

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudio proteómico de *Salinibacter ruber* ante diferentes condiciones
salinas**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
MELISSA SEMIRAMIS FANDIÑO MIRANDA

DIRECTORA:
DRA. SANDRA I. RAMÍREZ JIMÉNEZ

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE DE 2021

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Contó con el apoyo financiero del proyecto número 377887 del Fondo AEM-CONACyT.

Los resultados generados a través del presente proyecto de investigación se presentaron durante las actividades académicas del 25 Aniversario del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM celebrado el 3 de mayo de 2021, así como en el Tercer Congreso Latinoamericano de Astrobiología organizado del 3 al 6 de agosto de 2021 por la Sociedad Mexicana de Astrobiología, ambos eventos en modo virtual.

COMITÉ EVALUADOR

Dra. Sandra Ignacia Ramírez Jiménez

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Dra. Josefina Vergara Sánchez

Dra. Lilia Montoya Lorenzana

Mtro. Luis Enrique Cruz Trujillo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento hacia mi directora de tesis, la Dra. Sandra I. Ramírez Jiménez, por su paciencia, confianza y sobre todo el apoyo que me brindó durante este proyecto. Muchas gracias por compartirme sus valiosos conocimientos y la dedicación que ha tenido conmigo para poder concluir esta etapa.

A mi comité de síndicos por su tiempo, sus observaciones y comentarios que me han ayudado a concluir de la mejor manera este proyecto. Especialmente a la Dra. María Luisa Garduño, quien me alentó a concluir esta etapa, gracias por sus palabras que me levantaron el ánimo en un momento difícil.

Gracias a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a sus docentes por brindarme los conocimientos y las herramientas necesarias para ser una profesionista.

Al Centro de Investigaciones Químicas por recibirme en sus instalaciones y por haberme facilitado los medios necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

A mi madre quien siempre se ha esforzado por darle a sus hijos lo mejor, gracias por ese inmenso amor con el que me has educado, por motivarme a seguir adelante siempre dando lo mejor. Te admiro mucho y siempre serás mi mayor ejemplo a seguir.

A Alfredo, gracias por el apoyo incondicional que siempre me has dado, por siempre estar ahí cuando lo he necesitado, por los consejos, por la paciencia y sobre todo el cariño con el que me has criado. Hoy sé que mucho de lo que soy y he logrado en parte es gracias a ti y a la gran influencia que eres para mí. Gracias por ser mi padre.

A Carlos, por estar, alentarme y confiar en mí. Gracias por soportar mis momentos de estrés y apoyarme en todo momento.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	La Astrobiología.....	3
2.2.	El satélite Europa.....	4
2.3.	Los organismos extremófilos	8
2.4.	Los organismos halófilos	10
2.4.1.	Ecología de los organismos halófilos	12
2.4.2.	Mecanismos de adaptación de organismos halófilos	13
2.5.	La bacteria <i>Salinibacter ruber</i>	15
2.6.	Proteómica	21
2.6.1.	La espectrometría de masas	24
2.6.1.1.	Espectrometría de masas en tándem (EM/EM)	26
2.6.2.	Análisis masivo de proteínas	27
2.6.3.	Identificación y cuantificación de proteínas en base al etiquetado isobárico	29
3.	JUSTIFICACIÓN	33
4.	HIPÓTESIS	33
5.	OBJETIVOS	34
5.1.	Objetivo general.....	34
5.2.	Objetivos específicos	34
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	35
6.1.	Activación de la bacteria <i>Salinibacter ruber</i>	35
6.2.	Preparación del preinóculo de <i>Salinibacter ruber</i>	35
6.3.	Preparación de los medios modificados con distintas condiciones salinas....	36
6.4.	Cuantificación de proteína por el método de Bradford	36
6.5.	Análisis masivo de proteínas	37
6.6.	Análisis estadístico	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1.	Resultados de cuantificación de proteínas por Ensayo de Bradford	39
7.2.	Resultados preliminares del análisis masivo de proteínas.....	43
7.2.1.	Chaperonina GroEL 48	
7.2.2.	Factor de elongación EF-Tu.....	52
7.2.3.	ARNt aspartato ligasa	53
7.2.4.	Proteína ribosomal 50S L-21.....	54
7.2.5.	Malato deshidrogenasa.....	54
7.2.6.	Citocromo c oxidasa..	55
8.	CONCLUSIONES	57
9.	PERSPECTIVAS	59
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Clasificación de organismos extremófilos según el ambiente en el que habitan.....	11
Tabla 2.2 Clasificación de organismos halófilos.....	12
Tabla 6.1 Medio nominal DSMZ 936.....	35
Tabla 6.2 Composición de medios modificados.....	36
Tabla 7.1 Resultados de densidad óptica de Gammaglobulina.....	40
Tabla 7.2 Volúmenes de proteína añadido a cada condición y su selección de acuerdo a su densidad óptica.....	42
Tabla 7.3 Cantidad total de proteínas en 100 ml de medio de cultivo.....	43
Tabla 7.4 Lista hipotética de proteínas identificadas.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Composición interna del satélite Europa.....	5
Figura 2.2. Composición química de la superficie de Europa obtenida por el NIMS.....	6
Figura 2.3. Decoloración de la superficie de Europa por la presencia de NaCl irradiado.....	8
Figura 2.4. Ejemplos de ambientes extremos terrestres.....	10
Figura 2.5. Distribución de los organismos halófilos en los tres dominios filogenéticos.....	12
Figura 2.6. Estrategias de haloadaptación utilizadas por los organismos halófilos.....	15
Figura 2.7. Micrografía electrónica de barrido de la cepa M31 (DSM 13855) de <i>Salinibacter ruber</i>	16
Figura 2.8. Árbol filogenético de la familia Salinibacteraceae.....	17
Figura 2.9. Distribución de aislados de <i>Salinibacter ruber</i> en el mundo.....	18
Figura 2.10. Metodología simplificada del análisis proteómico.....	23
Figura 2.11. Representación de fragmentación de un péptido.....	27
Figura 2.12. Comparación entre la secuencia general del análisis convencional de proteínas y el análisis masivo de proteínas (<i>shotgun</i>).....	29
Figura 2.13. Estructura de las etiquetas isobáricas (iTRAQ).....	30
Figura 2.14. Flujo de trabajo de marcaje con reactivos iTRAQ.....	32
Figura 7.1. Grafica de calibración de gammaglobulina.....	41
Figura 7.2. Espectro de ion precursor obtenido por espectrometría de masas.....	45
Figura 7.3. Espectro de ion precursor amplificado y las señales de los aminoácidos que lo conforman.....	46
Figura 7.4. Identificación de péptidos.....	47
Figura 7.5. Estructura cristalina de GroEL- GroES de <i>E. coli</i>	51
Figura 7.6. Ciclo funcional de GroEL-GroES.....	52
Figura 7.7. Ciclo funcional de EF-Tu.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se han encontrado comunidades microbianas en lugares con condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, entre otras. Estos microorganismos que logran desarrollarse en estos ambientes extremos se denominan extremófilos y poseen características bioquímicas y metabólicas que les permiten proliferar en entornos con al menos un parámetro extremo.

Los hábitats hipersalinos son un ejemplo de un ambiente extremo. En ellos se presentan elevadas concentraciones de sal, principalmente de cloruro de sodio (NaCl), además de un alto contenido en iones como K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} y Na^+ (Oueriaghli, 2013). Están distribuidos globalmente y representados principalmente por hábitats acuáticos y suelos hipersalinos (Ventosa *et al.*, 2008). Han existido desde el periodo precámbrico y en ellos habitan comunidades microbianas especializadas en prosperar bajo esas condiciones.

Las bacterias halófilas son un tipo de extremófilos que tienen la capacidad de crecer en condiciones de alta salinidad gracias a que han desarrollado complejos procesos de adaptación que les han permitido afrontar las condiciones ambientales extremas características de los ambientes salinos. Un ejemplo de este tipo de microorganismos es la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber*, una bacteria Gram negativa, quimioorganótrofa, aerobia estricta que requiere una concentración mínima de 150 g/L de NaCl para desarrollarse (Antón *et al.*, 2002). Al ser una de las bacterias halófilas más extremas conocidas presenta características que la asemejan a microorganismos del dominio Arquea, particularmente a la familia *Halobacteriaceae*. Entre estas características se pueden mencionar: su notoria coloración rojiza, típica de microorganismos halófilos extremos que se encuentran en estanques salinos con concentraciones cercanas a la saturación; la acumulación de iones potasio (K^+) en su citoplasma como mecanismo de haloadaptación ante las fuertes presiones osmóticas producidas por las altas concentraciones de sales extracelulares; un alto contenido de residuos ácidos y un bajo contenido de residuos hidrofóbicos en la superficie de sus proteínas, necesarios para mantener la solubilidad de las proteínas ante fuerzas iónicas altas (Mongodin *et al.*, 2005; Oren y Rodríguez-Valera, 2001), característica que las vuelve dependientes de entornos salinos. Asimismo, presenta características del dominio Bacteria, específicamente la acumulación de betaína como soluto compatible.

Además de estas estrategias, en estudios realizados por el grupo de investigación del Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos se ha observado una expresión diferencial de algunas proteínas como posible estrategia de adaptación de *S. ruber* ante el estrés provocado por distintas concentraciones de NaCl y MgSO₄, destacando el aumento en la cantidad de un complejo proteico denominado GroEL-ES (Miranda, 2015).

En 2019 el grupo de investigación mencionado, realizó cinéticas de crecimiento de *S. ruber* en condiciones con diferentes concentraciones de NaCl, MgSO₄ y Na₂SO₄ para saber si la bacteria podría crecer en dichas condiciones, tratando de recrear los distintos escenarios de salinidad que se proponen para la composición del océano líquido subsuperficial del satélite Europa, y encontraron las condiciones óptimas de crecimiento de *S. ruber* para cada condición, concluyendo que esta bacteria si sería capaz de desarrollarse en el océano del satélite Europa, en términos de salinidad (Echavarría, 2019)

Por estas razones es de interés estudiar en detalle el proteoma de esta bacteria, para conocer aspectos particulares sobre la expresión diferencial de sus proteínas cuando se hace crecer en diferentes condiciones salinas basadas en dos diferentes escenarios, uno de ellos definido por NaCl como sal predominante en los océanos terrestres y el segundo escenario definido por sales sulfatadas, que representan la composición salina del océano de agua líquida del satélite Europa, el cual se cree que debido a sus características, es un objeto planetario potencialmente habitable.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La Astrobiología

La Astrobiología es una disciplina científica que busca comprender el origen, la evolución, la distribución y el destino de la vida en el Universo (Ramírez y Terrazas, 2006). Entre sus propósitos se encuentra entender cómo empezó y evolucionó la vida en la Tierra, para lo cual utiliza conocimientos de ecología microbiana, útiles para predecir en qué lugares es posible encontrar vida y descifrar sus señales, para entonces con este conocimiento, poder buscar más eficientemente alguna manifestación de vida en otros planetas (Souza *et al.*, 2004). Para conseguir este objetivo, la búsqueda de esas manifestaciones se ha centrado en ciertos cuerpos planetarios del sistema solar que son considerados potencialmente habitables ya que poseen ciertas características que les permitirían sustentar a la vida como la conocemos.

Gracias a estudios sobre la diversidad de la vida terrestre, se han podido identificar ciertos requerimientos que son indispensables para identificar a un lugar como habitable, es decir, que tenga la capacidad para sustentar la actividad de al menos un organismo conocido (Cockell *et al.*, 2016). El primero de estos requerimientos y quizá el más importante, es la disponibilidad de agua en estado líquido, necesaria debido a que las reacciones biológicas que ocurren en los seres vivos se llevan a cabo en medios acuosos, también porque es el disolvente más propicio para la síntesis molecular y, además, proporciona hidrógeno, elemento que forman una gran variedad de compuestos orgánicos con el carbono y otros elementos biogénicos como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre (C, H, O, N, P, S), que componen a la mayor parte de las moléculas, que a su vez son componentes estructurales o indispensables para el funcionamiento de los seres vivos, como los carbohidratos, lípidos y proteínas (Nelson *et al.*, 2009).

Otro requisito indispensable de un lugar habitable es la presencia de al menos una fuente de energía que permita sustentar un metabolismo. Esta fuente de energía puede provenir de la radiación de una estrella o bien, de reacciones químicas de tipo oxidación-reducción (Javaux, 2006).

Además de estos tres requerimientos, identificados como indispensables, es también importante considerar otros parámetros medio ambientales como la presión, la temperatura, la salinidad, la

presencia de sustancias tóxicas, la radiación, o la actividad geológica (Cockell *et al.*, 2016) para determinar el grado de habitabilidad de dicho ambiente.

De los anteriores requerimientos, el agua líquida es al parecer uno de los más difíciles de cumplir, por lo tanto, la mayoría de las misiones de exploración espacial se centran en la filosofía de “seguir al agua” (*Follow the water*), implementada por la Agencia Espacial Norteamericana (NASA por *National Aeronautics and Space Administration*) la cual define que la presencia de agua en estado líquido es un parámetro importante en la búsqueda de lugares habitables fuera de la Tierra. En el sistema solar, la región del espacio accesible a las actuales tecnologías de exploración, se han identificado algunos objetos planetarios de interés astrobiológico, que se caracterizan precisamente por poseer agua en estado líquido o tener evidencias de que en algún momento de su historia tuvieron agua líquida sobre su superficie o debajo de ella. Tal es el caso del planeta Marte o de los satélites helados Europa, Ganimedes, o Encélado.

2.2. El satélite Europa

Los satélites Ío, Ganimedes, Calixto y Europa se conocen como satélites galileanos en honor al astrónomo Galileo Galilei, quien los descubrió en 1610 girando alrededor del planeta Júpiter. Entre ellos, Europa ocupa el segundo lugar en distancia respecto a Júpiter y es el más pequeño de ellos. Con un diámetro de apenas 3,122 km es un poco más pequeño que la Luna, el satélite natural de la Tierra, cuyo diámetro es de 3,470 km (Barnett, 2021).

El modelo de la composición interna de Europa (Fig. 2.1) aceptado actualmente, indica que el satélite posee un núcleo de hierro (Fe^+) sólido; un manto rocoso, conformado por silicatos; una superficie de agua congelada de entre 10 y 20 km de espesor y debajo de esta, un océano global de agua en estado líquido (Anderson *et al.*, 1998; Chyba y Phillips, 2002) enriquecido con sales. Debido a su distancia respecto al Sol que es de 5.2 unidades astronómicas (1 unidad astronómica -UA- equivale a 1.50×10^8 km) la temperatura en los polos del satélite es de 50 K (-223.15 °C) y de 120 K (-153.15 °C) en el ecuador, por lo que es un lugar muy frío. Debajo de la superficie se encuentra una capa de agua líquida, la cual se propone que se mantiene en este estado debido al calentamiento por las fuerzas de marea, la posible actividad volcánica o hidrotermal y la presencia de iones solvatados (Kargel *et al.*, 2000).

Europa presenta una rotación sincrónica con Júpiter, por lo que siempre dirige una misma cara hacia el planeta. Tiene un periodo rotacional y orbital de 85 horas (3.6 días terrestres). Posee

una órbita elíptica con una excentricidad de 0.01 por lo que la distancia entre el satélite y Júpiter varía. Esta característica provoca que el satélite en algún momento de su órbita se encuentre más cercano al planeta y sufra una deformación por efecto de la gran fuerza gravitacional que posee Júpiter, esto a su vez provoca que las mareas se eleven; cuando Europa se aleja, la marea disminuye. A este proceso se le conoce como efecto de marea y provoca la disipación interna de energía, ayudando a mantener el agua en estado líquido debajo de la superficie, es decir, produce calor por fricción y estresa la corteza helada en la parte superior del océano líquido (Showman y Malhotra, 1999; Greenberg, 2002).

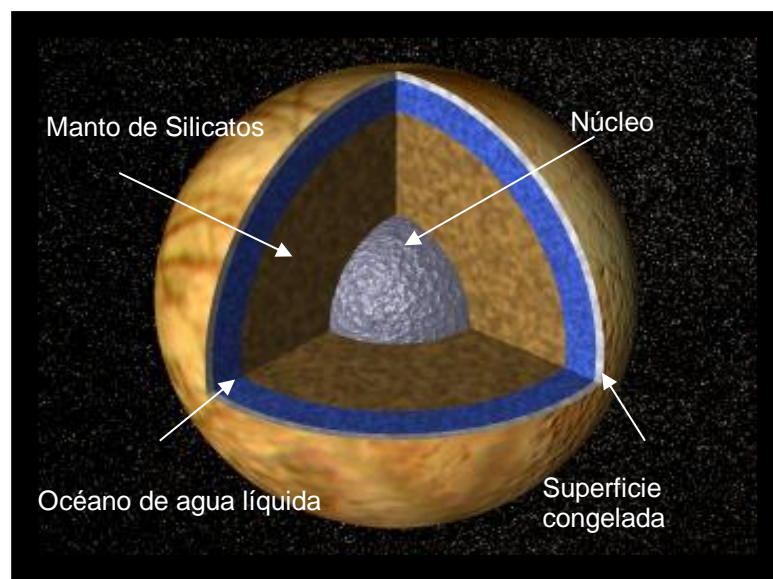


Figura 2.1. Esquema de la composición interna del satélite Europa. Imagen modificada de *NASA Photojournal*.

Otra de las evidencias que existen para explicar la presencia de un océano líquido debajo de la superficie de Europa, corresponde a la presencia de un campo magnético inducido, que fue detectado por el magnetómetro de la sonda Galileo. La existencia de este campo magnético inducido requiere de la presencia de una capa global conductora cerca de la superficie, lo que además hace necesaria la presencia de iones disueltos. Por cuál, lo más probable es que exista un océano de agua líquida salada con una cierta profundidad (Khurana *et al.*, 1998; Kivelson *et al.*, 2000; Chyba y Phillips, 2002).

