmente mediada por óxido nítrico. Se demostró que la presión arterial de las ratas SHR disminuía cuando se administraba por vía oral dosis de ovokinina (2-7) diez veces inferiores a las dosis eficaces de ovokinina. Se comprobó que la administración intravenosa de ovokinina (2-7) no causaba cambios significativos en la presión arterial de las ratas SHR. La administración a concentraciones muy elevadas del péptido por esta vía sólo ocasionaba, paradójicamente, una leve disminución de esta variable.

Se ha intentado mejorar la actividad de los péptidos antihipertensivos administrados por vía oral mediante modificaciones estructurales. Se han sintetizado, por ejemplo, algunos derivados de la ovokinina (2-7), entre ellos, podemos destacar el péptido Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp (RPLKPW) denominado novokinina. Esta secuencia ha mostrado mayor actividad que la ovokinina (2-7) tras su administración oral a las ratas SHR. Las sustituciones de aminoácidos realizadas a este péptido le confieren, probablemente, mayor resistencia a las proteasas del tracto digestivo.

También se han reportado péptidos antihipertensivos en bacterias ácido-lácticas tales como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* o *Lactococcus lactis* subs. *cremoris*) en los que la

acción antihipertensiva se debe a la presencia de los péptidos formados por Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) los cuales han demostrado su efectividad para disminuir la presión arterial en ratas hipertensas alimentadas con estos péptidos por 5 días.

A pesar de las ventajas que representan los péptidos antihipertensivos, la principal limitante que muestran es la baja concentración a la que se encuentran en los alimentos y dificultades en los procesos de purificación debido a su bajo peso molecular. Estas limitantes han planteado la necesidad de desarrollar nuevos enfoques haciendo uso de la tecnología del ADN recombinante.

Se han producido en *Chlamydomonas reinhardtii* péptidos antihipertensivos mediante el diseño de un gen sintético con repeticiones en tándem del péptido VLPVP. Se confirmó por PCR la presencia del transgén en las cepas de *C. reinhardtii* modificadas genéticamente. Mediante análisis por ELISA, usando un anticuerpo anti-VLPVP, se determinó que la cantidad de péptido recombinante en las microalgas fue entre 0.87 a 1.58 mg/ mL de proteína total soluble. Después de liofilizar la biomasa resultante se encontró que la producción más alta fue de 0.292 mg de proteína recombinante por mg de biomasa. Con dicha biomasa se simuló una digestión intestinal utilizando tres proteasas (pepsina, tripsina y quimiotripsina); el hidrolizado resultante se analizó por HPLC y se logró identificar al péptido VLVPV por comparación de los tiempos de retención con un estándar obtenido por síntesis química. Además, se demostró que la administración intragástrica de la biomasa de la cepa modificada genéticamente a ratas espontáneas hipertensas a una dosis de 30 mg/Kg de peso de proteína recombinante redujo significativamente la presión arterial sistólica en 6h. De igual manera, a la misma dosis, la proteína recombinante mostró un efecto inhibitorio de la ECA en ensayos *in vitro* en plasma y pulmón macerado, lo que explicaría el mecanismo de acción de este péptido antihipertensivo. Este fue el primer estudio que mostró el potencial de *C. reinhardtii* para producir un péptido antihipertensivo como suplemento alimenticio para pacientes con hipertensión. Cabe señalar, además, que no se requirió un proceso de purificación del péptido para obtener una disminución en la presión arterial.

En *C. reinhardtii* se han expresado los péptidos RPLKPW, LKPNM, y AINPSK, los cuales han demostrado actividad antihipertensiva. En este trabajo se diseñó una proteína de fusión conteniendo los tres péptidos mencionados, unidos por varios aminoácidos correspondientes a los sitios de corte de las proteasas gastrointestinales más comunes. El gen que codifica para di-

cha proteína de fusión se optimizó para su expresión en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Los análisis moleculares confirmaron la presencia del transgén insertado en el genoma del cloroplasto de la microalga. De los 3 péptidos incluidos en la proteína de fusión, solo los péptidos RPLKPW y AINPSK fueron identificados por HPLC después de una digestión gastrointestinal *in vitro* usando la biomasa liofilizada. Se propone que el péptido LKPNM que no se identificó pudo ser degradado por proteasas. La actividad antihipertensiva fue evaluada usando el modelo de ratas espontáneamente hipertensas mediante administración intragástrica de la biomasa resuspendida en agua usando 10 mg de proteína recombinante/ kg de peso. La mayor disminución de la presión arterial se observó a esta dosis después de 6h de administración.

Estos resultados sugieren que estas cepas transplastómicas podrían usarse para obtener una gran cantidad de péptidos antihipertensivos que podrían ser útiles para la producción de alimentos funcionales.

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) forman parte importante del sistema inmune innato y se encuentran en distintos organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Se conocen como sustancias polifacéticas que presentan complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción del patógeno a través de su membrana, o afectando puntos específicos internos, como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas, incluso interactuando con el huésped con funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización.

Estos péptidos se singularizan por ser pequeños (entre 5 y 50 residuos de aminoácidos), altamente catiónicos y anfipáticos. Tienen amplio espectro y sus mecanismos de acción se caracterizaron en términos de interacciones péptido-membrana, induciendo la destrucción de la membrana a través de poros. Algunos PAM actúan solo contra las bacterias planctónicas, y otros que solo atacan a las bacterias que están organizadas en una estructura compleja, conocida como biofilm, que es responsable de la mayoría de las infecciones clínicas. Algunos péptidos tienen propiedades antivirales o antifúngicas, e incluso actividad anticancerígena.