Respecto a la composición química del océano de Europa, se han realizado diversos estudios para determinar el tipo de sustancias que puede tener disueltas. Las mediciones realizadas con el espectrómetro de mapeo infrarrojo cercano (NIMS por *Near-Infrared Mapping Spectrometer*) a bordo de la sonda Galileo, sugirieron que la superficie de Europa está constituida por hielo de agua con impurezas de azufre, ácido sulfúrico hidratado, carbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), sulfatos de magnesio y sodio como epsomita ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y mirabilita ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y mezclas de estas sales, ya que al hacer una comparación de los espectros obtenidos por el NIMS *versus* espectros obtenidos en laboratorios terrestres, estas sustancias proporcionan un buen ajuste como se muestra en la figura 2.2 (McCord *et al.*, 1998; McCord *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 1999).

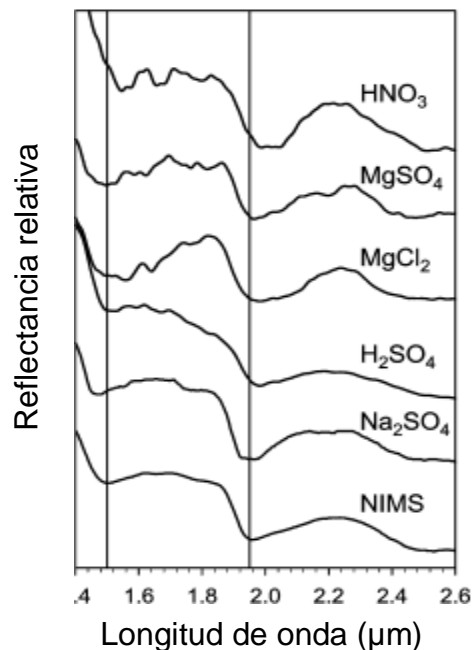


Figura 2.2. Espectro de emisión de la superficie de Europa obtenido por el espectrómetro de mapeo infrarrojo cercano (NIMS) de la sonda Galileo (Izquierda) y espectros de emisión en el infrarrojo de sales congeladas (derecha) (Orlando *et al.*, 2005).

Si las sales detectadas en la superficie de Europa provienen de las aguas que emergen del océano interno, es posible proponer la composición del mismo, surgiendo entonces dos propuestas. La primera propone que, si el océano interno es pobre en cloruros, las sales sulfatadas,

principalmente el sulfato de magnesio sería predominante (Kargel *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2016). Otra propuesta indica que con una cantidad inicial de cationes de sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}) y de aniones cloruro (Cl^-) y sulfato (SO_4^{2-}), las sales dominantes serían el sulfato de sodio (Na_2SO_4) y el cloruro de magnesio (MgCl_2) (Vu *et al.*, 2016). Sin embargo, hace pocos años se propuso que las sales sulfatadas detectadas pueden ser el resultado de procesos radiolíticos, es decir, que provienen de la descomposición de otros materiales que han sido expuestos a alguna forma de radiación como la ultravioleta (UV) que el satélite recibe del Sol. En consecuencia, las sales sulfatadas no serían las dominantes en el océano de Europa y por lo tanto la composición química de éste podría ser diferente a la aceptada hasta hoy (Brown y Hand, 2013).

Recientemente se reportó que la capa de hielo que recubre a Europa contiene cloruro de sodio (NaCl). Hand y Carlson, astrónomos de la NASA, realizaron en 2015 un experimento con dicha sal, sometiéndola a las mismas condiciones presentes en la superficie del satélite Europa, es decir, temperatura, presión y radiación. Utilizaron una cámara de ultra alto vacío ubicada en el Laboratorio de Propulsión a Chorro de la NASA, esta cámara está equipada con un criostato de helio de ciclo cerrado, una fuente de electrones, un analizador de gases y un espectrómetro de rejilla con fuente de halógeno de tungsteno; colocaron el NaCl en un objetivo de aluminio difuso al final de un dedo frío del criostato y se cargó en la cámara de vacío ultra alto, luego, enfriaron las muestras a 100 K (-173.15 °C) y la cámara se bombeó a ~10.8 torr y como resultado notaron que la sal adquiriría una tonalidad amarilla, similar a la que se aprecia en Europa (Figura 2.3) (Hand y Carlson, 2015). Años más tarde en un reporte realizado por Trumbo y colaboradores mencionan que si bien las regiones que experimentan radiólisis de azufre pueden contener sales de sulfato, el material endógeno más prístino de Europa puede reflejar una composición dominada por cloruro. Tomando en cuenta que los cloruros no tienen características espectrales identificables en las longitudes de onda de la región del infrarrojo, pero desarrollan distintas absorciones cuando son irradiadas con radiación de la región del visible, como la que experimenta la superficie de Europa, se realizaron observaciones con el telescopio espacial Hubble. Gracias a los espectros obtenidos por este telescopio se detectó una absorción en 450 nm que indica la presencia de cloruro de sodio irradiado en la superficie del satélite (Trumbo *et al.*, 2019).

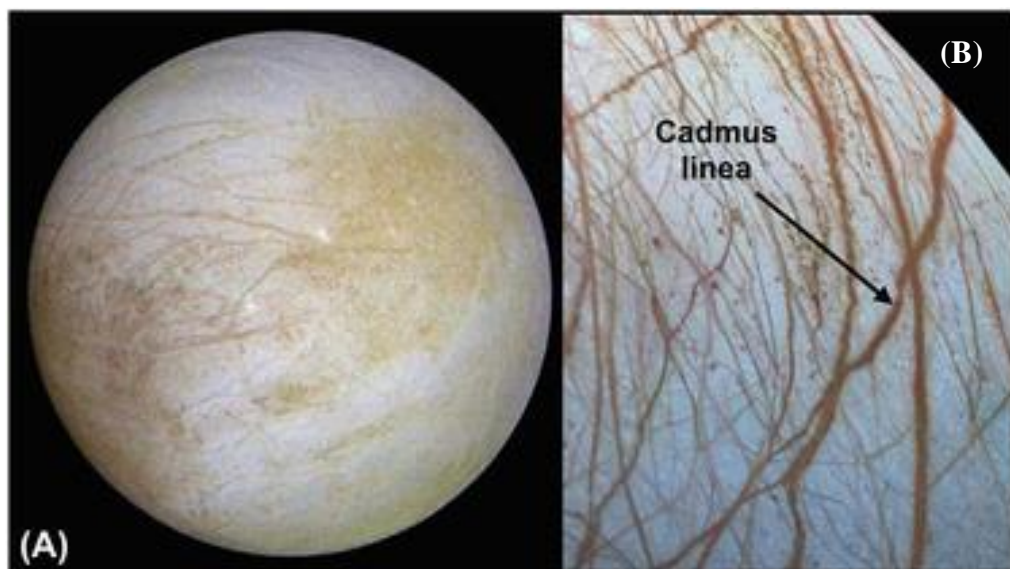


Figura 2.3. En la imagen (A) se muestra una decoloración distinta de la superficie de Europa a lo largo de las características geológicas como las fracturas que pueden traer material desde el océano subsuperficial hacia la superficie. En la imagen (B) se muestra el color marrón de *Cadmus linea* el cual disminuye en brillo al disminuir la longitud de onda a la que se observa, hecho que probablemente se deba al cloruro de sodio (NaCl) irradiado presente en la superficie de Europa. Imagen tomada de (Hand y Carlson, 2015).

La presencia de un océano de agua líquida que contiene sales sulfatadas y/o cloradas disueltas ha generado interés en los astrobiólogos hacia el satélite Europa. Existen entonces investigaciones orientadas a determinar si algunos de los organismos extremófilos terrestres pueden ser capaces de sobrevivir a las condiciones antes mencionadas del satélite Europa, mismas que lo sitúan como ambiente extremo extraterrestre.

2.3. Los organismos extremófilos

El descubrimiento de organismos habitando ambientes extremos ha promovido un gran interés entre la comunidad científica por comprender estos lugares que se creían inhabitados por ser demasiado hostiles para permitir el crecimiento exitoso de la gran mayoría de los organismos. El estudio de los microorganismos que han sido encontrados en ambientes extremos también

ha motivado la generación de investigaciones para averiguar la manera en que los organismos ahí presentes se han adaptado para sobrevivir. Contrariamente a la mayoría de los organismos terrestres, los extremófilos pueden sobrevivir e incluso requieren de ciertas condiciones físicas o geoquímicas extremas para tener un óptimo desarrollo. Se encuentran ejemplos de organismos extremófilos en cada uno de los tres dominios filogenéticos: Archaea, Bacteria y Eukarya (Javaux, 2006).

Se han identificado organismos extremófilos en ambientes tan radicales como las fuentes termales, los glaciares, los mares polares, lagos cubiertos de hielo, en aguas y suelos con elevada salinidad, en sitios con pH ácidos o alcalinos, así como en lugares con otras condiciones como radiación, altas presiones barométricas, baja concentración de oxígeno o presencia de metales tóxicos (Javaux, 2006; Demirjian *et al.*, 2001). En la figura 2.4 se muestran algunos ejemplos de los sitios en los que se han identificado organismos extremófilos.

Es importante distinguir entre organismos que toleran las condiciones extremas y aquellos que requieren de estas condiciones para vivir. A los primeros se les conoce como organismos extremotolerantes, mientras que a los segundos como extremófilos estrictos. Por lo tanto, extremotolerantes son los organismos que pueden crecer al estar presente un parámetro extremo, pero su óptimo crecimiento ocurre en condiciones más moderadas. En cambio, un extremófilo estricto requiere forzosamente la presencia de esas condiciones no habituales para un desarrollo exitoso. A su vez, los organismos extremófilos se clasifican según el ecosistema en el que habitan, como se muestran en la Tabla 2.1. Se debe tener presente que, además, un organismo puede requerir de dos o más condiciones extremas para vivir, reconociéndose entonces como un organismo poliextremófilo (Rampelotto, 2013).

Ya se mencionó que la vida terrestre se basa en la química del carbono de la que se derivan compuestos orgánicos útiles para sus distintos procesos metabólicos. También que el agua líquida es esencial para que esta vida pueda existir, así como la presencia de alguna fuente de energía y de nutrientes, además de condiciones que permitan la ocurrencia de reacciones de oxidación-reducción. Un extremófilo vive en lugares en los que se cumplen estos parámetros, o bien debe desarrollar alguna estrategia adaptativa que le permita protegerse y mantener estas condiciones intracelularmente, protegiéndose de su entorno exterior (Rothschild y Mancinelli, 2001). Algunas de las estrategias identificadas en organismos extremófilos consisten en mantener las condiciones extremas fuera de la célula utilizando bombas de iones para

incrementar su contenido en el citoplasma; sintetizando o almacenando compuestos químicos, como solutos compatibles, que les ayuden a evitar la desecación, una alta presión osmótica, o protegerse contra las altas temperaturas; modificando la composición química de la membrana para hacerla más resistente; mejorando su capacidad de reparación de daños ocasionados a biomoléculas esenciales, como ácidos nucleicos y enzimas, entre otros; o bien pueden formar esporas y mantenerse en estado de latencia hasta que las condiciones externas sean favorables (Ramírez, 2009).

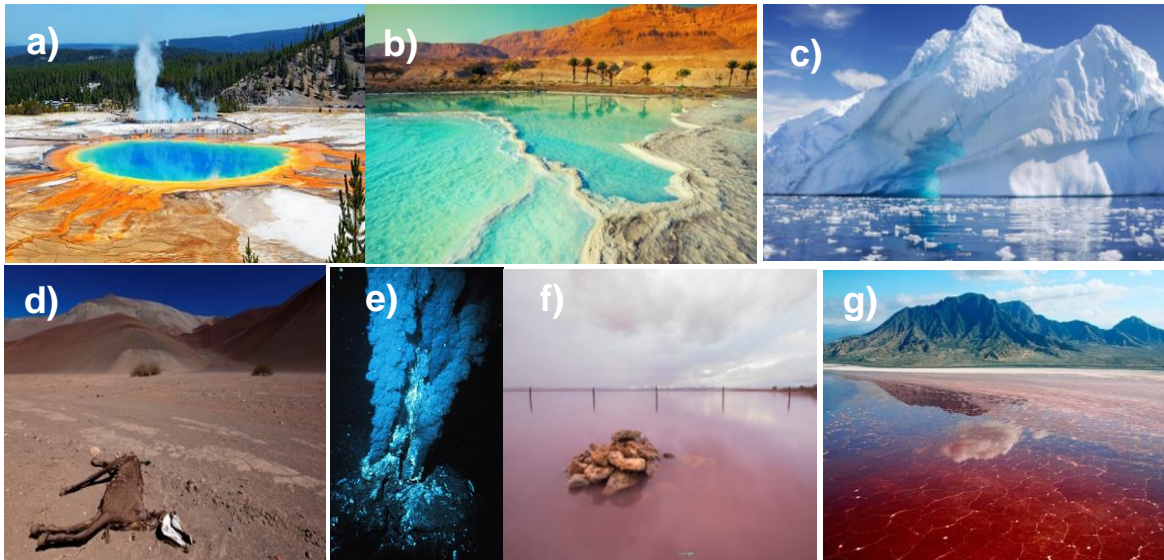


Figura 2.4. Ambientes extremos terrestres. a) Caldera en el parque Yellowstone (EUA), b) Mar Muerto (Israel), c) la Antártida (Polo Sur), d) El desierto de Atacama (Chile), e) Ventilas hidrotermales (océano Pacífico, Atlántico, Indico), f) Salinas de Alicante (España), g) Lago Natrón (Tanzania). Imágenes tomadas de Google Earth en marzo del 2019.

2.4. Los organismos halófilos

Algunos autores utilizan el término halófilo para denominar a todos los organismos que requieren una cierta concentración de cloruro de sodio (NaCl), la sal más común en los océanos terrestres, para su crecimiento. La salinidad promedio de estos cuerpos de agua es de alrededor de 35 g/l, (0.6 M). Sin embargo, para Oren es recomendable reservar este término para aquellos organismos que verdaderamente están adaptados a la vida en condiciones de hipersalinidad, es decir una condición de salinidad superior a la de los océanos terrestres (Oren, 2008).

Tabla 2.1. Clasificación de organismos extremófilos según el ambiente en el que habitan. Basada en la tabla de Hough y Danson, 1999.

Condición	Tipo	Definición	Ejemplo
Temperatura	Hipertermófilo	Crecimiento >80° C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
	Termófilo	Crecimiento 60 - 80° C	<i>Synechococcus lividus</i>
	Psicrófilo	Crecimiento <15° C	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
Radiación	Radiófilo	Hasta 10 Gy	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Salinidad	Halófilo moderado	0.5– 2.5 M NaCl	<i>Cobetia Marina</i>
	Halófilo extremo	2.5 - 5.2 M NaCl	<i>Salinibacter ruber</i>
pH	Alcalófilo	pH > 9	<i>Cyanidium caldarium</i>
	Acidófilo	pH < 4	<i>Methanococcus jannaschii</i>
Oxígeno	Anaerobio	No tolera O ₂	<i>Clostridium botulinum</i>
	Microaerófilo	Requieren niveles de O ₂ muy bajos	<i>Helicobacter pylori</i>
	Aerófilo	Requiere O ₂	<i>Cyanidium caldarium</i>
Presión	Piezófilos	Requiere > 1013.25 mb	<i>Moritella profunda</i>
Agua	Xerófilos	Falta de agua/ desecación	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Metales	Metalófilos	Altas concentraciones de Metales pesados	<i>Cupriavidus metallidurans</i>

Entonces los organismos halófilos tienen como principal característica su capacidad de adaptarse a los ambientes hipersalinos, es decir, entornos con concentraciones de al menos 10% de NaCl, como lagos salados y áreas costeras de todo el mundo. Ejemplos específicos de estos ambientes son el Mar Muerto en Israel, el gran Lago Salado de Utah en Estados Unidos, distintas salinas solares, minas de sal, entre otros. Los organismos halófilos también tienen especies que pertenecen a los tres dominios filogenéticos, como se muestra en la figura 2.5, aunque los grupos que incluyen un mayor número de organismos halófilos son las Arqueas y las Bacterias (Harding *et al.*, 2017).

Debido al amplio intervalo de concentraciones salinas en las que crecen los organismos halófilos, se han sugerido diferentes esquemas para su clasificación, aunque todos se basan en la concentración de NaCl que necesitan para su óptimo crecimiento o que son capaces de tolerar. Un ejemplo de clasificación se muestra en la Tabla 2.2.

evaporación. Esta composición iónica inicial, cambiará significativamente conforme la evaporación avanza, hasta que alcanza el límite de solubilidad del sulfato de calcio (CaSO_4) y precipita el yeso (Oren, 2006). Las salmueras de estanques de cristalización salina se agotan en el catión calcio (Ca^{2+}) y en menor medida en el ion sulfato (SO_4^{2-}). Durante la posterior precipitación de NaCl , la composición iónica cambia nuevamente y las concentraciones de los iones potasio (K^+) y magnesio (Mg^{2+}) aumentan. Las salmueras talasohalinas se caracterizan por valores de pH neutros o ligeramente alcalinos (Brock, 1979).

En el segundo tipo de ambiente hipersalino la composición iónica del cuerpo de agua difiere de la del agua de mar y se denomina atalashalina (Edbeib *et al.*, 2016). En estos ambientes varía la naturaleza química de sus cationes. Por ejemplo, en el Mar Muerto predominan los cationes divalentes como el magnesio (Mg^{2+}) y el calcio (Ca^{2+}), con concentraciones de 1.89 M y 0.45 M respectivamente. También se encuentran los iones monovalentes sodio (Na^+) con una concentración de 1.56 M y potasio (K^+) con una concentración de 0.20 M. Como resultado de la alta concentración de iones Ca^{2+} la solubilidad del sulfato es baja. Los aniones monovalentes cloruro (Cl^-) y bromuro (Br^-) conforman más del 99.9% de la suma de aniones. El pH de los ambientes atalashalinos es relativamente bajo encontrándose alrededor de 5.8 a 6.0. Por otro lado, los denominados lagos Soda son entornos alcalinos que contienen principalmente cationes monovalentes como Na^+ y K^+ , debido a que presentan un valor de pH de 10-11 o superior. Los iones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) contribuyen a la suma de aniones en dichos lagos, además del cloruro (Cl^-) y del sulfato (SO_4^{2-}) (Oren, 2006; Brock, 1979).