La generación de resistencia a los péptidos antimicrobianos es mucho menor si se compara con la generada con los antibióticos convencionales, existen

mecanismos de resistencia de los PAM ya descritos, como la degradación de proteasas, la liberación de proteínas inhibitoras o los cambios de conformación de la membrana externa del patógeno. El estudio de estas sustancias ha permitido evidenciar su uso potencial en el ámbito clínico para contrarrestar los inconvenientes de la resistencia a los antibióticos. Los péptidos antimicrobianos muestran grandes expectativas para abordar el problema de resistencia a los antibióticos y antimicrobianos ya que es un motivo de preocupación mundial según datos y cifras de la OMS (Organización Mundial de la Salud), debido a que esta se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos). Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Esto supone un gran riesgo de salud y una preocupación que requiere de medidas inmediatas pues al aparecer nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad, la prolongación de la enfermedad y la muerte, esto supone un aumento en el costo de la atención sanitaria por la mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva.

Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.

Las bacterias son los patógenos más estudiado para reconocer los mecanismos de acción y son responsables de infecciones clínicas frecuentes; actualmente hay un gran énfasis en las cepas ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter species*), y otras especies multirresistentes. Las bacterias gram negativas tienen una membrana lipídica externa rica en lipopolisacáridos (LPS), una región intermedia compuesta de peptidoglicanos y una membrana lipídica interna que contiene cardiolipina en las regiones apicales. Las bacterias gram positivas tienen una gruesa matriz de peptidoglicanos, enriquecidos en ácidos teicoicos y teicurónicos.

Biológicamente, al inicio, los PAM interactúan con los fosfolípidos de la membrana de la célula huésped (Figura 17.11).

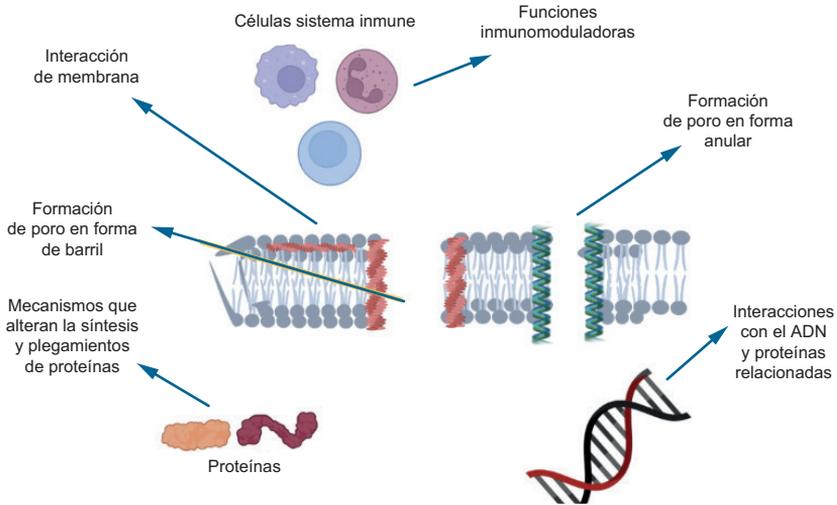


Figura 17.11. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.
(Tomado y modificado de Téllez y Castaño, 2010).

A continuación, se enuncian los pasos de esta interacción primaria:

a) Interacciones peptídicas iniciales con la membrana diana. Los PAM inicialmente atacan a los microorganismos a través de interacciones electrostáticas. Los PAM cargados positivamente y las membranas lipídicas de las bacterias cargadas negativamente forman un enlace mutuo y fuerte. En las bacterias gram negativas, la interacción implica un mecanismo llamado captación autopromocionada. Inicialmente reemplazan los cationes divalentes asociados con LPS y luego desestabilizan la membrana microbiana. Para los PAM, algunos estudios han sugerido que la afinidad de unión a LPS es tres veces mayor en comparación con los cationes divalentes. En bacterias gram positivas, la presencia de ácido teicoico cargado negativamente y el ácido teicurónico en la pared celular los sensibiliza a la capacidad de destrucción del PAM con carga positiva. El modelo de membranas ha demostrado el requisito de un gradiente electroquímico mínimo para la actividad óptima de los PAM.

b) Eventos en membrana. Los PAM crean poros en la membrana del hospedador que conducen a la filtración de iones y metabolitos, lo que causa la despolarización y la pérdida de la respiración acoplada a la membrana y la síntesis de biopolímeros. Estos eventos conducen a la muerte celular. En algunos casos, la membrana del huésped sufre perturbaciones mínimas, pero los procesos intracelulares se interrumpen.

c) Disfunción de membrana. Los mecanismos reconocidos por los cuales los PAM rompen la membrana de la bicapa lipídica de sus objetivos se describen a continuación (Figura 17.12):

- i. Poro en forma de barril. Los péptidos son lo suficientemente largos como para penetrar perpendicularmente en la membrana y formar un poro en forma de barril a través de la bicapa lipídica. El lumen central está compuesto por regiones hidrófobas del péptido rodeadas por la región media de la bicapa de fosfolípidos y la parte interior del canal está compuesta por regiones hidrófilas del péptido.
- ii. Poro en forma anular. El poro está compuesto en parte de péptido y fosfolípido ya que los PAM causan que los fosfolípidos de las dos capas formen una curvatura. Después de la acumulación de los péptidos, se dobla alrededor de un canal central que finalmente comprende el poro transmembrana.
- iii. Modelo de alfombra. Los PAM se unen electrostáticamente a la membrana en una orientación paralela. Después de su acumulación, forman una estructura similar a una alfombra en la membrana de fosfolípido. Cuando alcanzan un umbral de concentración, se desintegran y permeabilizan la membrana mediante un proceso similar al detergente y forman micelas.

d) Inhibición de la síntesis de biopolímeros extracelulares. La inhibición de la biosíntesis de algunos compuestos macromoleculares, incluyendo peptidoglicanos (PGN) (en bacterias grampositivas) y LPS (en bacterias gramnegativas) como el componente principal de su pared celular y membrana externa, es un importante mecanismo de acción de los PAM. La biosíntesis de PGN está relacionada estructuralmente con la integridad y la función de la membrana. Los PAM se unen a los precursores de PGN en lugar de a las enzimas que ayudan

en su síntesis e interfieren con otros procesos de formación de PGN al obstruir estéricamente la actividad de la enzima en lugar de afectar directamente la enzima. El objetivo deseado para los PAM es el lípido II, un importante precursor de la PGN, el PAM se une al lípido II por diferentes motivos de unión y, por consiguiente, inhibe la biosíntesis de la pared celular.

e) Inhibición de las funciones intracelulares. La inhibición de algunos procesos intracelulares clave, como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la interacción con ATP y la inhibición directa de las acciones de ciertas enzimas dependientes de ATP son otros mecanismos utilizados por las PAM para causar la muerte celular.

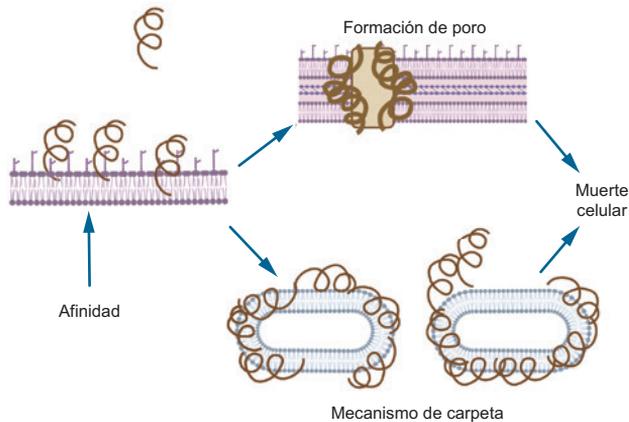


Figura 17.12. La interacción péptido-membrana desemboca en la muerte del patógeno blanco. Modificado de Ciurac *et al.*, 2019.

Clasificación de los péptidos antimicrobianos.

Los PAM son un grupo único y diverso de moléculas, que está dividido en 4 subgrupos dado por su contenido de aminoácidos y estructura.

Grupo 1. Contiene péptidos antimicrobianos aniónicos y son muy pequeños. Se encuentran en extractos surfactantes, fluidos de lavados bronquial-alveolares y células epiteliales del tracto respiratorio. Son activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Grupo 2. Lo forman alrededor de 290 péptidos catiónicos y tienen un tamaño de 40 aminoácidos (PM aproximado de 4,000 Da); carecen de residuos de cisteína y algunas veces tienen una bisagra en el centro. En solución acuosa, muchos de estos péptidos no tienen estructura definida, pero en presencia de trifenetanol, SDS, micelas, vesículas fosfolipídicas, liposomas o lípido A, toda la molécula o una parte de ésta adopta una estructura de α -hélice.

Grupo 3. Dentro de esta categoría se encuentran aproximadamente 44 péptidos catiónicos. Estos péptidos carecen de residuos de cisteína y son lineares, aunque algunos pueden formar estructuras de giros extendidos.

Grupo 4. Está formado por péptidos catiónicos y aniónicos, consta de 380 péptidos los cuales contienen residuos de cisteína, forman enlaces disulfuro y estructuras β -plegadas estables. Estos fragmentos tienen actividad antimicrobiana, sin embargo, su papel en la inmunidad innata no es claro.

Otra clasificación para los péptidos antimicrobianos está en relación con los patógenos contra los cuales tienen mayor acción, dentro de esta clasificación están los antibacteriales, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios. La acción de estos antimicrobianos es proporcional a sus mecanismos de acción.

El péptido antimicrobiano Flo, proveniente del árbol de *Moringa oleifera* se ha expresado en el cloroplasto de las microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*, después de la transformación por biobalística se verificó la inserción del transgén por PCR y se comprobó la homoplasia en las líneas resistentes a espectinomicina. Los ensayos antimicrobianos demostraron que la proteína total soluble e insoluble de la cepa de *N. oculata* transformada es capaz de inhibir el crecimiento de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Aunque la meta de utilizar nuevas alternativas para la producción de péptidos antimicrobianos que puedan ser útiles como coadyuvantes en la terapia con antibióticos o su completa sustitución para reducir la multi-resistencia aún es lejana; estos resultados son prometedores y demuestran que la transformación del cloroplasto de estas 3 especies de microalgas funciona como una plataforma de expresión estable para la producción del péptido Flo con potencial para ser utilizado como antibacteriano.