2.4.2. Mecanismos de adaptación de organismos halófilos

Debido a las altas concentraciones extracelulares de iones que encuentran en su entorno, los organismos halófilos deben enfrentar diversos desafíos como el incremento en la presión osmótica, el estrés iónico generado por la alta toxicidad de los iones de Na^+ y Cl^- , el estrés por deshidratación o desecación y la reducida solubilidad de algunos de los metabolitos que necesitan, incluidos nutrientes y oxígeno (Harding *et al.*, 2017). La manera en que estos organismos han conseguido adaptarse a estas condiciones adversas es desarrollando algunas estrategias como las que se ilustran en la figura 2.6.

Una de las estrategias es conocida como “*salt-in*” (c en la figura 2.6), o de alto contenido de sal en el citoplasma, e implica la acumulación de iones inorgánicos, principalmente el catión potasio

(K⁺) y el anión cloruro (Cl⁻). Esta estrategia es utilizada principalmente por Arqueas y bacterias halófilas extremas, como la bacteria *Salinibacter ruber*, consiste en la liberación de cationes sodio (Na⁺) hacia el exterior de la célula y la simultánea incorporación de (K⁺) al citoplasma, estas cargas positivas acumuladas se compensan con iones negativos como (Cl⁻). Como consecuencia se acumula (KCl) en el citoplasma, hasta que la concentración interna sea similar a la concentración salina extracelular (Roessler y Müller, 2001). Esta estrategia requiere de una adaptación extensa de la maquinaria enzimática intracelular ante la presencia de sal, ya que las proteínas deben mantener su conformación y actividad adecuadas en concentraciones salinas cercanas a la saturación (Lanyi, 1974). Para ello los halófilos extremos han desarrollado adaptaciones moleculares, dentro de las cuales se reconoce un exceso de aminoácidos con carácter ácido y pocos aminoácidos hidrófobos y básicos en sus proteínas, por lo que el proteoma de estos organismos es altamente ácido. Además, la mayoría de las proteínas de los organismos que utilizan esta estrategia, se desnaturalizan cuando se exponen a bajas concentraciones salinas, característica que los hace dependientes de la sal (Oren, 2008).

Otra estrategia se conoce como “*salt-out*” (b en la figura 2.6) o de acumulación de solutos compatibles. Es utilizada por la mayoría de los halófilos moderados y organismos halotolerantes. Se trata de la biosíntesis o la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular en el citoplasma, como respuesta al estrés osmótico extracelular. Los solutos compatibles mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, de ahí su nombre. Además, debido a la necesidad de que sean compatibles con la maquinaria celular, no se necesitan adaptaciones en el proteoma de la célula. Sin embargo, esta estrategia de adaptación es energéticamente más costosa que la estrategia de *salt-in*. (Oren, 2008).

Así mismo, la acumulación de solutos compatibles además de apoyar el mantenimiento del equilibrio osmótico juega otros papeles importantes en la adaptación de la célula relacionados con la estructura y la estabilidad de las proteínas de organismos extremófilos. Por ejemplo, aumentan la solubilidad de algunas proteínas, estabilizan y protegen la función enzimática y brindan protección contra la salinidad, altas temperaturas, congelación e incluso contra la desecación (Roberts, 2005; Welsh, 2000). En el caso de las bacterias halófilas, el espectro de solutos compatibles utilizados comprende un número limitado de compuestos orgánicos que corresponden a alguno de los siguientes grupos: 1) azúcares, 2) polioles, o 3) α - y β -aminoácidos y sus derivados (Roessler y Müller, 2001).

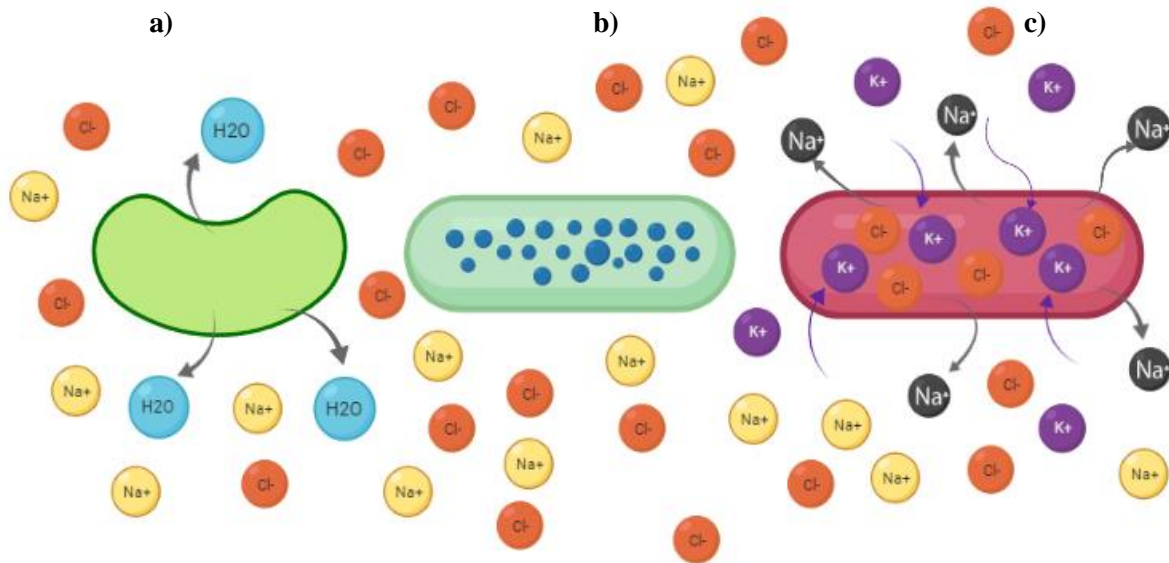


Figura 2.6. a) Pérdida de agua por estrés salino y plasmólisis en organismos no halófilos. b) Acumulación de solutos compatibles para mantener la turgencia. c) Acumulación de iones inorgánicos K^+ y Cl^- para regular la presión osmótica. Las estrategias b y c se han encontrado en organismos halófilos.

2.5. La bacteria *Salinibacter ruber*

Salinibacter ruber es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo, recto o ligeramente curvado, que mide de 2 a $6 \times 0.4 \mu m$ (Antón *et al.*, 2002), presenta movilidad gracias a que posee flagelos, está filogenéticamente asociada al filo Bacteroidetes y a la familia Rhodothermaceae (Oren, 2013). Fue aislada de las salinas de Alicante en España por Antón y colaboradores en 2002, quienes la describieron como una bacteria quimioorganótrofa y aerobia estricta, se encuentra clasificada como halófila extrema ya que requiere para su crecimiento al menos 150 g de NaCl por litro (Miranda, 2015) y crece óptimamente con 200 g/L hasta 300 g/L de NaCl, su pH óptimo es de 6.5 a 8.0 , su temperatura óptima oscila entre 37° a $47^\circ C$ y no crece en temperaturas superiores a $52^\circ C$ (Antón *et al.*, 2002). (Ver figura 2.7 que muestra a la cepa M31 de *S. ruber*).

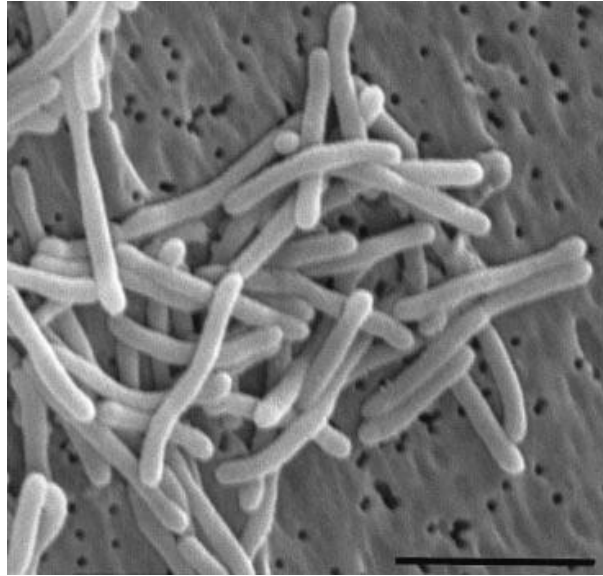


Figura 2.7. Micrografía electrónica de barrido de la cepa M31 (DSM 13855) de *Salinibacter ruber*. Imagen tomada de Antón *et al.*, 2002.

El género *Salinibacter* incluye a otras dos especies distintas de *S. ruber*, que fueron aisladas del lago Aran-Bidgol con características de requerimiento y tolerancia a la sal semejantes a las de *S. ruber*. Estas especies son *Salinibacter iranicus* y *Salinibacter luteus* (Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012). Más recientemente se aisló otra nueva especie en ambientes hipersalinos del altiplano argentino identificada como *Salinibacter altiplanensis* (Viver *et al.*, 2018). La figura 2.8 muestra el árbol filogenético de la familia Salinibacteraceae.

Salinibacter ruber tiene una distribución global, incluyendo a México, donde se identificó en lagos salinos en Guerrero Negro, Baja California. Una bacteria con 96 % de semejanza al género *Salinibacter* fue aislada en biopelículas que han colonizado monumentos mayas, en Uxmal (Antón *et al.*, 2008). Los representantes de *S. ruber* han sido detectados en el ambiente utilizando diferentes técnicas, el grupo de investigación de Antón y colaboradores (2008) utilizaron los métodos de hibridación fluorescente *in situ* (FISH por *fluorescent in situ hybridation*), bibliotecas de clones del gen 16S ARNr, análisis con electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE por *denaturing gradient gel electrophoresis*), y cultivos aislados de todo el mundo como se muestra en la figura 2.9.

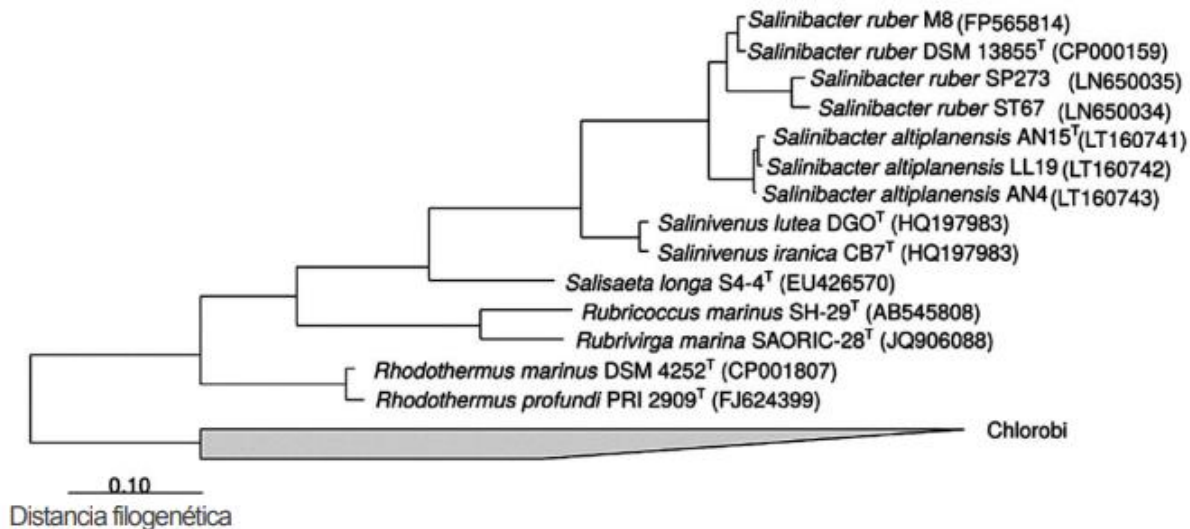


Figura 2.8. Filogenia de la familia Salinibacteraceae propuesta por Viver *et al.*, 2018.

Algunas de las características de *Salinibacter ruber* relacionadas con su halofilia son:

- 1) Acumulación iones potasio (K^+) en su citoplasma como estrategia de haloadaptación; esta característica le ayuda a mantener un balance osmótico frente a una alta concentración exterior de NaCl (Oren, 2013). Esto lo logra gracias a que presenta un grupo de 19 genes que incluyen sistemas de captación/efusión de K^+ y transportadores de aminoácidos catiónicos de importancia crucial para un estilo de vida hiperhalofílico (Mongodin *et al.*, 2005). El ion Cl^- lo importa a través de la bomba de cloruro-rodopsina, una proteína para la cual hay cuatro copias en el genoma de *S. ruber*, de las cuáles la tercera copia traduciría para la bomba de Cl^- (Edbeib *et al.*, 2016; Mongodin *et al.*, 2005).

Aun cuando la principal estrategia de haloadaptación de *S. ruber* es el mecanismo de *salt-in*, se ha reportado que dispone de bajas concentraciones de glutamato, glicina, betaína y de N-acetil lisina, que podrían también contribuir con sus estrategias de haloadaptación (Oren *et al.*, 2002).

En el grupo de trabajo del Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se encontró que *S. ruber* puede acumular hasta 9.5 μg de betaína/mg de biomasa cuando se hace crecer

en medios modificados con NaCl y 11.54 μg de betaína/mg de biomasa cuando se hace crecer en medios modificados con MgSO_4 (Miranda, 2015).

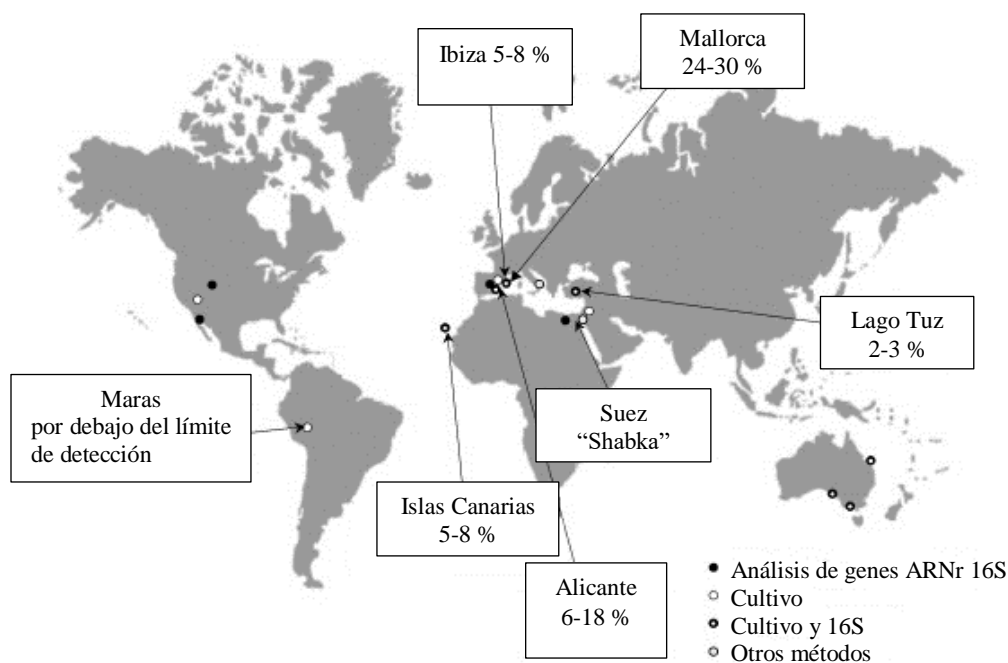


Figura 2.9. Distribución de aislados de *Salinibacter ruber* en el mundo. Se indican los métodos de detección utilizados. Para los lugares donde se dispone de datos FISH, se proporciona la abundancia de *S. ruber*. Imagen obtenida de Antón *et al.*, 2008.

2) Debido a su alta concentración de K^+ intracelular, sus proteínas son ricas en aminoácidos ácidos (principalmente aspartato) y relativamente pobres en aminoácidos básicos (particularmente lisina) y aminoácidos hidrófobos. Esta característica a su vez provoca que entre las proteínas haya una alta preferencia a la formación de regiones superenrolladas y una menor tendencia a formar α -hélices en su estructura secundaria (Rubiano, 2014). Las proteínas con un alto porcentaje de α -hélices presentan mayor rigidez debido a un incremento general de empaquetamiento, por lo que la disminución en las regiones que tienden a formar α -hélices probablemente hace a las proteínas más flexibles, y debido a que la flexibilidad está correlacionada con la función de las proteínas, se cree que podría tratarse de una estrategia

de las proteínas halófilas para adaptarse en ambientes con altas concentraciones salinas (Fleming y Richards, 2000).

También se ha encontrado un alto contenido de serina (Oren *et al.*, 2002), lo que provoca que *S. ruber* tenga un proteoma ácido con un punto isoelectrico promedio de 5.2 (Mongodin *et al.*, 2005).

- 3) Presenta un color rojizo característico de los organismos que habitan en entornos cercanos a la saturación de sales (Oren y Rodríguez-Valera, 2001). Además posee xantorodopsina, un complejo de proteínas carotenoides/retinianas, que actúa como una bomba de protones impulsada por la luz, así como al carotenoide C-40 denominado salinixantina que funciona como una antena captadora de luz, capturando energía luminosa y usándola para transportar protones a través de la membrana; la fotoactivación del retinal permite capturar energía lumínica para mover protones al exterior de la célula (o iones cloruro al interior), en contra del potencial de membrana. La célula acumula energía y esta permite la síntesis de ATP (Balashov y Lanyi, 2009; Balashov *et al.*, 2005). El gen que codifica para la xantorodopsina está vinculado a dos marcos abiertos de lectura (ORF por *open reading frame*), el licopeno β -ciclasa (*crtY*) que se requiere para la formación de β -caroteno, un precursor del retinal y la posterior producción de carotenoides; así como el β -caroteno cetolasa (*crtO*) quien es probablemente el responsable de la biosíntesis de salinixantina (Mongodin *et al.*, 2005).