Enfoques emergentes sobre la producción de proteínas recombinantes en microalgas

El uso de microalgas como biofábricas de proteínas recombinantes es una aplicación industrial novedosa y prometedora. Sin embargo, existen ciertos puntos que dificultan la producción recombinante y sobre los cuales se está trabajando. Actualmente, la velocidad a la que se pueden producir y probar nuevas líneas transgénicas de microalgas es un punto de inflexión ya que la gran mayoría de la investigación referente a la expresión recombinante en el cloroplasto implica construcciones de un solo gen utilizando enfoques convencionales de clonación basados en enzimas de restricción, lo cual incrementa el tiempo de obtención de transformantes. Con los nuevos avances sobre la aplicación de los principios de la biología sintética a la ingeniería de plastómas, en un futuro cercano se podrán contar con estrategias de diseño más ambiciosas que implican un rediseño *in silico* extenso del plastóma. Con este rediseño se podría editar el genoma del plastóma en diversas formas como: eliminación de porciones de ADN no esenciales, la refactorización o reestructuración de los genes endógenos esenciales en grupos funcionales y manipulación de múltiples transgenes en diferentes loci. El ensamblaje y la entrega de tales genomas sintéticos es técnicamente factible, lo cual se demostró al trabajar con el plastóma de *C. reinhardtii*, que fue ensamblado en una levadura para posteriormente transformar células de *C. reinhardtii* mediante bombardeo con micropartículas. Este sistema permite la generación de modificaciones genéticas simultáneas, sistemáticas y complejas en múltiples loci *in vivo*. Ahora bien, el desafío es desarrollar estrategias de selección que permitan el reemplazo limpio del plastoma endógeno con la versión sintética sin eventos de recombinación indeseables.

Otro desafío es mejorar significativamente el rendimiento del producto mediante el uso de elementos *cis* sintéticos para impulsar la expresión. Actualmente, los promotores y las UTR 5' utilizados para expresar transgenes se derivan de genes fotosintéticos endógenos. En algunos casos, los niveles de expresión pueden mejorarse utilizando el promotor más fuerte del gen para el RNA ribosómico 16S fusionado a la UTR 5' de un gen fotosintético. Incrementar los estudios sobre el diseño de promotores sintéticos y UTR, además de un mejor conocimiento de las reglas de optimización de codones, incrementarán el rendimiento promedio de proteína recombinante desde el valor actual de ~

1% TSP al nivel >10% requerido para una plataforma comercial. Este aumento en el rendimiento debe ir acompañado de mejoras en la producción de biomasa de algas fototróficas para que la plataforma sea comercialmente competitiva. Dichas mejoras serán el resultado de una combinación de optimización de medios de cultivo, mejoras en el diseño del fotobiorreactor (PBR) y domesticación de la cepa, por ejemplo, la selección de mutantes con un tamaño reducido de antenas cosechadoras de luz que muestran una mayor productividad en PBR como consecuencia de una mayor penetración de la luz.

Por otra parte, el uso de antibióticos para recuperar líneas transgénicas se considera un cuello de botella hacia la comercialización, ya que además de las preocupaciones de seguridad, la expresión de genes desintoxicantes de antibióticos consume recursos celulares para su expresión, lo que resulta en una carga metabólica en la maquinaria celular. Sin embargo, se han desarrollado estrategias para obtener células transformadas de *C. reinhardtii* sin utilizar marcadores de selección. Las microalgas han demostrado su utilidad y potencial como plataformas de producción de proteínas y péptidos terapéuticos, y ahora parecen estar preparadas para convertirse en la alternativa “verde” de los sistemas actuales de producción de proteínas recombinantes tradicionales.

Abreviaturas

aadA: Aminoglucósido adeniltransferasa
 ADN: Ácido Desoxirribonucleico
 ADN-T: Ácido Desoxirribonucleico de Transferencia
aphA-6: aminoglucósidos fosfotransferasa
 ARN: Ácido Ribonucleico
 ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero
 ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosomal
 ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo
 ATP: Adenosín Trifosfato
atpA: Promotor de ATP sintasa
badh: betaína aldehído deshidrogenasa
 CL4: Anticuerpo monoclonal contra hepatitis
 CYC6: Citocromo C6
 DO: Densidad Óptica

ECV: Enfermedades Cardiovasculares
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina
ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter espe-*
cies
GRAS: Generalmente Reconocidas Como Seguras
HDL: Lipoproteína de alta densidad
HEPES: Ácido Hidroxietil Piperazina Etanosulfónico
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSP70A: Proteína de choque térmico 70 A
HTA: Hipertensión arterial
LDL: Lipoproteína de baja densidad
LPS: lipopolisacáridos
MPM: Marcador Peso Molecular
NB: Caldo Nutritivo
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAM: Péptido Antimicrobiano
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG: Polietilenglicol
PGN: Peptidoglicanos
pH: Potencial de Hidrógeno
PM: Peso Molecular
RUBISCO: Unidad Pequeña de la Ribulosa Bifosfato Carboxilasa
RSCBS2: Subunidad pequeña 2 de la RUBISCO
SHR: Ratas Espontáneamente Hipertensas
SiC: Carburo de Silicio
TAP: Tris acetato fosfato
TMP: Potencial Transmembrana
UTR: Región no Traducida
WT: Tipo Silvestre
YM: Agar para levaduras y mohos

Glosario

Acarreadores: Molécula que transporta o traslada a otra.

Ácidos nucleicos: Biomoléculas que cumplen funciones esenciales en todas las células y virus.

Antihipertensivos: Medicamentos utilizados para disminuir el riesgo cardiovascular en los pacientes con hipertensión arterial controlando la presión.

Beta-globulina: Es un conjunto de proteínas presentes en la sangre que sirven para el transporte de diferentes sustancias.

Biotecnología: Agrupa todo el conjunto de técnicas, procesos y métodos que utilizan organismos vivos, como las bacterias, hongos y virus, partes de ellos o sistemas biológicos derivados de los mismos. Esto con la finalidad de generar y/o mejorar bienes y/o procesos que sean de interés para el ser humano.

Cepa: Población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular.

Clonas: Réplica genética de otra célula, tejido u organismo.

Clorófitas: División de algas verdes que incluye especies de organismos eucariotas en su mayoría acuáticos fotosintéticos.

Cloroplasto: Organelo encargado de llevar a cabo la fotosíntesis en plantas; estos evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas.

Diatomeas: Grupo de algas unicelulares que constituyen uno de los tipos más comunes de fitoplancton.

Dinoflagelados: Extenso grupo de protistas flagelados.

Endosimbiosis: Describe el paso de las células procariotas a células eucariotas mediante incorporaciones simbiogénicas de bacterias.

Espermidina: Poliamina estable e higroscópica encargada de modular la actividad enzimática de la lisozima y de la fosfatasa alcalina, mantiene el potencial de membrana, y controla el volumen y el pH intracelular.

Expresión transitoria: Proceso por el cual la información codificada por un gen se encuentra de forma variable y limitada en tiempo.

Fotoautótrofo: Organismos fotótrofos capaces de tomar fotones de la luz solar como fuente de energía.

Fotosíntesis: Proceso químico que se produce en las plantas, las algas y algunos tipos de bacterias cuando se exponen a la luz del sol.

Genes: Es la unidad física y funcional básica de la herencia. Los genes están formados por ADN.

Genoma: Conjunto formado por el material genético del ADN.

Heterólogos: Genes que tienen diferente origen y función.

Heteroplastia: Presencia de más de un tipo de genoma dentro de una célula vegetal.

Heterótrofo: Organismo que no puede producir su propio alimento, sino que se nutre de otras fuentes de carbono orgánico, principalmente materia vegetal o animal

Homología: Estudio comparativo de los seres vivos, la homología es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes de dos organismos distintos cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Homoplastia: Presencia de un único tipo de ADN en el plástido.

Ingeniería Genética: Es un proceso que emplea tecnologías de laboratorio para alterar la composición del ADN.

Marcador de selección: Es un segmento de ADN con una ubicación física conocida en un cromosoma.

Nucleótidos: Estructura fundamental básica de los ácidos nucleicos (ARN y ADN).

Nutracéuticos: Producto presentado como una alternativa farmacéutica que dice tener beneficios fisiológicos.

Oligonucleótidos: Segmentos cortos monocatenarios o bicatenarios de ácidos nucleicos que se unen entre sí para formar polímeros biológicos monocatenarios.

Péptido: Molécula formada por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Plásmidos: Molécula de ADN circular que se encuentra en las bacterias y algunos otros organismos microscópicos.

Plástidos: Orgánulos celulares eucarióticos, propios de las plantas y algas.

Plastoma: Es el genoma cloroplástico, también llamado ADN cloroplástico, es el material genético de los cloroplastos, los orgánulos citoplasmáticos característicos de los organismos autótrofos fotosintéticos, tales como las plantas y las algas.

Promotores: Es una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN al ARN.

Proteínas: Moléculas complejas que desempeñan muchas funciones críticas en distintos organismos.

Proteínas glicosiladas: Proteínas a las que se le ha añadido una cadena de glúcidos.

Recombinación Homologa: Es un tipo de recombinación genética en la que las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN.

Secuencias Intrónicas: Secuencia de ADN que forma parte de un gen pero no codifica ninguna secuencia de aminoácidos de la proteína respectiva.

Suspensión: Mezcla heterogénea de sustancias compuesta por un sólido fino disperso en un líquido.

Transgén: Gen o material genético que ha sido transferido de un organismo a otro, ya sea de forma natural, o artificial.

Vector de transformación: Son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante.

Vortex: Mezclador de vórtice, dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos.

Bibliografía

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. & Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3131-138. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75878-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75878-3)

Adachi, T., Sahara, T., Okuyama, H., & Morita, N. (2017). Glassb-based genetic transformation: An efficient method for transformation of *Thraustochytrid* Microorganisms. *Journal of Oleo Science*, 795(7), 791-795. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17084>

Adem, M., Beyene, D., & Feyissa, T. (2017). Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 13(30). <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0179-1>

Arce-Montoya, M., Fernández-González, J. A., Rojas-Arzaluz, M., Palacios-López, O.A., Garza-Avelar, H.D. & Gómez-Anduro, G.A. (2017). Transformación genética de microalgas. En Arredondo-Vega, B.O., Vol-

- tolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M. & Gómez-Anduro, G.A. (Eds.) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 130-143). La Paz, B.C.S.: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Barrera, D. J., y Mayfield, S. P. (2013). High-value Recombinant Protein Production in Microalgae. En A. Richmond y Q. Hu (Eds.) *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 532-544). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781118567166.ch27>
- Beltran, J., Aguilera-Mendoza, L., & Brizuela, C. (2018). Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification: an evolutionary feature weighting approach. *BMC Genomics*, *19*(677), 79-102. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5030-1>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H. & Martin, C. (2018). Familial Hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Science*, *19*(11), 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Bertalan, I., Munder, M.C., WeiB, C., Kopf, J., Fischer, D. & Johanningmeier, U. (2015). A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, *195*, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.017>
- Cabanos, C., Ekyo, A., Amari, Y., Kato, N., Kuroda, M., Nagaoka, S., Takaiwa, F., Utsumi, S. & Maruyama N., (2013). High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. *Transgenic Research*, *22*(3), 629-621. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9672-5>.
- Carrizalez-López, C., González-Ortega, O., Ochoa-Méndez, C. E., Galván-Moreno, F. U., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., Bañuelos-Hernández, B., Paz-Maldonado, L. M. T., Castro-Moreno, P., Ibarra-Barajas, M., & Soria-Guerra, R. E. (2018). Expression of multiple antihypertensive peptides as a fusion protein in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, *30*(3), 1701-1709. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1339-4>
- Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Szaub, J., Scibilia, L., Ballottari, M., Purton, S., & Bassi, R. (2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor.