Todas estas características son similares a algunas características de *Haloarqueas*, lo que indica que *Salinibacter ruber* podría haber experimentado una transferencia horizontal de genes con organismos del dominio Archaea. Hecho que se comprobó al realizar el análisis genómico de *S. ruber* M31, aunque la cantidad de genes probablemente involucrados en los eventos de transferencia horizontal fue mucho menor de lo que se esperaba (Mongodin *et al.*, 2005).

Al analizar el genoma de la cepa modelo M31 (DSM 13855) se puede observar que a nivel ADN también presenta características propias de organismos halófilos (Paul *et al.*, 2008), este comprende un cromosoma de 3,551,823 pares de bases (pb) con alto contenido de G + C (contenido de guanina y citosina) (66.29 %) y un plásmido con 35,505 pb (57.9 % de G + C), que contienen 2,934 y 33 marcos abiertos de lectura (ORF) respectivamente (Mongodin *et al.*, 2005).

Según Rhodes y colaboradores se ha demostrado que el genoma de los organismos halófilos generalmente presenta tendencia a una alta abundancia de los dinucleótidos G y C, GA/TC (Guanina-Adenina/ Timina-Citosina) y AC/GT (Adenina-Citosina/ Guanina-Timina); y preferencia por codones específicos para los aminoácidos Arginina, Treonina, y Valina, lo que posiblemente les ayude a mantener la estabilidad de las estructuras secundarias y terciarias durante el plegamiento de proteínas (Rhodes *et al.*, 2011; Rubiano, 2014).

Este hallazgo indica que los organismos halófilos tienen una característica genómica a nivel de dinucleótidos, relacionada con la composición de sus aminoácidos, que les permite a nivel proteico adaptarse a los ambientes hipersalinos (Rubiano, 2014). Por lo que se cree que el alto contenido de G + C de *S. ruber* le es útil para mantener estables sus proteínas ante las altas concentraciones de sales en su ambiente, además de que posiblemente le es útil para prevenir la formación de dímeros de timidina generados por la intensa radiación UV, a menudo asociado con ambientes hipersalinos (Rhodes *et al.*, 2011).

En 2015, el grupo de investigación del Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos encontró que al exponer a *S. ruber* a diferentes condiciones de salinidad, había una expresión diferencial de las proteínas GroEL, EF-Tu, L21 y ARNt aspartato ligasa como posible estrategia de adaptación ante el estrés salino provocado por NaCl y MgSO₄, destacando el aumento en la cantidad del complejo proteico GroEL-ES (Miranda, 2015). En 2019, Echavarría evaluó el crecimiento de *S. ruber* en diferentes condiciones con NaCl, MgSO₄ y Na₂SO₄ a diferentes concentraciones, recreando los posibles escenarios propuestos para el océano de agua líquida en el Satélite Europa, y determinó que las condiciones óptimas de crecimiento de *S. ruber* para cada sal eran 3.3 M de NaCl, 1.5 M de MgSO₄, 0.5 M de Na₂SO₄ y combinaciones de las sales sulfatadas en proporciones de MgSO₄/Na₂SO₄ 1:1 y 2:1; por lo que basándose en la información sobre la composición salina del océano de agua líquida del satélite Europa, concluyó que *S. ruber* tendría la capacidad de desarrollarse en el océano de dicho satélite. También observó que esta bacteria tiende a internalizar betaína, un soluto compatible, al ser expuesta a los medios modificados con Na₂SO₄, así como a los medios de las sales sulfatadas combinadas en proporciones 1:1 y 2:1 (Echavarría, 2019).

2.6. Proteómica

El término proteómica se refiere al estudio a gran escala de las proteínas expresadas por un sistema biológico. En conjunto con la genómica, ayuda a tener un entendimiento más completo de las funciones biológicas de un organismo.

La genómica consiste en la determinación de la secuencia completa del ácido desoxirribonucleico (ADN) del organismo en estudio y la ubicación de los genes secuenciados en los diferentes cromosomas (Cazzulo, 2014). El ADN contiene la información genética que se hereda y se transmite de generación en generación a través de la replicación. Para que esta información pueda ser expresada debe transcribirse al ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para ser traducida en cadenas de aminoácidos, los cuales conforman a las proteínas, las biomoléculas encargadas de llevar a cabo, directa o indirectamente, todas las funciones celulares. Es decir, la expresión de los genes determina la forma y la estructura de una célula u organismo a través de la acción de las proteínas (Torrades, 2004). Mientras que el genoma de un organismo es de carácter constante a lo largo de la vida, el proteoma es dinámico, lo que significa que la expresión proteica cambia en diferentes etapas del ciclo celular, así como en respuesta a acciones externas (Cazzulo, 2014).

La síntesis de proteínas también implica un conjunto de modificaciones postraduccionales que preparan a las proteínas para su función, les ayudan en su plegamiento y las dirigen hacia su destino específico (Torrades, 2004) lo cual además incrementa el número de proteínas que pueden ser codificadas por un solo gen. Todo esto hace que, para conocer realmente la función de los genes, se deberían conocer todas las características químicas, bioquímicas y biológicas de las proteínas que codifican (Cazzulo, 2014).

El término proteoma fue acuñado por Marc Wilkins a mediados de los años 90 uniendo los términos **proteína** y **genoma**; Es utilizado para indicar el conjunto de proteínas que una célula puede expresar en un momento dado según su genoma (Wilkins *et al.*, 1996). La proteómica es, por lo tanto, el estudio del proteoma de un sistema biológico que incluye su localización, estructura, modificaciones, interacciones, actividades y función. Comprende además las técnicas que permiten realizar la separación, cuantificación e identificación de las proteínas para su estudio a gran escala. Los objetivos de la proteómica son básicamente el estudio de los cambios globales de la expresión de las proteínas celulares en el tiempo, así como la

determinación de la identidad y de las funciones de todas las proteínas producidas por un organismo determinado (Torrades, 2004).

La proteómica puede ser descriptiva o estructural si tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, tipo celular u organelo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica. La proteómica comparativa se encarga de la identificación de los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a cambios en las condiciones a las que se somete el organismo. La proteómica funcional se encarga del estudio de la función de las proteínas dentro de sistemas biológicos y la regulación de su expresión, incluyendo interacciones y modificaciones postraduccionales (Pando y Ferreira, 2007).

Las tecnologías aplicadas en la proteómica van encaminadas a separar, identificar y caracterizar un gran conjunto de proteínas. Usualmente dichos experimentos constan de cuatro etapas básicas como se ilustra en la figura 2.10.

A continuación, una descripción más detallada de las metodologías ilustradas en la figura 2.10:

1. La **preparación de la muestra** que comienza con un cultivo completo o con un lisado de células, al lisar las células se homogeniza el contenido celular para realizar la extracción de las proteínas presentes. La muestra debe ser manejada con máximo cuidado para evitar cualquier contaminación (Görg *et al.*, 2004). En algunos métodos la muestra debe ser procesada y para esto se deben desnaturalizar las proteínas, permitiendo que se expongan los sitios específicos de corte enzimático y al mismo tiempo evitar la formación de dímeros. Estas modificaciones químicas son esenciales ya que para el análisis de identificación realizado por espectrometría de masas (EM) se requiere que las proteínas sean digeridas a péptidos con masas moleculares menores a 3 mil Daltons (kDa).
2. El **fraccionamiento de la muestra**. Para la separación de las proteínas, los métodos más utilizados son la electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE) o bidimensional (2D-PAGE). Aunque no son las únicas técnicas utilizadas, pues también está la electroforesis capilar, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión molecular o la cromatografía de intercambio iónico (Pando y Ferreira, 2007).

En esta etapa los analitos de la muestra a analizar se disuelven en una fase móvil, que dependiendo del tipo de cromatografía utilizada puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico; que a su vez se mueve a través de una fase estacionaria que se encuentra fija en

la columna cromatográfica. De esta manera los componentes de la mezcla menos afines a la fase estacionaria se mueven rápidamente a través de la columna, mientras que los más afines, son fuertemente retenidos y se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Separando de esta manera a los componentes de la mezcla a analizar (Skoog *et al.*, 2008).

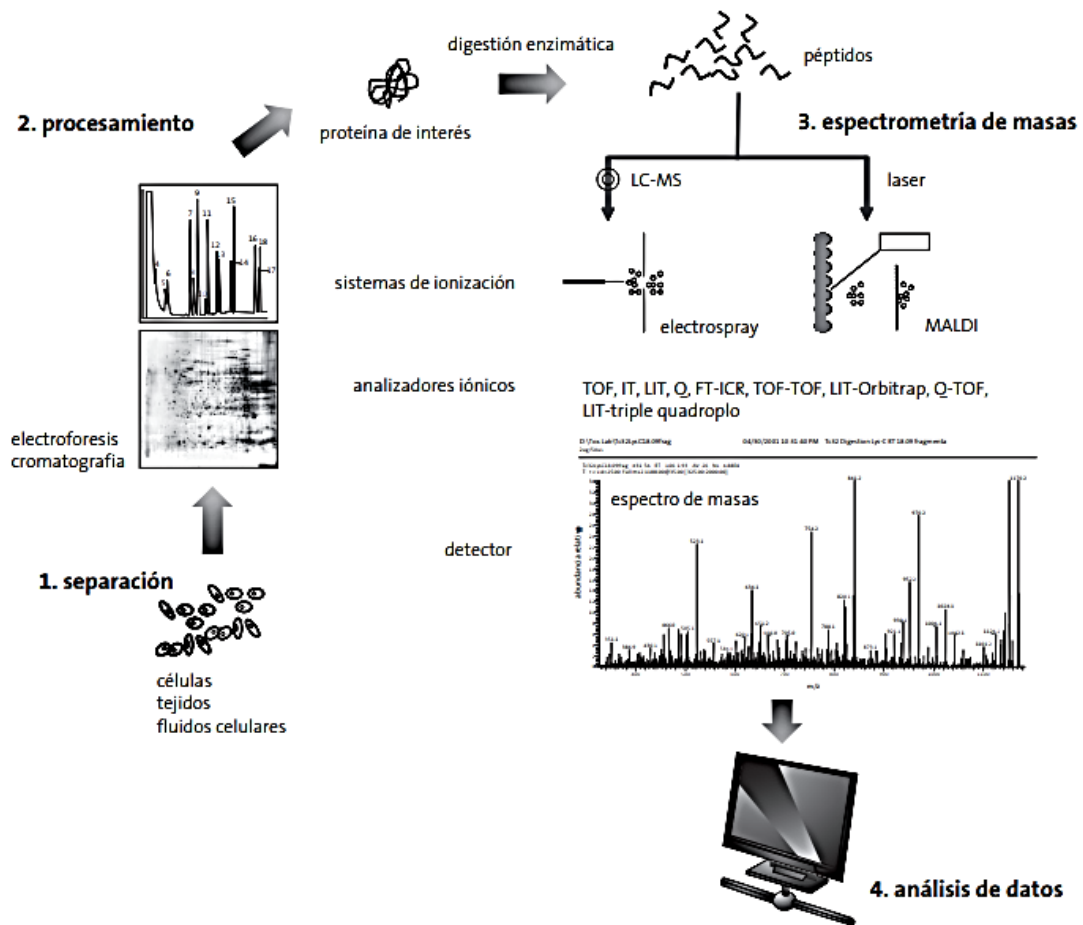


Figura 2.10. Representación gráfica de la metodología simplificada del análisis proteómico basado en cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Imagen tomada de Pando y Ferreira, 2007.

3. El **análisis e identificación** de proteínas por espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para medir la relación masa/carga (m/z) de moléculas o fragmentos de éstas. Esta técnica involucra la ionización de la molécula de interés en fase

gaseosa, la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo con su relación m/z y la detección de la abundancia de estas. El desarrollo de sistemas de ionización suaves como ionización por *electrospray* (ESI por *Electrospray Ionization*) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI por *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) permiten el análisis de macromoléculas, como las proteínas, que no sería posible realizar mediante las técnicas de ionización tradicionales. Debido a esto la espectrometría de masas es una de las técnicas de identificación fundamentales para la investigación proteómica (Pando y Ferreira, 2007).

4. El **análisis informático de los datos**. Esta etapa involucra el conocimiento de los procesos químicos y bioquímicos aplicados a las muestras de las proteínas, junto con el conocimiento bioinformático relativo a la búsqueda e identificación de proteínas en los bancos de datos públicos y privados (Pando y Ferreira, 2007). La identificación de proteínas a través de mapas peptídicos es la metodología más utilizada en los análisis proteómicos. La secuencia de una proteína es única y al ser segmentada origina un patrón peptídico específico, por lo tanto, los valores exactos del conjunto de las masas moleculares de los péptidos es la representación única de una determinada proteína. La lista de estas masas moleculares específicas está directamente relacionada con la estructura primaria de la proteína por lo que el espectro de masas se convierte en una huella digital de la proteína analizada (Pando y Ferreira, 2007). Esta lista de masas moleculares obtenida experimentalmente se compara, con ayuda de programas de análisis proteómicos, con las diferentes proteínas de las bases de datos para asignarle una identidad.

2.6.1. La espectrometría de masas

La identificación de péptidos y proteínas actualmente es llevada a cabo mediante una serie de procedimientos que, si bien pueden utilizar una instrumentación variada, se asienta en dos estrategias básicas: el mapeo de masas peptídicas mediante la espectrometría de masas (EM) y la secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (EM/EM) (Abián *et al.*, 2008).

Los espectrómetros de masas son equipos que consisten en unidades funcionales para originar un haz de iones a partir de una muestra neutra en estado sólido, líquido o gaseoso; realizar la

detección diferenciada de la masa individual de cada uno de los iones generados y finalmente poder asignarles un valor específico de abundancia (Fernández, 2016).

Generalmente los espectrómetros de masas se encuentran acoplados a sistemas cromatográficos de alta resolución que utilizan una columna cromatográfica como sistema de entrada para separar a los diversos analitos contenidos en una muestra compleja e introducirlos gradualmente hacia la fuente de iones. La salida de la columna cromatográfica entrega, además, moléculas neutras de la muestra en fase gaseosa, que son ionizadas mediante alguna técnica de ionización suave para generar iones gaseosos con carga positiva o negativa. Se utiliza una técnica de ionización suave para garantizar que los péptidos y las proteínas de interés sean ionizadas sin ser degradadas. La ionización por *electrospray* (ESI) y la *desorción/ionización láser asistida por matriz* (MALDI) son las técnicas más utilizadas en estudios de proteómica, aunque existen otros métodos de ionización.

La diferencia entre estas dos técnicas es que en MALDI la muestra se incorpora en una matriz de moléculas, que se colocan en una placa metálica y se dejan evaporar, propiciando la formación de cristales; posteriormente la placa es colocada en el espectrómetro y es sometida a radiación con un láser, el cual causa la desorción y la ionización de la muestra, tanto por protonación como deprotonación, generando iones predominantemente monovalentes. Esta técnica de ionización generalmente va acoplada a analizadores tipo ToF (por sus siglas en inglés *Time of Flight* o Tiempo de Vuelo) (Morales Sánchez y Gallo Ramírez , 2006). Mientras tanto, en ESI la muestra líquida fluye desde un microcapilar hasta el orificio del espectrómetro de masas, donde una diferencia de potencial entre estos genera una nube de finas gotas cargadas eléctricamente. El disolvente se evapora y disminuye el tamaño de las gotas, dando como resultado iones desolvatados (Morales Sánchez y Gallo Ramírez , 2006).

Posteriormente un analizador de masas diferencia a los iones en base a su relación m/z . El analizador puede ser de tipo cuadrupolo, orbitrap, de tiempo de vuelo (ToF) o de trampa de iones. Finalmente, un detector de iones registra la corriente producida por el haz de iones que impacta sobre él, convirtiendo esta corriente en una señal eléctrica medible, que con ayuda de una computadora se puede almacenar para su posterior procesamiento (Fernández, 2016).

La técnica de identificación de proteínas mediante mapeo o huella peptídica se basa en la identificación de los fragmentos resultantes de una digestión enzimática. Una proteína aislada es convertida en péptidos de tamaño medio mediante la acción de enzimas específicas. La

determinación de la relación m/z de cada uno de los fragmentos producidos en la digestión permite hacer comparaciones con fragmentos m/z teóricos del conjunto de péptidos esperados para secuencias almacenadas en una base de datos y sugerir aquellas que mejor se ajustan a los datos experimentales (Abián *et al.*, 2008).

2.6.1.1. Espectrometría de masas en tándem (EM/EM)

Esta técnica no es más que el uso de una segunda etapa de análisis de masas en el mismo experimento. Un equipo de EM/EM tiene seis componentes básicos: 1) un sistema de introducción de la muestra, 2) fuente de ionización, 3) primer analizador de masas (EM_1), 4) cámara o celda de colisión, 5) segundo analizador de masas (EM_2) y por último 6) detector.

Actualmente existen diferentes acoplamientos entre los componentes de los equipos de EM/EM que se diseñan de acuerdo a las moléculas de interés (Fernández-Lainez *et al.*, 2009; Abián *et al.*, 2008). Uno de los equipos más utilizados para la cuantificación e identificación de proteínas es el triple cuadrupolo acoplado a una fuente de ionización por “*electrospray*” (ESI por *ElectroSpray Ionization*), que funciona de la siguiente manera: una vez introducida la muestra, esta sufre una ionización suave por ESI para adquirir una carga. Posteriormente pasa al primer analizador de masas EM_1 , en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su relación m/z generando iones precursores; posteriormente los iones pasan por la celda de colisión, en donde colisionan con un gas inerte (generalmente nitrógeno o argón) y como producto se generan fragmentos, que en seguida pasarán por el segundo analizador de masas EM_2 . Por último los resultados se registran como espectros de masas que funcionan como una huella digital de los compuestos analizados (Fernández-Lainez *et al.*, 2009).