- Biotechnology for biofuels*, 7(157). <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0157-z>
- Cha, T. S., Yee, W. & Aziz, A. (2012). Assessment of factors affecting *Agrobacterium* -mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1771–1779. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0991-0>
- Cha, T.S., Yee, W., & Azis, B.A. (2011). Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of microalgae. *Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow*, 633–637.
- Chang, L. (2018). *3D Nanochannel Array Platform for High-throughput Cell Manipulation and Nano-electroporation*. Tesis de doctorado. Universidad del estado de Ohio.
- Cheng, R., Ma, R., Li, K., Rong, H., Lin, X., Wang, Z. Yang, S. & Ma, Y. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological Research*, 167, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.003>
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X. & Lu, J. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
- Coll, J. M. (2006). Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(4), 316–330.
- Dávalos-Guzmán, S. (2019). *Expresión del péptido antimicrobiano Flo en microalgas*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- de Moura, R. S., Viana, F. S. C., Souza, M. A. V, Kovary, K., Guedes, D. C., Oliveira, E. P. B., Rubenich, L. M. S., Carvalho, L. C. R. M., Oliveira, R. M., Tano, T. & Correia, M. L. G. (2002). Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(11), 1515–1520. <https://doi.org/10.1211/002235702153>.
- Dehghani, J., Adibkia, K., Movafeghi, A., Maleki-kakelar, H., & Saeedi, N. (2020). Towards a new avenue for producing therapeutic proteins: Microalgae as a tempting green biofactory. *Biotechnology Advances*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107499>
- Domingues M.M., Felício M.R. & Gonçalves S. (2019). Antimicrobial peptides: *Effect on Bacterial Cells*. En Santos N., Carvalho F. (Eds.) *Atomic Force Microscopy*. (pp. 233-242). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_13

- Doron, L., Segal, N., & Shapira, M. (2016). Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications. *Frontiers in Plant Science*, 7(505), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>
- Dunahay, T.G., Adler, S.A. & Jarvik, J.W. (1997). Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers. En Tuan R.S. (Eds.), *Recombinant Gene Expression Protocols*. (pp. 503-509). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:503>
- Dyo, Y.M. & Purton, S. (2018). The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology*, 164(2), 113-121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000599>
- Elghabi, Z., Ruf, S. & Bock, R. (2011). Biolistic co-transformation of the nuclear and plastid genomes. *The Plant Journal*, 67, 941-948. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04631.x>
- Feng, S., Xue, L., Liu, H. & Lu, P. (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1433–1439. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9333-1>
- Fuentes, P., Armarego-Marriott, T. & Bock, R. (2018). Plastid transformation and its application in metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.004>.
- Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K., & Yoshikawa, M. (1995a). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16(5), 785-790. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781\(95\)00054-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)00054-N)
- Fujita, H., Yamagami, T. & Ohshima, K. (2001). Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*, 21(8), 1149-1158. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00333-5](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00333-5).
- Galván, A., González-Ballester D. & Fernández, E. (2007). Insertional Mutagenesis as a Tool to Study Genes/Functions in *Chlamydomonas*. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds.), *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 77-89). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_7

- Gerken, H.G., Donohoe, B. & Knoshaug, E.P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237, 239–253. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>
- Gimpel J.A., Nour-Eldin H.H., Scranton M.A., Li D. & Mayfield S.P. (2016). Refactoring the six-gene Photosystem II core in the chloroplast of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 589–596. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00076>.
- Gómez-Espinoza, O; Garro-Monge, G; Peraza, J; NúñezMontero, K; Meneses-Montero, K. & Guerrero-Barrantes, M. (2018). Transformación genética de *Chlorella sorokiniana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Tecnología en Marcha*, 31(1), 160-166. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3505>
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X. & Gao H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1879-1890. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1032-6>
- González-Martínez, L. (2016). *Análisis inmunológico de epítomos relevantes del virus sincicial respiratorio producidos en plantas*. Tesis de doctorado, Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología. Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología.
- González-Ortega, O., López-Limón, A. R., Morales-Domínguez, J. F., & Soria-Guerra, R. E. (2015). Production and purification of recombinant hypocholesterolemic peptides. *Biotechnology Letters*, 37(1), 41-54. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1657-4>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). *Agrobacterium* -mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances*, 37(1), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Guo, S. L., Zhao, X. Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, Md. A., Ho, S. H., Bai, F. W., & Chang, J.S. (2013). Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.020>