Esta técnica permite estudiar selectivamente iones específicos de una mezcla compleja para obtener información estructural del ion de interés, ya que tiene la capacidad de fragmentar ordenadamente los péptidos en diferentes posiciones del enlace peptídico, por lo tanto, la diferencia de masa molecular entre los iones generados es la representación de cada aminoácido que compone la cadena peptídica, proporcionando así la secuencia del péptido (Marcotte, 2007). Esta diferencia de masa entre los iones se utiliza para identificar los aminoácidos de la siguiente manera: una vez que los iones son dirigidos a la cámara de colisión, interactúan con el haz de colisión (N_2 o Ar) y sufren una fragmentación primaria.

Cuando después de la fragmentación la carga se mantiene en el extremo N-terminal, se le designa como “ion *-b*”, en cambio, si la carga se mantiene en el extremo C-terminal se le denomina “ion *-y*”; la diferencia de masa entre un ion *b* y un ion *y* corresponde a un aminoácido. Además, tanto los iones *b* como los iones *y* pueden perder NH₃, H₂O o CO. Cuando ocurre una ruptura entre el carbono alfa y el grupo carbonilo (pérdida de CO) se producen las series ion *-a* y ion *-x*. La ruptura del enlace entre el carbono alfa y el nitrógeno del grupo amida produce las series ion *-c* y ion *-z* (Morales Sánchez y Gallo Ramírez , 2006; Marcotte, 2007). Estos distintos esquemas de formación de iones se muestran en la figura 2.11.

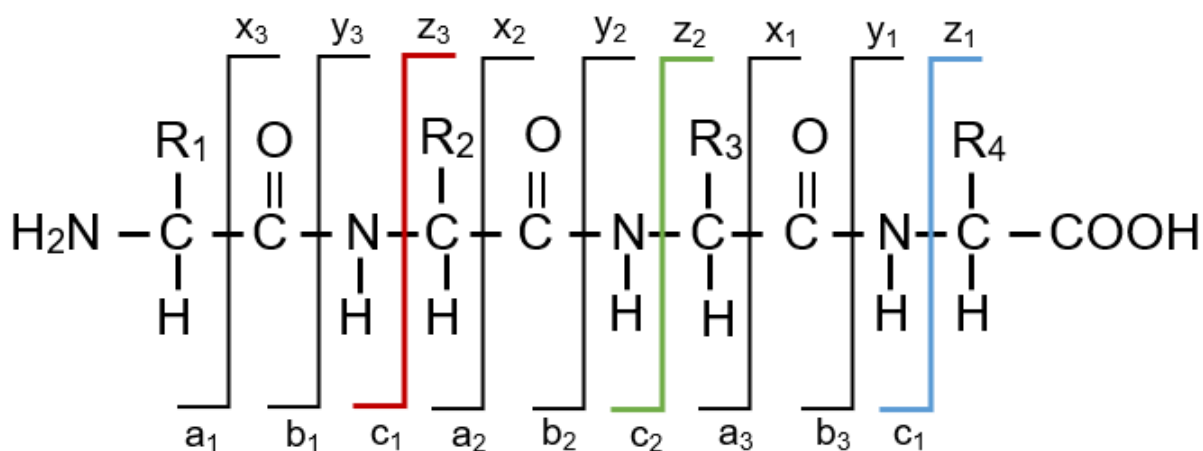


Figura 2.11. Representación de las posibles fragmentaciones que puede tener un péptido en un análisis de espectrometría de masas tándem (EM/EM). Las distintas series de iones-*b* y de iones-*y* se resaltan con divisiones de colores para mostrar la separación entre dos distintos aminoácidos.

2.6.2. Análisis masivo de proteínas

Debido a que los métodos clásicos utilizados en la proteómica tienen limitaciones para la separación de proteínas, John Yates III propuso en 1995, una alternativa conocida como MudPIT por *Multidimensional Protein Identification Technology* o *Shotgun proteomics* por su similitud con la técnica de secuenciación masiva genómica denominada *shotgun*. La técnica de *shotgun proteomics* o de análisis masivo de proteínas proporciona una evaluación de alto rendimiento de los cambios en la expresión de los proteomas. Esta técnica proporciona una medición indirecta de proteínas mediante péptidos derivados de la digestión de proteínas

intactas, generalmente esta mezcla de péptidos es fraccionada y se somete a análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem (CL-EM/EM).

En este tipo de análisis, a diferencia de los métodos convencionales como los geles bidimensionales, las proteínas no necesitan ser separadas antes de ser analizadas por espectrometría de masas, sino que a partir de la mezcla heterogénea de proteínas que se obtuvo después del lisado de las células (etapa necesaria para su extracción), se realiza su digestión utilizando una proteasa, que usualmente es la tripsina, para normalizar y compartimentar la heterogeneidad bioquímica de las proteínas dentro de la muestra como péptidos. Las proteínas digeridas se someten a ionización para cargar y transferir péptidos ionizados a la fase gaseosa, ya sea mediante la técnica de nanoelectrospray (nESI) o de MALDI. Los péptidos son separados, identificados y cuantificados mediante la técnica de CL-EM/EM unidimensional o multidimensional obteniendo así un espectro bastante amplio de especies peptídicas con relaciones m/z de hasta 100,000 unidades, en una sola corrida cromatográfica. Las proteínas se identifican a partir de los péptidos secuenciados. Para la identificación de los péptidos se comparan los espectros de masas tándem derivados de la fragmentación de péptidos, con los espectros de masas tándem generados a partir de la digestión *in silico* de una base de datos de proteínas (Zhang *et al.*, 2013). Las etapas descritas se representan gráficamente en la figura 2.12. La identidad entre el repertorio de péptidos experimental y la calculada *in silico* se valora en función del número de señales con relación m/z identificadas y de la diferencia entre la masa molecular teórica y experimental, calculada en base a diferentes algoritmos matemáticos (Abián *et al.*, 2008).

Para esta técnica el tipo de cromatografía líquida más utilizada para realizar el análisis masivo de proteínas es la de fase reversa debido a su eficiente poder de separación y a la compatibilidad de las fases móviles con técnicas de ionización como la ionización por *electrospray* (ESI) (Morales Sánchez y Gallo Ramírez, 2006).

El desarrollo de técnicas como la de *shotgun proteomics* ha permitido solventar muchos de los problemas derivados del análisis en geles bidimensionales, entre ellos la magnitud de los resultados que se obtienen que es mucho mayor que los obtenidos mediante 2D-PAGE. También es posible identificar proteínas que por sus características fisicoquímicas o su abundancia relativa eran raramente identificadas mediante otras técnicas (Abián *et al.*, 2014). Además, en

el análisis masivo de proteínas, existe un alto grado de automatización, se requiere mucho menos tiempo y resulta más económico.

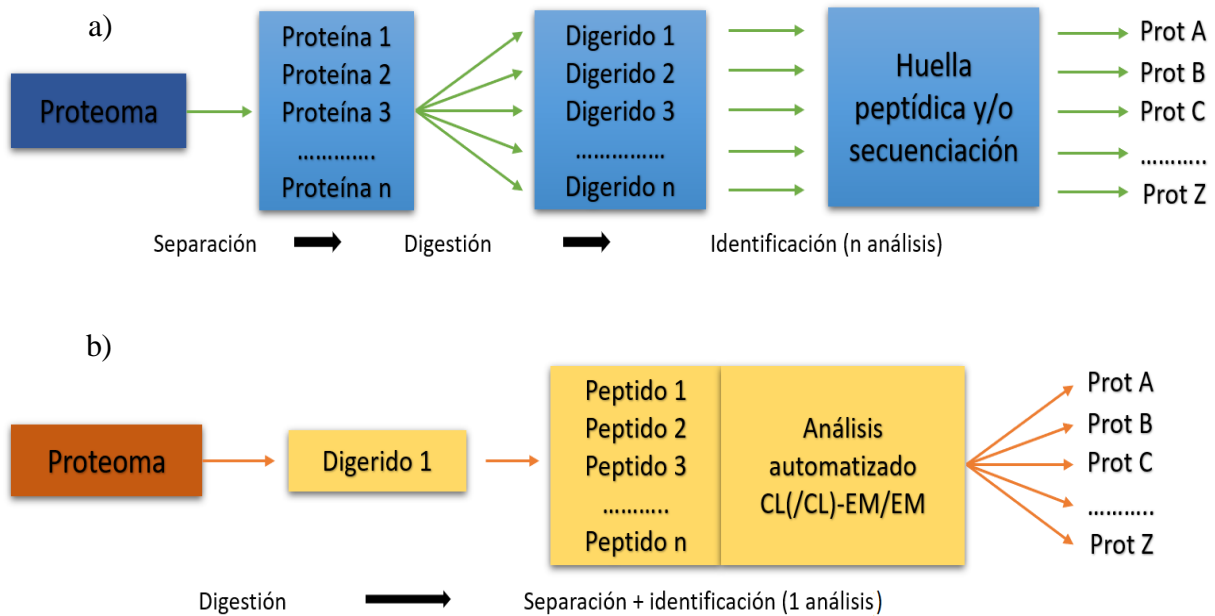


Figura 2.12. Comparación entre la secuencia general del análisis convencional de proteínas y el análisis masivo o *shotgun*. En los métodos clásicos (a) se identifica a cada una de las proteínas presentes en la muestra una vez separadas. En el análisis masivo (b) se analiza la muestra directamente después de la digestión enzimática de sus componentes mediante una o más etapas de separación cromatográfica acopladas a espectrometría de masas. Imagen modificada a partir de Abián *et al.*, 2014.

2.6.3. Identificación y cuantificación de proteínas en base al etiquetado isobárico

Los métodos de etiquetado basados en espectrometría de masas han permitido medir y cuantificar los niveles de expresión relativos de grandes conjuntos de proteínas con un alto grado de automatización. Las etiquetas isobáricas son pequeñas moléculas con estructura idéntica, cada una conformada por 3 grupos; (1) un grupo reactivo que se une covalentemente a los grupos amino terminal y a los grupos amino de las cadenas laterales de los péptidos procedentes de la digestión proteolítica, (2) un grupo reportero que es detectado en el espectro de masas resultante y que permite la cuantificación relativa de la concentración peptídica en cada muestra etiquetada y (3) un grupo de balance o compensador, que sirve para que el peso molecular de cada reactivo sea igual al resto. Cada reactivo o etiqueta consta de una masa total de 305 Da,

que a su vez están divididos entre la masa del grupo reportero, que representa a las etiquetas con relaciones m/z de 113 a 121 unidades y la masa del grupo de balance que va desde 192 a 184 unidades (Biosystems, s.f.), como se muestra en la figura 2.13.

Este método fue utilizado por primera vez por Thompson y colaboradores en 2003, cuando sintetizaron péptidos que contenían una etiqueta de masa tándem y demostraron que esta estrategia podía ser utilizada para obtener una cuantificación relativa en un experimento EM/EM (Thompson *et al.*, 2003). Tiempo después Ross y colaboradores (2004) realizaron un enfoque similar utilizando por primera vez el marcaje isobárico iTRAQ (por *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*) es decir, aplicando etiquetas de masa isobárica o de masa idéntica con multiplexado de 4 veces, esto quiere decir que se combinan 4 muestras diferentes en una sola, permitiendo así el análisis del contenido proteico de las cuatro muestras simultáneamente. Con esta estrategia se identificaron las tendencias globales de expresión de proteínas en un conjunto de cepas de levaduras isogénicas. Una serie de 8-plex, para ocho condiciones, de reactivo de iTRAQ funciona de manera similar y aumenta el rendimiento de los análisis (Rauniyar y Yates III, 2014).

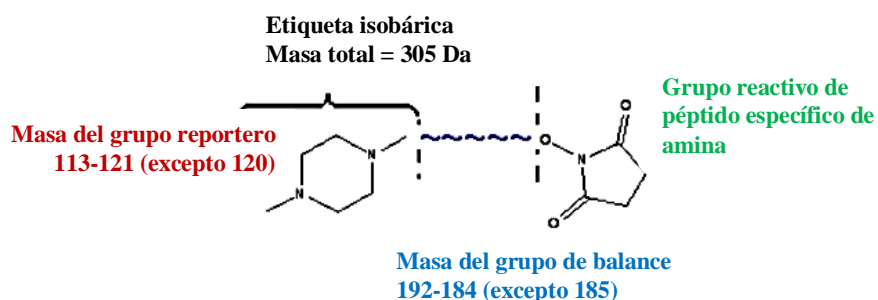


Figura 2.13. Representación gráfica de la estructura de los reactivos iTRAQ. Se omite la m/z del ion reportero 120 debido a que esa masa representa al ion amonio para la fenilalanina. Imagen tomada de nota técnica de Applied Biosystems (s.f.)

Con los reactivos iTRAQ se pueden etiquetar múltiples péptidos correspondientes a una proteína, lo que aumenta la confianza de la identificación y en la cuantificación de los espectros EM/EM. Los péptidos idénticos marcados con los diferentes reactivos exhiben el mismo ion padre. La fragmentación por espectrometría de masas tándem (EM/EM) del ion padre origina

iones de firma únicos que distinguen las muestras individuales; posteriormente, se puede determinar la abundancia relativa entre las muestras (Casado-Vela *et al.*, 2010) para realizar una estimación cuantitativa. La figura 2.14 muestra de manera esquemática, las etapas principales de este procedimiento.

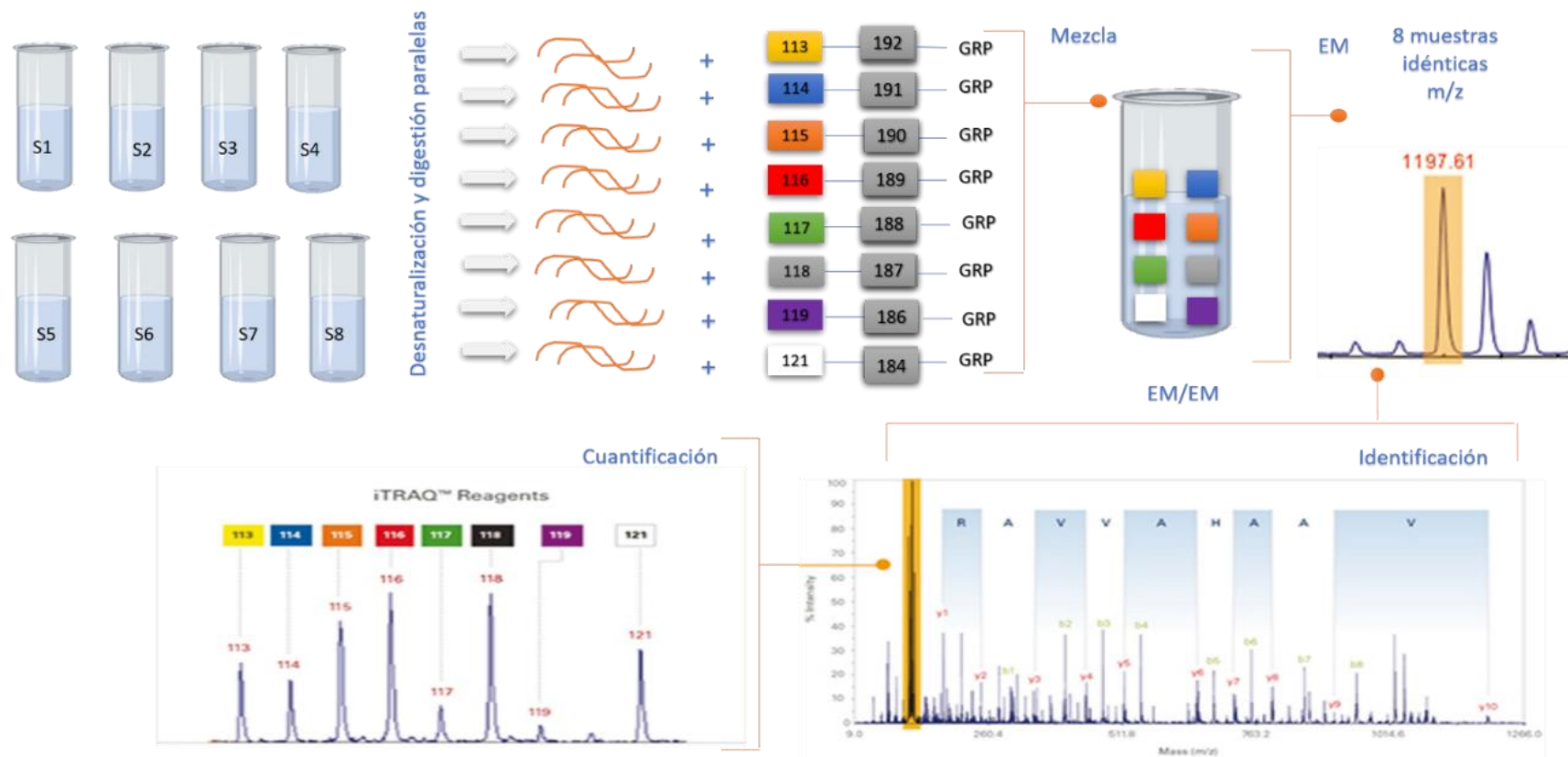


Figura 2.14. Flujo de trabajo de marcaje con reactivos iTRAQ isobáricos-8plex. Cada una de las ocho muestras de proteínas es digerida individualmente y etiquetada con un reactivo específico, después de lo cual se mezclan para su análisis mediante CL-EM/EM. Cada péptido se detecta por EM y luego se identifica por EM/EM. Cada etiqueta produce un ion indicador único en el espectro de EM/EM lo que facilita la identificación del péptido que lo originó, así como su abundancia relativa. Imagen modificada a partir de Williamson y Nimkar, 2008.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios, se observó que la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* tiende a aumentar la expresión de proteínas como GroEL-ES, EF-Tu, L21 y ARNt al ser expuesta a condiciones experimentales en las que se disminuye la concentración de NaCl, es conveniente realizar un análisis a profundidad del proteoma de dicha bacteria para identificar patrones de cambio en la expresión de sus proteínas al exponerla a diferentes concentraciones de sales como NaCl, MgSO₄, Na₂SO₄ y combinaciones de estas. Estas sales tienen relevancia en el estudio del potencial de habitabilidad del océano salado de agua líquida del satélite Europa. El estudio proteómico de *Salinibacter ruber* ayudaría no sólo a comprender cuáles proteínas están implicadas en sus estrategias de haloadaptación y las funciones biológicas en las que éstas participan, sino que también proporciona una visión más profunda de cómo esta bacteria podría adaptarse a ambientes salinos compuestos por sales sulfatadas, como el océano de agua salada del satélite Europa.