- Gupta, P.L., Lee, S.M., & Choi, H.J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World journal of microbiology and biotechnology*, 31(9), 1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
- Hancock, R. E. W., & Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(1), 79-83. <https://doi.org/10.2174/1568005024605855>
- Hernández-Esquivel, A.K. (2015). *Modificación genética de plantas mediante cisgénesis e intragénesis. ¿Un reto regulatorio?*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Imam, S. H., & Snell, W. J. (1988). The *Chlamydomonas* cell wall degrading enzyme, lysin, acts on two substrates within the framework of the wall. *Journal of Cell Biology*, 106, 2211–2221. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.6.2211>
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 193-210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Jayant, P. R., Rajendra, M. G., Darasing, R. R. & Mahendra, D. (2017). A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3191–3207. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.373>
- Jinkerson, R. E., & Jonikas, M. C. (2015). Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *The Plant Journal*, 82, 393–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.12801>
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, volvocales). *Phycological Society of America*, 45, 642–649. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00688.x>
- Khatiwada, B., Kautto, L., Sunna, A., Sun, A., & Nevalainen, H. (2019). Nuclear transformation of the versatile microalga *Euglena gracilis*. *Algal Research*, 37, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.022>
- Kilian, O., Benemann, C.S., Niyogi, K.K., & Vick, B. (2014). High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21265-21269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105861108>
- Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), 1228-1232. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1228>
- Koo, J., Park, D. & Kim, H. (2013). Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae*, 28(4), 379-383 <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.4.379>.
- Kumar, A., Falcao, V. R., & Sayre, R. T. (2013). Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal research*, 2, 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.002>
- León, R., & Fernández, E. (2007). Nuclear Transformation of Eukaryotic Microalgae. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds) *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 1-11). Advances in Experimental Medicine and Biology. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_1
- Li, S. S., & Tsai, H. J. (2009). Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(2), 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.004>
- Lindholm, L.H., Ibsen, H., Dahlöf, B., Devereux, R. B., Beevers, G., Faire, U., Fyhrquist, F., Julius, S., Kjeldsen, S. E., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Nieminen, M.S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H., Aurup, P., Edelman, J., & Snapinn, S. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomized trial against Atenolol. *The Lancet*; 359(9311), 995-1003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08090-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08090-X)
- López-Limón A. R. (2014). *Producción de lactostatina en cloroplastos de Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Lu X.M., Yin W.B., & Hu Z.M. (2006). Chloroplast transformation. En: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 285-304). Methods in Molecular Biology™. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:285>.

- Maruyama, N., Mikami, B., & Utsumi S. (2011). The development of transgenic crops to improve human health by advanced utilization of seed storage proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(5), 823-828. <https://doi.org/10.1271/bbb.100924>
- Matoba, N., Usui, H., Fujita, H. & Yoshikawa, M. (1999). A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxidemediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters*, 452(3), 181-84. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00587-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00587-6)
- Matoba, N., Yamada, Y., Usui, H., Nakagiri, R. & Yoshikawa M. (2001). Designing potent derivatives of Ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; 65(3), 636-39. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.736>
- Mayfield, S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D. & Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2), 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Meisel, H., Walsh, D.J., Murray, B.A., & FitzGerald, R.J. (2006). ACE inhibitory peptides. En Mine V, Shahidi F Taylor y Francis (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. (pp. 269-315). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028836.sec3>
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y., & Ifuku, K. (2013). Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* by multi-pulse electroporation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 874-876. <https://doi.org/10.1271/bbb.120936>
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747-767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>
- Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y., & Nagaoka, S. (2007). A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3), 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.090>.
- Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2-3), 99-101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01503-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01503-7)

- Muñoz, C. F., de Jaeger, L., Sturme, M. H. J., Lip, K. Y. F., Olijslager, J. W. J., Springer, J., Wolbert, E. J. H., Martens, D. E., Eggink, G., Weusthuis, R. A. & Wijffels, R. H. (2018). Improved DNA / protein delivery in microalgae – A simple and reliable method for the prediction of optimal electroporation settings. *Algal Research*, 33, 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.021>
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi K, Kanamaru Y, Taandashi K, & Kuwata T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 11-17. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4298>.
- Nimmo, I. C., Barbrook, A. C., Lassadi, I., Chen, J. E., Geisler, K., Smith, A. G., Aranda, M., Purton, S., Waller, R. F., Nisbet, R., & Howe, C. J. (2019). Genetic transformation of the dinoflagellate chloroplast. *eLife*, 8, e45292. <https://doi.org/10.7554/eLife.45292>
- Nishizawa, K., Kita, A., Doi, C., Yamada, Y., Ohinata, K., Yoshikawa, M., & Ishimoto, M. (2008). Accumulation of the bioactive peptides, novokinin, LPYPR and rubiscolin, in seeds of genetically modified soybean. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3301-3305. <https://doi.org/10.1271/bbb.80468>
- Niu, Y. F., Yang, Z. K., Zhang, M. H., Zhu, C. C., Yang, W. D., Liu, J. S., & Li, H-J. (2012). Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker. *Biotechniques*, 52(6), 1–3. <https://doi.org/10.2144/000113881>
- O'Neill, B.M., Mikkelsen, K.L., Gutierrez, N.M., Cunningham, J.L., Wolff, K.L., Szyjka, S.J., Yohn, C.B., Redding, K.E. & Mendez, M.J. (2012). An exogenous chloroplast genome for complex sequence manipulation in algae. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2782–2792. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1008>
- Ochoa-Méndez, C., Lara-Hernández, I., Aguirre-Bañuelos, P., Ibarra-Barajas, M., Castro-Moreno, P., González-Ortega, O., & Soria-Guerra, R. E. (2016). Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 240, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.001>.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *La resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>

- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine b-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526(2), 131-140. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00116-7).
- Ponce-Alonso, J. (2019). *Expresión del péptido antimicrobiano nisina en microalgas* [Tesis de maestría no publicada, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]
- Potvin, G., & Zhang, Z. (2010). Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.006>
- Prak, K., & Utsumi, S. (2009). Production of a Bioactive Peptide (IIAEK) in *Escherichia coli* using soybean proglycinin A1aB1b as a Carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3792-3799. <https://doi.org/10.1021/jf8034258>.
- Preza, A. M., Jaramillo, M. E., Puebla, A. M., Mateos, J. C., Hernández, R., & Lugo, E. (2010). Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds in relation with *in vitro* antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 61. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-61>
- Purton S. (2007). Tools and Techniques for Chloroplast Transformation of *Chlamydomonas*. En: León R., Galván A., Fernández E. (Eds.) *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. (pp. 34-45). Advances in Experimental Medicine and Biology. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_4
- Radzun, K. A., Wolf, J., Jakob G., Zhang, E., Stephens, E., Ross, I., & Hankamer, B. (2015). Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 8-65. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0238-7>
- Rasala, B. A., Chao, S-S., Pier, M., Barrera, D. J., & Mayfield, S. P. (2014). Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *Plos One* 9(4), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094028>
- Rasala, B. A., Muto, M., Sullivan, J. & Mayfield, S.P. (2011). Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization. *Plant Biotechnology Journal*, 9(6), 674-683. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00620.x>