4. HIPÓTESIS

El proteoma de *Salinibacter ruber* presenta diferencias cualitativas y cuantitativas, que pueden ser identificadas mediante un análisis masivo de proteínas, cuando la bacteria es expuesta a distintas condiciones de salinidad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar el perfil proteómico de la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* cuando es expuesta a diferentes condiciones salinas basadas en NaCl y en sales sulfatadas.

5.2. Objetivos específicos

- Realizar las cinéticas de crecimiento de *S. ruber* en medios con concentraciones modificadas de distintas sales.
- Cuantificar la cantidad de proteína total obtenida en cada condición salina utilizando el método de Bradford
- Identificar, mediante la técnica de análisis masivo de proteínas (*shotgun*), la presencia o ausencia de proteínas expresadas en cada condición salina.
- Seleccionar a las proteínas que presenten respuestas estadísticamente significativas.
- Analizar la función biológica de las proteínas seleccionadas.
- Señalar la correlación entre la función biológica de las proteínas con las condiciones ensayadas, mismas que simulan las condiciones de salinidad propuestas para el océano de agua líquida del satélite Europa.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1. Activación de la bacteria *Salinibacter ruber*

La activación se lleva a cabo a partir de una pastilla que contiene a la cepa M31 liofilizada de *S. ruber* (DSM No. 13855). La pastilla se suspende en 0.5 mL de medio de cultivo nominal DSMZ 936 estéril, preparado según se muestra en la Tabla 6.1, se permite la hidratación durante 30 minutos. Posteriormente, los 0.5 mL se diluyen en una proporción 1:10 de medio nominal estéril y se incuban durante 2 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se transfieren 250 µL a un tubo de ensayo que contiene 10 mL de medio nominal líquido estéril y se incuban durante 48 – 72 horas o hasta obtener una D.O. $_{630\text{ nm}} = 0.1$ (medida en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453) para estandarizar el inóculo.

Una vez estandarizado el inóculo, se diluyen 5 mL en 50 mL de medio de cultivo estéril y se incuban a una temperatura de 37 °C en un agitador orbital (Lumistell ISO-45) a una velocidad de 150 rpm durante 14 días aproximadamente o hasta obtener una D.O. $_{630\text{ nm}}$ cercana a 0.5. Metodología basada en lo reportado por Miranda en 2015 y Echavarría en 2019.

Tabla 6.1. Medio Nominal DSMZ 936 para *Salinibacter ruber*. Todas las cantidades corresponde a un volumen de 1 L.

Componente	Cantidad (g)
NaCl	195
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	34.6
MgSO ₄	24.171
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1.25
KCl	5.0
NaHCO ₃	0.25
NaBr	0.625
Extracto de levadura	1.0

6.2. Preparación del preinóculo de *Salinibacter ruber*

Para inocular a cada uno de los medios de cultivo correspondientes a las distintas condiciones salinas estudiadas, se prepara un preinóculo de la bacteria en un volumen de 50 mL de medio

de cultivo nominal, mismo que se incuba a una temperatura de 37 °C con agitación de 150 rpm en un agitador orbital y se deja crecer aproximadamente 3 días o hasta llegar a la mitad de la fase exponencial, es decir un valor de $D.O._{630} = 0.3$ (Miranda, 2015).

6.3. Preparación de los medios modificados con distintas condiciones salinas

Los medios modificados se preparan como se indica en la Tabla 6.2. A partir del medio nominal se mantienen constantes todos los componentes, excepto la sal o sales que se muestran, las cuales se modifican en la cantidad indicada en la referida Tabla. En total se evalúan 8 diferentes condiciones salinas, cuatro con diferentes concentraciones molares de NaCl, dos con concentraciones molares específicas de MgSO₄, y de Na₂SO₄, y dos mezclas de sales sulfatadas, una con proporción equimolar y la otra con una proporción 2:1 (Echavarría, 2019).

Cada medio modificado se inocula con 5 mL del preinóculo de *S. ruber* y se dejan crecer por 77 horas, a una temperatura de 37 °C en un agitador orbital (Lumistell ISO-45), con agitación de 150 rpm. Los cambios en la $D.O._{630}$ se miden mediante espectrofotometría UV-Vis a intervalos regulares de tiempo. Al llegar a la mitad de la fase exponencial se detiene el crecimiento. Cada medio se centrifuga a 4,800 rpm a 4 °C durante 45 minutos, para obtener la biomasa a partir de la cual se realizará la extracción de proteína total. Cada condición salina se evalúa por triplicado.

Tabla 6.2. Composición de los medios modificados con las distintas condiciones salinas.

Condición salina	NaCl				MgSO ₄	Na ₂ SO ₄	MgSO ₄ : Na ₂ SO ₄	
	1.7 M	2.2 M	3.3 M	4.4 M	1.5 M	0.5 M	1:1	2:1
Composición	10 g NaCl	12.86 g NaCl	19.3 g NaCl	25.71 g NaCl	10 g NaCl	10 g NaCl	10 g NaCl	10 g NaCl
		2.418 g MgSO ₄	2.418 g MgSO ₄	2.418 g MgSO ₄	12.037 g MgSO ₄	7.1 g Na ₂ SO ₄	6.185 g MgSO ₄	12.037 g MgSO ₄
		0 g MgSO ₄	7.1 g Na ₂ SO ₄	7.1 g Na ₂ SO ₄				
		MgSO ₄	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄				

Las cantidades están indicadas para un volumen final de 100 mL.

6.4. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La biomasa obtenida de la etapa anterior y correspondiente a cada condición salina, se resuspende en 5 mL de disolución amortiguadora Tris-HCl que tiene un valor de pH 7.

Posteriormente, se lisan las células bacterianas con la ayuda de un sonicador, con una secuencia de 5 ciclos con pulsos de 30 segundos y 30 segundos de descanso entre cada pulso. Un volumen de 2 mL del sonicado se centrifuga a 13,000 rpm durante 20 minutos, se desecha el pellet que contiene las membranas y residuos celulares y se recupera el sobrenadante que es en donde se encuentra el extracto total de proteínas. Este se almacena en tubos Eppendorf a -20 °C.

La cuantificación de proteínas se realiza siguiendo el protocolo del método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*) el cual utiliza un estándar de gammaglobulina (Bio-Rad). Se realiza una gráfica de calibración en el intervalo de 1 a 20 µg de proteína/µL. Con esta gráfica y utilizando el valor de D.O.₅₉₅ del extracto total de proteínas correspondiente a cada condición salina, se determina la cantidad de proteína presente en 1 µL de dicho extracto. Con esta información se calcula la cantidad de proteína que se analizará mediante la técnica de *shotgun*.

6.5. Análisis masivo de proteínas

El análisis proteómico se realiza utilizando la técnica de *shotgun proteomics* con marcaje con reactivos isobáricos iTRAQ 8-plex. Primeramente, se preparan los medios de cultivo modificados como se describió en la sección 6.3. Cada condición salina se prepara por triplicado. Se hace crecer a *S. ruber* en cada condición salina hasta la mitad de su fase exponencial. Posteriormente cada medio modificado se centrifuga a 4,800 rpm durante 45 min para obtener la biomasa de la cual se extraerán las proteínas totales. Para ello, se macera la muestra con nitrógeno líquido, luego se adiciona buffer de solubilización y se somete a 6 ciclos de sonicación de 15 segundos cada uno, dejando reposar la muestra por al menos 1 minuto. Posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 13200 rpm en centrifuga refrigerada a temperatura ambiente y se recupera el sobrenadante, se incuba durante 30 minutos a 40 °C, se añade disolución de Tris con pH 8.6 y se ajusta a una concentración final de 500 mM, se incuba durante 30 minutos y se congela a -80 °C. Luego las células se lisan con un sonicador durante 10 minutos, en ciclos de 30 segundos de sonicación por 30 segundos de descanso entre cada pulso y finalmente volviendo a centrifugar la muestra ya sonicada para obtener el extracto de las proteínas totales.

Posteriormente se disuelven por lo menos 200 µg de cada una de las muestras de proteínas en 20 µL de TEAB 100 mM (bicarbonato de trietilamonio), disolución que tiene un pH de 8.5. Las proteínas contenidas en cada muestra se reducen con TCEP (clorhidrato de tris(-2

carboxietilfosfina) y se alquilan con MMTS (metil metanotiosulfonato), se añade tripsina y se permite que ocurra la digestión de las proteínas durante al menos 12 horas a temperatura ambiente.

Por otro lado, los reactivos iTRAQ-8plex se preparan añadiendo 70 μ L de etanol a cada uno de los viales en los que están contenidos. La disolución resultante se reúne con cada una de las ocho muestras en estudio, mismas que se incuban a temperatura ambiente durante dos horas. Pasado este tiempo, la mezcla de muestras de los péptidos obtenidos se separa en un sistema *RSLCnano UHPLC Dionex Ultimate 3000* acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive Plus* (Thermo Fisher Scientific). Primero se inyectan en una precolumna PepMap100 C18 (tamaño de partículas: 5 μ m, tamaño de poro: 100 Å, diámetro interno: 300 μ m \times 5 mm de longitud) y se separan siguiendo un gradiente de elución de 250 minutos usando una columna capilar a 250 nL/min (columna de pulverización *ESAY*, PepMap RSLC, C18, tamaño de partícula: 3 μ m, tamaño de poro: 100 Å, diámetro interno: 75 μ m \times 150 mm de longitud). Los péptidos se eluyen usando gradientes de ácido fórmico al 0.1 % en agua y acetonitrilo 90:10 (v/v): agua.

La mezcla se analiza mediante espectrometría de masas en tándem. Los datos se colectan utilizando el programa Max Quant (protocolo organizado por el Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México). Posteriormente, los péptidos son identificados con ayuda de alguna base de datos de proteínas como UniProt.

6.6. Análisis estadístico

Posterior al análisis proteómico, el análisis estadístico se realiza con ayuda de lenguaje de programación Python. Primero se evalúa si los datos obtenidos cumplen los requisitos paramétricos para realizar un análisis de varianza (*ANOVA*), si estos no se cumplen se realiza la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Con los resultados del análisis estadístico se pueden seleccionar las proteínas que presenten cambios más significativos en su expresión. Posteriormente, se determina su función biológica con apoyo de la base de datos MetaCyc, la cual proporciona información de rutas metabólicas y también con apoyo en la literatura existente sobre las proteínas seleccionadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados de cuantificación de proteínas por Ensayo de Bradford

Se realizó la cuantificación de proteínas siguiendo el método de Bradford. Esto permitió conocer la cantidad de proteínas que *Salinibacter ruber* expresa en cada una de las condiciones experimentales de interés. La cuantificación se basó en la gráfica de calibración construida a partir de una dilución estándar de plasma bovino liofilizado (*Bio-Rad*) de la cual se conoce que contiene 1.44 mg/mL de gamma globulina al rehidratarla con 20 μ L de agua milli-Q, lo cual significa que 1 μ L del reactivo contiene 1.44 μ g de gamma globulina. Los volúmenes analizados fueron 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 μ L de la dilución estándar. A cada uno de ellos se le midió el valor de densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis (*Agilent 8453*). Cada medición se realizó por triplicado y el promedio de cada volumen se utilizó para construir la gráfica de calibración que se muestra en la figura 7.1. También se calculó la desviación estándar de cada medición, pero su valor es tan pequeño que no se visualiza en la gráfica. Los valores de todas las mediciones realizadas se muestran en la Tabla 7.1. El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante el método de mínimos cuadrados, lo que condujo a la obtención de la ecuación del mejor ajuste lineal (Fig. 7.1).

Tabla 7.1. Resultados obtenidos de las mediciones de densidad óptica de gammaglobulina.

Volumen (μ L)	Concentración de proteína (μ g/ μ L)	Densidad óptica promedio (U. A.)	Desviación estándar
1.0	1.44	0.0061	0.0042
2.0	2.88	0.0144	0.0059
4.0	5.76	0.1113	0.016
6.0	8.64	0.1542	0.0406
8.0	11.52	0.2885	0.0519
10.0	14.4	0.2639	0.0526
12.0	17.28	0.3341	0.0124
14.0	20.16	0.4195	0.0381
16.0	23.04	0.521	0.0437
18.0	25.92	0.5197	0.0368
20.0	28.80	0.5833	0.0313

U. A: Unidades arbitrarias

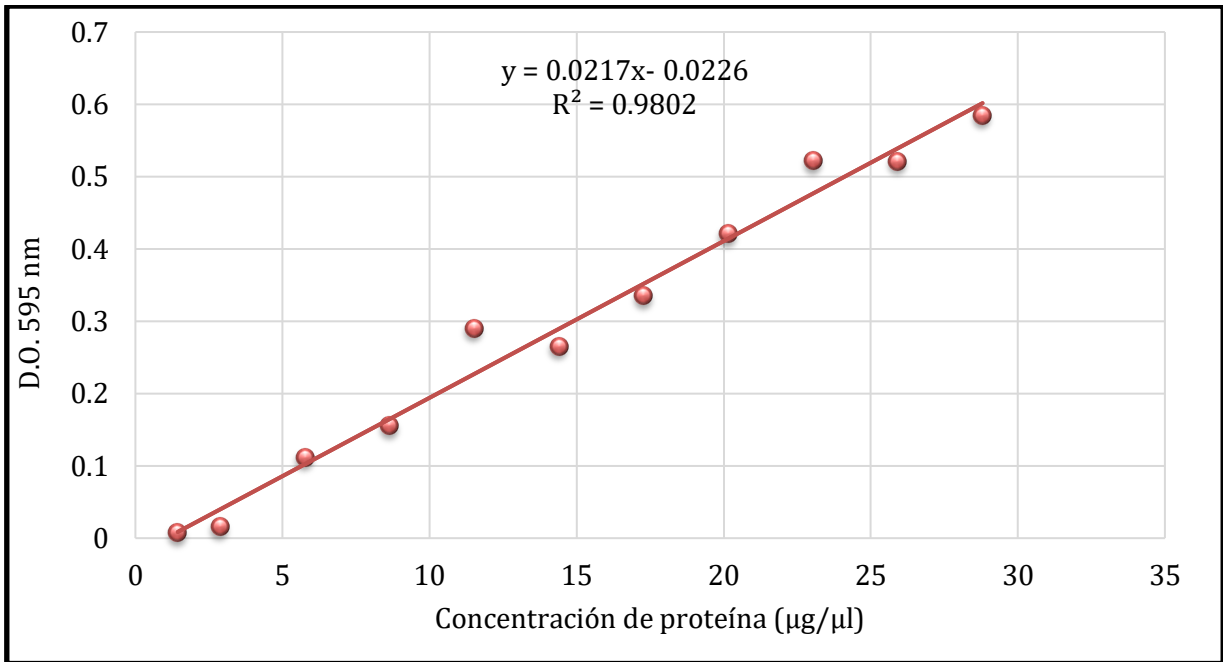


Figura 7.1 Gráfica de calibración de gamma globulina. El eje x corresponde a la concentración de proteína presente en el volumen añadido mientras que el eje y corresponde a las mediciones de densidad óptica realizadas a 595 nm.

Con ayuda de la gráfica de calibración estándar se procedió a cuantificar las proteínas de las bacterias presentes en cada condición de estudio. Se tomaron volúmenes de 5, 10 y 15 µL del extracto proteico de cada condición experimental en estudio, es decir de cada medio modificado, y se midió el valor de D.O. a 595 nm de cada volumen para elegir aquel cuyo valor de D.O permitiera conocer por interpolación en la gráfica de calibración, la cantidad de proteína presente (Tabla 7.2). Los datos de todas las mediciones realizadas se muestran en la Tabla 7.3. Una vez identificado el volumen adecuado, se utiliza la ecuación resultante de la gráfica de calibración (Ec. 7.1) para determinar la concentración de proteína presente en cada muestra, es decir en cada uno de los medios modificados en los que se hizo crecer a *S. ruber*.

$$y = 0.0217x - 0.0226$$

En donde:

y = densidad óptica

x =concentración de proteína µg/µl

para obtener la concentración de proteína presente en cada muestra la ecuación 7.1 se despeja de la siguiente manera:

$$\text{concentración de proteína} = \frac{D.O. + 0.0226}{0.0217}$$

Tabla 7.2. Selección de un volumen de proteína añadido de cada condición de acuerdo con su densidad óptica.

Condición salina evaluada	Volumen de proteína añadido (µL)	D.O.
NaCl 1.7 M	5.0	4.16E-02
	10.0	0.15877
	15.0	0.1139
NaCl 2.2 M	5.0	0.10573
	10.0	0.29691
	15.0	0.31279
NaCl 3.3 M	5.0	0.13013
	10.0	0.40717
	15.0	0.47774
NaCl 4.4 M	5.0	-5.67E-03
	10.0	0.33535
	15.0	0.32568
Na ₂ SO ₄	5.0	4.23E-02
	10.0	0.26363
	15.0	0.29757
MgSO ₄	5.0	0.11937
	10.0	0.14479
	15.0	0.30057
Equimolar	5.0	5.25E-02
	10.0	0.23256
	15.0	0.37438

D. O: Densidad óptica

Se obtuvo la concentración de proteína de las réplicas de cada condición y posteriormente se obtuvieron los promedios de concentración de proteína presente en cada condición salina. Finalmente, se consiguió obtener la cantidad total de proteína presente en cada medio de cultivo

modificado, multiplicando cada promedio por 5000 μL (que representan los 5ml de solución amortiguadora en los que se resuspendió la biomasa para extraer a las proteínas), como se muestra en las siguientes ecuaciones.

$$\text{promedio} = \Sigma \text{concentraciones de proteína} / 3$$

$$\text{cantidad total de proteína } (\mu\text{g}) = \text{promedio} \times 5000 \mu\text{L}$$

Tabla 7.3. Datos para la obtención de la cantidad total de proteína presente en 100 mL de medio de cultivo.

Condiciones evaluadas	Volumen (μL)	D.O.	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentración promedio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad total de proteína (μg)
1.7 M NaCl	15	0.1139	6.290d	8.2694	41347.1582
		0.21284	10.8497		
		0.1438	7.6682		
2.2 M NaCl	15	0.30584	15.1354	15.8981	79490.7834
		0.32673	16.0981		
		0.3346	16.4608		
3.3 M NaCl	10	0.33101	16.2953	14.2273	71136.7127
		0.29517	14.6437		
		0.23222	11.7428		
4.4 M NaCl	15	0.2937	14.576	14.6056	73028.4178
		0.28426	14.141		
		0.30507	15.1		
0.5 M Na₂SO₄	15	0.30659	15.17	14.4969	72484.639
		0.28136	14.0073		
		0.288	14.3133		
1.5 M MgSO₄	15	0.24983	12.5543	14.1599	70799.5392
		0.36448	17.837		
		0.2397	12.0875		
0.5 M Na₂SO₄ /1.0 M MgSO₄	15	0.23442	11.8442	12.209	61049.1551
		0.25993	13.0198		
		0.23271	11.7654		

Una vez realizada la cuantificación de la cantidad de proteínas presente en cada condición experimental evaluada, se encontró que se tienen cantidades de proteína más que suficientes para proceder al análisis masivo de las mismas, A su vez, se puede observar, que hay una diferencia notable en las cantidades de proteínas para algunas condiciones, como la de 1.7 M de NaCl y la condición 2:1 (0.5 M Na₂SO₄/ 1.0 M MgSO₄), que muestran menor cantidad de proteínas totales en comparación con el resto de las condiciones evaluadas, lo cual podría ser un indicio de que en estas dos condiciones *S. ruber* enfrenta un cambio en su proteoma, que hace que algunas proteínas se expresen con menor abundancia o dejen de expresarse, debido al estrés provocado por la disminución del NaCl en una condición y la saturación de sales debido al aumento en la cantidad de sales sulfatadas en la otra condición experimental.

7.2 Resultados preliminares del análisis masivo de proteínas

Siguiendo el mismo protocolo descrito para realizar la cuantificación de las proteínas por método de Bradford, se prepararon nuevamente medios modificados que se inocularon con *S. ruber* y se incubaron a las condiciones de óptimo crecimiento para la bacteria. La totalidad de biomasa recuperada se envió al Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México donde cada muestra se prepara según lo descrito en la sección 6.4 para proceder finalmente a su análisis mediante CL-EM/EM, después de haber realizado el protocolo de preparación de la mezcla de péptidos.

Los péptidos presentes en cada muestra serán detectados en función de su relación m/z en espectros de masas (EM) que mostrarán a los iones precursores, los cuales en un segundo análisis (EM/EM), serán seleccionados y fragmentados; lo que proporcionará información para poder identificar a los péptidos a partir de la secuencia de aminoácidos que lo conforman, los cuales son identificados de acuerdo, nuevamente, a sus relaciones de m/z. En la figura 7.2 se puede observar de manera gráfica el flujo de trabajo descrito; en ella se muestran todos los iones de la mezcla que representan a los péptidos obtenidos de la digestión trípica de las muestras, luego la selección de un ion precursor (el cual en este caso tendrá una masa total conformada por 305 Da de la masa molecular de la etiqueta isobárica más la masa molecular del péptido) y por último la fragmentación de los distintos iones precursores, obteniendo los espectros EM/EM de cada uno.

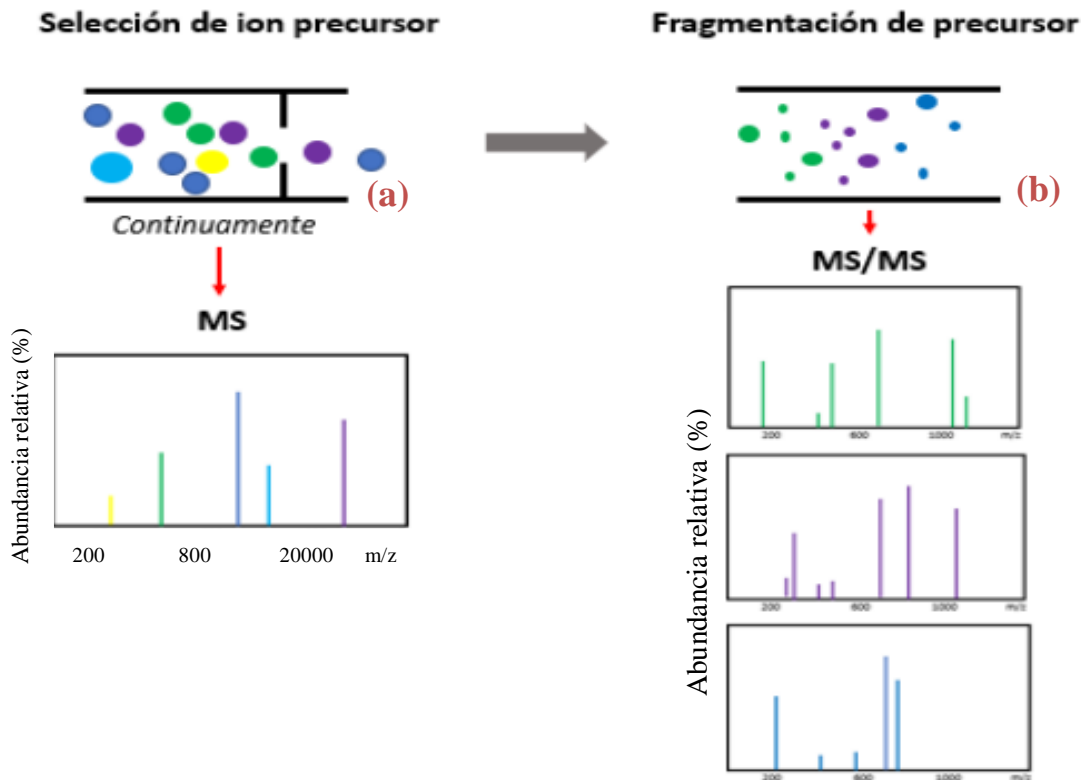


Figura 7.2. Ejemplo de un espectro de ion precursor obtenido en espectrometría de masas (a) y de los espectros obtenidos por espectrometría de masas tándem (EM/EM) a partir de la fragmentación de los iones precursores (b).

Las etiquetas isobáricas también permitirán realizar estimaciones cuantitativas a través de la abundancia relativa con la que se presentan, como se muestra en la figura 7.3.

Luego con ayuda de motores de búsqueda se identifican los péptidos mediante mapeo peptídico, en donde se comparan las masas obtenidas de los péptidos, con masas teóricas de péptidos almacenados en bases de datos como se muestra en la figura 7.4., generando una lista de péptidos puntuados por coincidencias de espectro (PSM por *scored Peptide to Spectrum Matches*). Estas listas luego se analizan y se vuelven a puntuar para permitir la comparación y combinación de resultados de diferentes motores de búsqueda (Vaudel *et al.*, 2012). Una vez identificados y cuantificados todos los péptidos presentes en cada experimento, se procederá a correlacionar a cuáles proteínas corresponden esos péptidos: esto se realizará con ayuda de

bases de datos de proteínas. Con esa información se procederá a realizar un análisis estadístico que, dependiendo de la normalidad de los datos, podría ser paramétrico o no paramétrico.

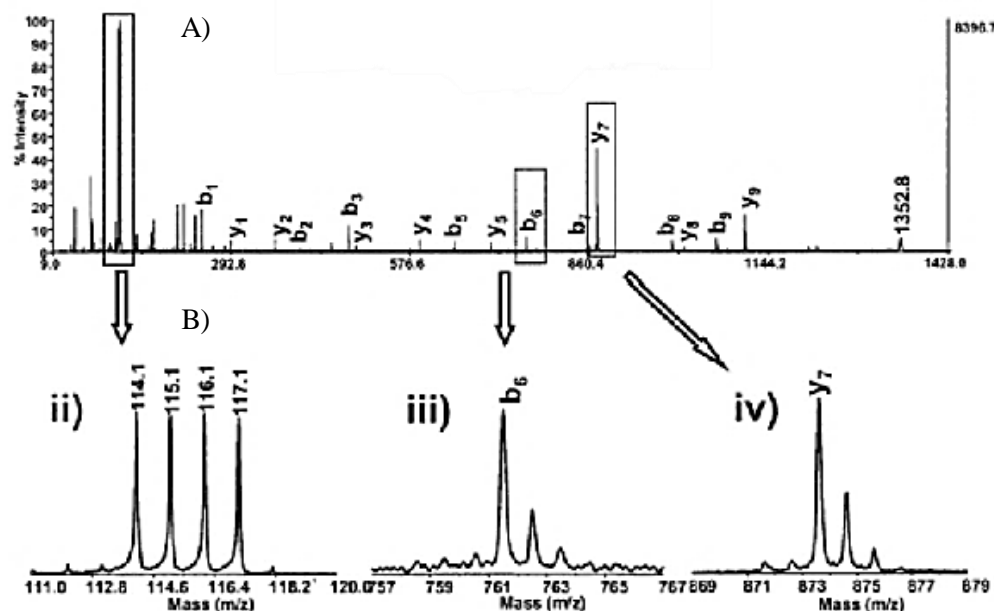


Figura 7.3. Estimaciones cualitativas y cuantitativas de los oligopéptidos identificados mediante CL-EM/EM. El espectro superior (A) corresponde con el oligopéptido, las señales marcadas como b_i o y_i corresponden a los fragmentos N-terminal y C-terminal de los aminoácidos que conforman al oligopéptido. En los espectros inferiores (B) se muestra una ampliación de dos de esos fragmentos (iii y iv) así como la facilidad que otorgan las etiquetas isobáricas (ii) para identificar en cuales muestras está presente algún péptido seleccionado.

A partir de los análisis estadísticos se espera encontrar diferencias en la expresión proteica de *S. ruber*, ya sea que algunas de las proteínas sean reguladas al alza, es decir, se vean sobre expresadas en algunas de las condiciones experimentales ensayadas; y algunas otras proteínas sean reguladas a la baja, lo que nos indicaría que esas proteínas probablemente estén implicadas en los mecanismos de respuesta al estrés. A continuación, se mostrará un ejemplo con datos ficticios de los resultados que obtendría del análisis masivo de proteínas.

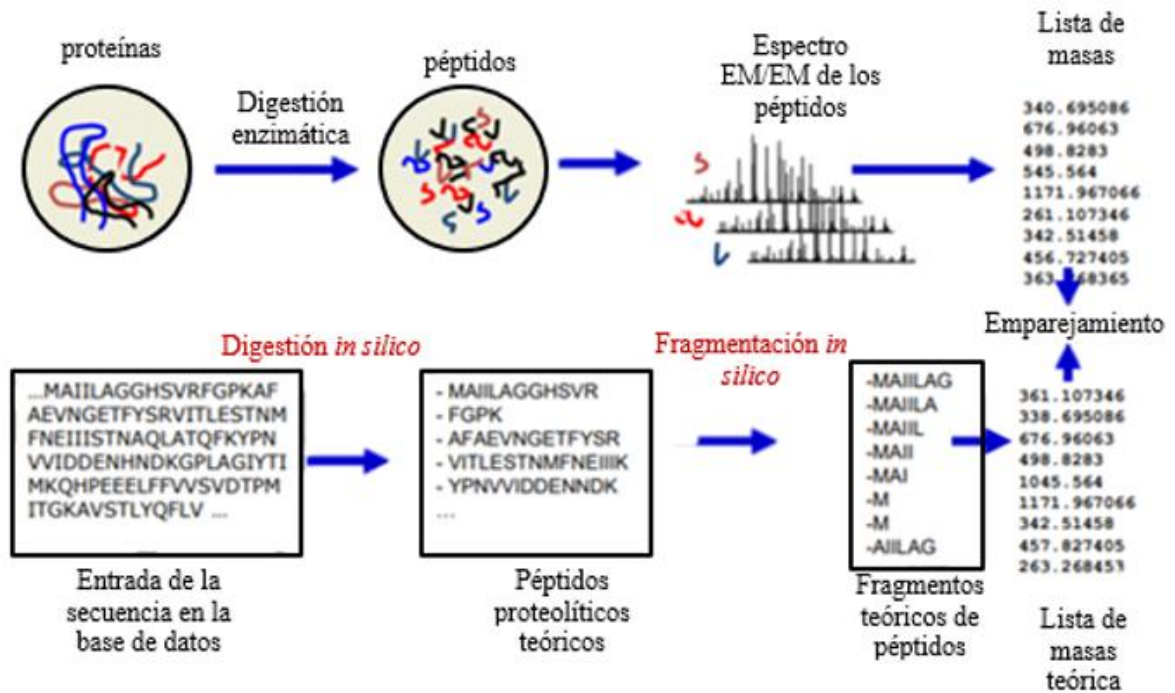


Figura 7.4. Identificación de péptidos mediante huella de masas peptídicas.

En este estudio hipotético y que se presenta solo para ejemplificar los resultados esperados, se identificaron 100 proteínas, 15 de ellas presentaron expresión diferencial en su abundancia, pero 6 de ellas tuvieron expresión diferencial significativa como se muestra en la tabla 7.4; por lo que fueron elegidas para analizar su función molecular y los procesos biológicos en los cuales están involucradas.

Tabla 7.4. Lista hipotética de proteínas identificadas y su selección de acuerdo con su expresión diferencial en términos de abundancia, en respuesta a las diferentes condiciones de salinidad.

Nombre de la proteína	1.7 M NaCl	2.2 M NaCl	3.3 M NaCl	4.4 M NaCl	1.5 M MgSO₄	0.5 M Na₂SO₄	MgSO₄/Na₂SO₄ equimolar	MgSO₄/Na₂SO₄ 2:1
GroEL	125	100	95	90	100	115	120	100
ATP sintasa	100	100	98	100	99	99	90	90
ARNt- aspartato ligasa	50	75	80	80	60	75	65	70
L- lactato deshidrogenasa	5	10	12	15	10	10	15	15
EF-TU	70	90	60	65	80	90	65	65
L-21	8	20	15	16	15	20	16	16
Chaperona DnaK	80	70	70	85	75	75	80	85
Chaperona DnaJ	86	71	71	87	78	78	85	88
Malato deshidrogenasa	0	30	35	29	30	30	29	28
Citocromo c oxidasa	30	45	57	68	45	45	50	60
DNA ligasa	20	27	28	28	25	26	27	28
Enolasa	34	35	37	37	36	34	37	37
Proteína de división celular FtsQ	10	14	16	14	15	15	14	10
Transportador familia de simportadores sodio/sulfato	8	12	13	15	12	9	12	12
Proteína de absorción de potasio trk	9	11	12	15	13	13	8	10

En la tabla 7.4 se mencionan algunas proteínas identificadas en el estudio de Miranda (2015), la chaperona GroEL, el factor de elongación EF-TU, la ARNt-Aspartato ligasa y la proteína L21. Además, para estas proteínas existe evidencia de que se expresan diferencialmente en las diferentes condiciones de interés de mi proyecto de tesis (figura 7.5). También se han añadido algunas otras proteínas que se sospecha podrían mostrar una expresión diferencial, ya sea al alza o a la baja, ya que según su función podrían estar involucradas en procesos biológicos relacionados con el mecanismo de adaptación de *S. ruber* al estrés salino provocado por los cambios ambientales a los que fue expuesta. Para elegir a las proteínas expuestas en la tabla anterior, se realizó una búsqueda en bases de datos como UniProt y NCBI en donde se encontró una extensa lista de proteínas inferidas a partir de la secuenciación del genoma de *S. ruber*. En dichas bases de datos además se puede encontrar la secuencia de las proteínas (de acuerdo al genoma) en formato FASTA, una breve descripción de la función de las proteínas, referencias a otras bases de datos externas, como STRING (base de datos de interacción proteína-proteína), SWISS-MODEL (base de datos de estructura 3D de proteínas) entre otros, que dan a conocer información, sobre la estructura, ubicación, función molecular, vías metabólicas y procesos biológicos en los que están implicados las proteínas. A continuación, se describen algunas funciones de las proteínas seleccionadas en este ejemplo.

7.2.1. Chaperonina GroEL

Esta proteína, también conocida como chaperona de 60 kDa, está conformada por dos anillos apilados, uno al lado del otro y cada uno de ellos está conformado por 7 subunidades idénticas de 57 kDa (UniProt Consortium, 2019). Junto con la co-chaperonina GroES, forman un complejo proteico dependiente de ATP llamado GroEL-GroES que tiene como función promover el replegamiento de proteínas que han perdido su conformación nativa como consecuencia de condiciones de estrés; brindándoles un ambiente aislado en el cual pueden volver a plegarse correctamente.