- Rochaix, J.D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual review of genetics*, 29, 209-230. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001233>
- Run, C., Fang, L., Fan, J., Fan, C., Luo, Y., Hu, Z. & Li, Y. (2016). Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research*, 17, 196–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.002>
- Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Rysz-Górzyńska, M., & Franczyk, B. (2020). The role and function of HDL in patients with chronic kidney disease and the risk of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 601. <https://doi.org/10.3390/ijms21020601>
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-440. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2).
- Santra, T. S. & Tseng, F. G. (2013). Recent trends on micro/nanofluidic single cell electroporation. *Micromachines*, 4, 333-356. <https://doi.org/10.3390/mi4030333>
- Scharff, L. B. & Bock, R. (2014). Synthetic biology in plastids. *Plant Journal*, 78(5), 783-798. <https://doi.org/10.1111/tpj.12356>
- Siddiqui, A., Wei, Z., Boehm, M. & Ahmad, N. (2020). Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/bab.1823>
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., & Mayfield, S. (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32(10), 1373–1383. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>
- Spence, J. D., Barnett, P. A., Linden, W., Ramsden, V., & Taenzer, P. (1999). Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. Recommendations on stress management. *Canadian Medical Association Journal*, 160(9). S46-S50.
- Stevens, G., Dias, R.H., Thomas, K. J. A., Rivera, J. A., Carvalho, N., Barquera, S., Hill, K., & Ezzati, M. (2008). Correction: Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLOS Medicine*, 5(7), e163. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050163>

- Suttangkakul, A., Sirikhachornkit, A., Juntawong, P., Puangtame, W., Chomtong, T., Srifa, S. Sathitnaitham, S., Dumrongthawatchai, W., Jariyachawalid, K., & Vuttipongchaikij, S. (2019). Evaluation of strategies for improving the transgene expression in an oleaginous microalga *Scenedesmus acutus*. *BMC Biotechnology*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0497-z>
- Takenaka, Y., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2001). Introduction of a low molecular weight against peptide for complement C3a receptor into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(5), 1202-1205. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1202>
- Takenaka, Y., Doyama, N., Maruyama, N., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2004). Introduction of DPR, an enterostatin fragment peptide, into soybean beta-conglycinin alpha' subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *68*(1), 253-256. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.253>
- Takenaka, Y., Nakamura, F., Yamamoto, T., & Yoshikawa, M. (2003). Enterostatin (VPDPR) and its peptide fragment DPR reduce serum cholesterol levels after oral administration in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *67*(7), 1620-1622. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1620>
- Takenaka, Y., Utsumi, S., & Yoshikawa, M. (2000). Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *64*(12), 2731-2733. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2731>
- Tandang-Silvas, M. R., Tecson-Mendoza, E. M., Mikami B., Utsumi S. & Maruyama N. (2011). Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 59-73. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133718>
- Taunt, H. N., Stoffels, L., & Purton, S. (2018). Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered*, *9*(1), 48–54. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1377867>
- Téllez, G., & Castaño, J. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, *14*(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Vinod, S., William, R., Siva, V., Jagadeeswar, B., & Venkat, M. (2004). Genetic transformation of the green alga — *Chlamydomonas reinhardtii*

- by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.012>
- Wakasa, Y., Tamakoshi, C., Ohno, T., Hirose, S., Goto, T., Nagaoka, S., & Takaiwa, F. (2011). The hypocholesterolemic activity of transgenic rice seed accumulating lactostatin, a bioactive peptide derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3845-3850. <https://doi.org/10.1021/jf200044j>
- Wani, S.H., Sah, S.K., Sági, L., & Solymosi, K. (2015). Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1391-1430. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0310-5>
- World Health Organization (2019). *Hypertension*. <https://www.who.int/health-topics/hypertension/>
- World Health Organization (2019). *Conducting systematic reviews to inform WHO Guidelines for the pharmacological treatment of hypertension* https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_2
- Wu, J., & Ding, X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 501-506. <https://doi.org/10.1021/jf000695n>.
- Yamada, Y., Matoba, N., Usiu, H., Onishi, K., & Yoshikawa, M. (2002). Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on Ovinin (2-7). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1213-1217. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1213>
- Yamaguchi, N., Kawaguchi, K. & Yamamoto N. (2009). Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *European Journal Pharmacology*, 620, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.005>
- Yang, B., Liu, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2016). *Chlorella* species as hosts for genetic engineering and expression of heterologous proteins: Progress, challenge and perspective. *Biotechnology Journal*, 11, 1244–1261. <https://doi.org/10.1002/biot.201500617>
- Yusuf, S., Reddy, S., Ôunpuu, S., & Anand, S. (2001). Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*, 104(22), 2746-2753. <https://doi.org/10.1161/hc4601.099487>.

- Zhang, C., & Hu, H. (2014). High-efficiency nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation. *Marine genomics* 16, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.10.003>
- Zhong, F., Zhang, X., Ma, J., & Shoemaker, C. F. (2007). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates. *Food Research International*, 40(6), 756-762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.005>.