Esta chaperonina bacteriana junto con su cofactor GroES se clasifican como chaperoninas del grupo I, que se encuentran en bacterias, así como en cloroplastos, mitocondrias y orgánulos eucariotas que descienden de endosimbiontes bacterianos. También existen las chaperoninas del grupo II que se encuentran en el citosol de arqueas y eucariotas (Hayer *et al.*, 2016).

Al igual que todas las chaperoninas del grupo I, GroEL está compuesta por dos anillos heptaméricos, cuyas subunidades comprenden tres dominios estructurales unidos por bisagras; un dominio apical que forma la apertura del canal y se une a la proteína sustrato (la proteína a plegar) mediante interacciones entre los residuos hidrófobos accesibles del polipéptido y los residuos hidrófobos expuestos en la superficie de la abertura de los dominios apicales; un ecuatorial ubicado en la base del anillo, que mantiene las interacciones entre anillos y es el sitio de unión a ATP; y un dominio intermedio que mantiene unidos a los dominios apical y ecuatorial (Chen y Sigler, 1999).

GroES es un anillo heptamérico en forma de cúpula, conformado por subunidades de 10 kDa. Este se une a los extremos de GroEL, formando una cámara sellada con una superficie interna muy polar en la que la proteína sustrato queda encapsulada para poder plegarse (Hayer *et al.*, 2016). (Véase en la figura 7.5).

El ciclo funcional de plegamiento de GroEL-GroES se ha descrito como “un movimiento de dos tiempos”. El plegamiento productivo de proteínas se lleva a cabo en el anillo “*cis*” que como se observa en la figura 7.5 es el anillo que se unirá a GroES, al sustrato y al ATP. Al unirse se forma un complejo “*cis-ternario*” donde se inicia el plegado del sustrato aislado, dentro de la llamada “*Jaula de Anfinsen*”, que no se disocia hasta que se completa la hidrólisis de ATP. Al llevarse a cabo la reacción $\text{sustrato} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{proteína plegada} + \text{ADP} + \text{fosfato} + \text{H}^+$ el ensamblaje del complejo *cis-ternario* se debilita; un nuevo sustrato se une al anillo opuesto no ocupado o *trans* y donde la unión de ATP impulsa la formación de una nueva cámara de plegado, desensamblando así el complejo *cis* original y liberando al sustrato plegado, por lo que el anillo *trans*, se convertirá en *cis* (Rye *et al.*, 1997; Chen y Sigler, 1999) como se muestra en la figura 7.6

Al ser una proteína con una función tan importante, se puede encontrar en una gran diversidad de organismos, por lo que es de esperarse que tenga un alto porcentaje de identidad con respecto a las proteínas GroEL de otras especies filogenéticamente cercanas. Miranda (2015) realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos comparando con otras especies, y observó que la proteína Sr-GroEL tiene un 61 % de identidad respecto a GroEL de *E. coli* que es una bacteria no halófila que de acuerdo a diversos estudios la sobreexpresión de este complejo le es útil para adaptarse a condiciones de estrés térmico y a condiciones que provoquen alteraciones en las funciones de sus proteínas (Fayet *et al.*, 1989; Caspi *et al.*, 2014);

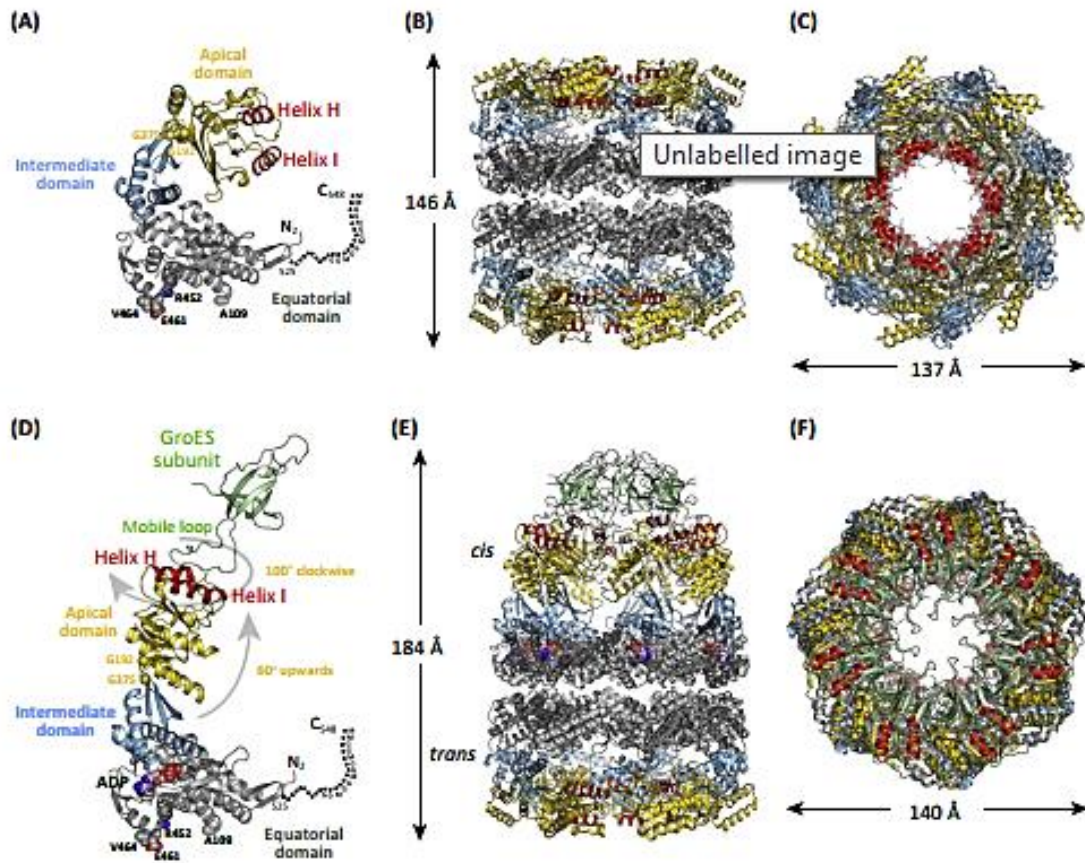


Figura 7.5. Estructura cristalina de GroEL de *E. coli*. A: Estructura de subunidad de GroEL con sus tres dominios estructurales y las Hélices H e I que participan en la unión del sustrato o el cofactor GroES. B: vista lateral de GroEL mostrando sus dos anillos heptaméricos apilados. C: vista del extremo apical del cilindro. D: vista estructural de GroEL unido al cofactor GroES (monómero activo) en presencia de ADP. Las flechas grises indican la reorientación del dominio apical de GroEL sobre la unión de ATP y la interacción con GroES. E: complejo proteico GroEL-GroES con su conformación *cis* y *trans*. F: vista del extremo *cis* unido a GroEL. Imagen tomada de Hayer y colaboradores (2016).

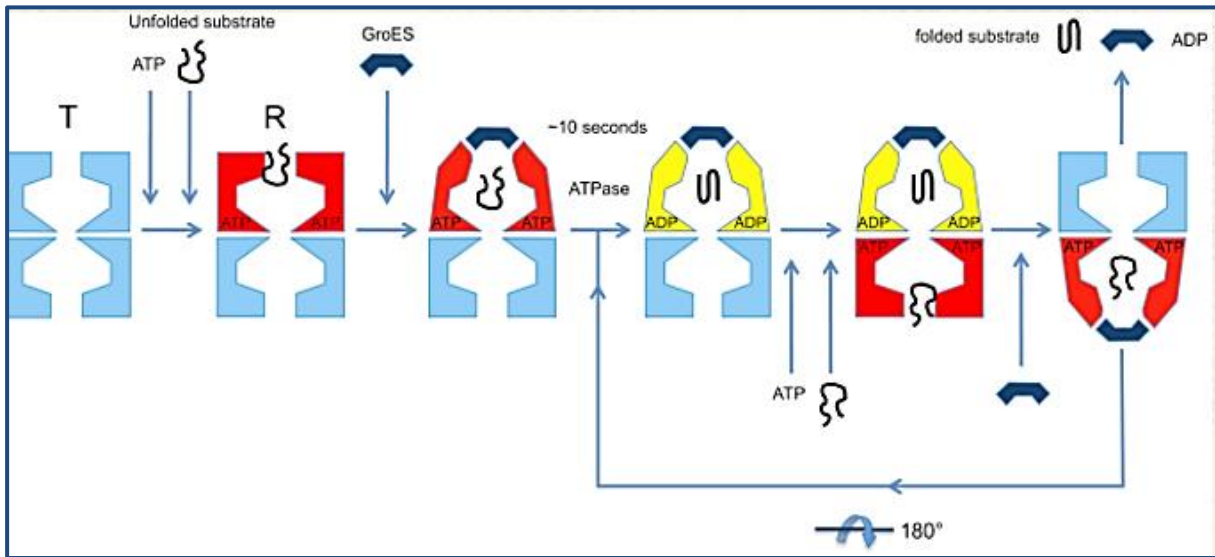


Figura 7.6 Descripción gráfica del ciclo de plegamiento y la reacción ATPasa que lleva a cabo el complejo GroEL-GroES. Imagen tomada de Clare *et al*, 2012.

también observó 63 % de identidad al comparar con GroEL de *H. elongata* que es una bacteria halófila moderada. Sin embargo, notó que había mayor coincidencia entre GroEL de *E. coli* y *H. elongata* con un 75.4 % de identidad, lo cual no es del todo inesperado, ya que al analizar el tipo de estrategia de haloadaptación que utiliza *H. elongata*, resultó que esta bacteria utiliza la acumulación de solutos compatibles, por lo que sus proteínas no requieren de cambios conformacionales para mantenerse funcionales ante las altas concentraciones salinas (Oren, 2008) a diferencia de *S. ruber*, que al utilizar la estrategia de acumulación de iones inorgánicos, presenta cambios en sus proteínas a nivel de secuencia, expresando una mayor cantidad de aminoácidos con carga negativa y una disminución en el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie de sus proteínas, lo que les permite retener con mayor fuerza su capa de hidratación, que les ayuda a mantenerse solubles en medios con altas concentraciones salinas, además el aumento en el porcentaje de aminoácidos ácidos les confieren una mayor flexibilidad, provocando que sean más estables y no pierdan tan fácilmente su función (Miranda, 2015).

En las investigaciones realizadas por Miranda (2015) y Echavarría (2019) se menciona que la sobreexpresión de este complejo proteico está asociada al estrés salino provocado por cambios en las concentraciones de NaCl y MgSO₄, esto sucede debido a que al cambiar la composición de los medios de cultivo las proteínas de *S. ruber* sufren un cambio estructural y aunque algunas

de ellas pueden permanecer estables, para algunas otras proteínas cualquier cambio en las condiciones celulares puede implicar su desnaturalización y por lo tanto la pérdida de su función. (Caspi *et al.*, 2014).

7.2.2. Factor de elongación EF-Tu

El factor de elongación termo-inestable es un factor de elongación de proteínas bacteriano. Es una proteína monomérica con un peso molecular aproximado de 43 kDa. En investigaciones realizadas sobre esta proteína en *E. coli* se ha observado que su principal función es promover la unión de aminoacil ARNt dependiente de GTP (guanosin trifosfato) al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas. Esta proteína además tiene actividad GTPasa ya que hidroliza GTP mediante la siguiente reacción: $GTP + H_2O \rightarrow GDP + \text{fosfato}$ (Caspi *et al.*, 2014; UniProt Consortium, 2019).

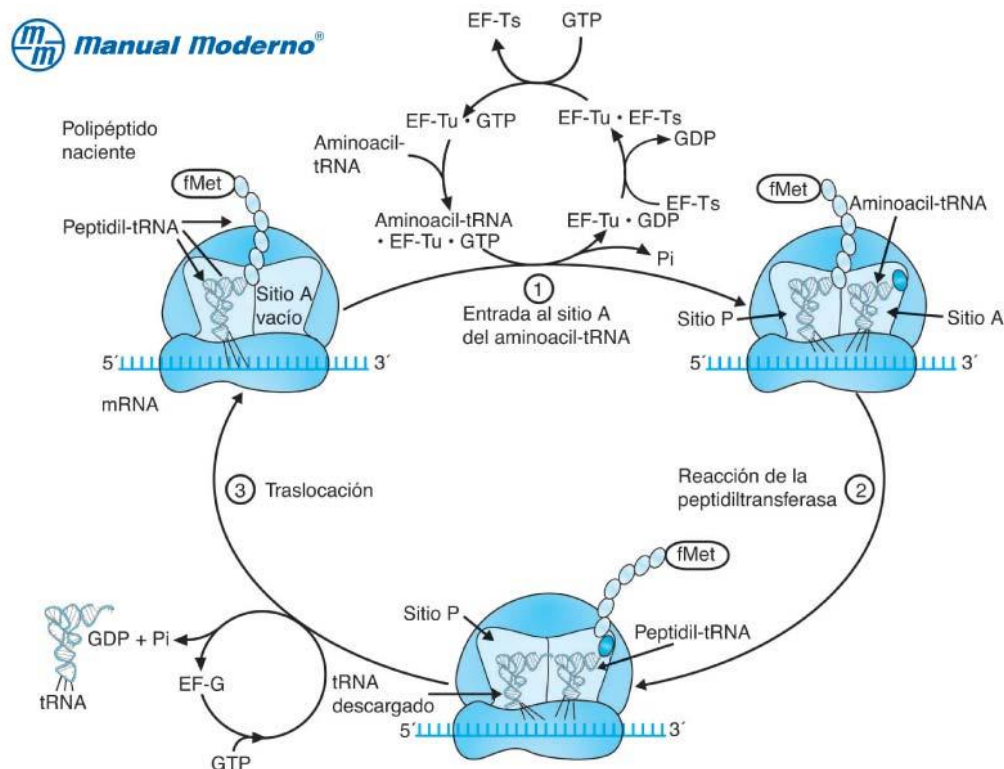


Figura 7.7 Descripción gráfica del ciclo funcional y las reacciones realizadas por EF-Tu. Imagen tomada del sitio web *Manual Moderno*.

Fuera del ribosoma, EF-Tu forma un complejo con GTP; la unión de este complejo a un aa-ARNt forma un complejo ternario y a su vez este complejo es trasladado al sitio A de un ribosoma activo, en el que el anticodón de ARNt se une a un codón de ARNm, cuando la unión de estos es correcta, el ribosoma cambia de configuración y altera el dominio GTPasa de EF-Tu, ocasionando la hidrólisis de GTP. Tras esta reacción, la conformación de EF-Tu cambia drásticamente y se disocia del aa-ARNt y del ribosoma. Luego de que EF-Tu-GDP es liberado en el citoplasma interactúa con el factor de elongación EF-Ts, provocando que EF-Tu libere al GDP, quedando disponible para unirse nuevamente a un GTP y asociarse a un nuevo aa-ARNt (Figura 7.7) (Hunter & Spremulli, 2004).

En un estudio realizado por Caldas y colaboradores, se observó que la proteína EF-Tu de *E. coli* al igual que las chaperonas, interactúa con proteínas desdobladas y desnaturalizadas, promoviendo el plegamiento funcional de citrato sintasa y alfa-glucosidasa después de su desnaturalización por urea. Además, previene la agregación de dichas enzimas en condiciones de choque térmico, y forma complejos estables con proteínas no plegadas; siendo el complejo EF-Tu GDP mucho más activo que EF-Tu GTP en la estimulación de la renaturalización de las proteínas. Este descubrimiento sugeriría que además de su función de alargamiento de proteínas, también podría estar involucrada en el plegamiento de proteínas y protección contra el estrés. (Caldas *et al.*, 1998).

En el caso de *Salinibacter ruber* se sabe que cumple con la misma función en la síntesis de proteínas y probablemente también cumpla alguna función similar a las chaperoninas, lo que explicaría por que se ve sobre expresada al someterla a condiciones de estrés osmótico.

7.2.3. ARNt aspartato ligasa

Las aminoacil-ARNt sintetisas son enzimas que catalizan una reacción clave en la biosíntesis de proteínas, haciendo coincidir a cada uno de los 20 aminoácidos con el código genético, uniéndolos específicamente a sus adaptadores, transfiriendo moléculas de ARN (ARNt).

La aspartil-ARNt sintetasa tiene la capacidad de aspartilar no solo ARNt- Asp (ácido aspártico) si no también ARNt-Asn (asparagina), llevando a cabo una reacción que se desarrolla en dos pasos: $ATP + L\text{-aspartato} + \text{ARNt}^{\text{Asx}} \rightarrow AMP + \text{difosfato} + L\text{-aspartil-ARNt}^{\text{Asx}}$, que se describe como la activación del ácido aspártico por el ATP para formar Asp-AMP (adenosín monofosfato), que luego se transferirá a la ribosa terminal del ARNt para unir al aminoácido

con su correspondiente ARNt que será llevado al ribosoma para la síntesis de proteínas. (Arnez y Moras, 2009; UniProt Consortium, 2019).

Esta proteína resulta importante para *S. ruber* ya que como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de haloadaptación que utiliza, hace que sus proteínas tengan mayor porcentaje de aminoácidos con carga negativa, que de acuerdo con Paul y colaboradores, viene determinado desde el genoma, que los organismos halófilos en comparación con organismos no halófilos, tienen una mayor frecuencia de dinucleótidos GA, CA y CT en la primera y segunda posición del codón, lo que refleja un requerimiento para aminoácidos ácidos, como el Aspartato, Glutamato, Treonina y Valina. (Paul *et al.*, 2008).

7.2.4. Proteína ribosomal 50S L-21

La proteína L21 forma parte de la estructura del ribosoma. Este tipo de proteínas junto con el ARN forman a las subunidades del ribosoma, las cuales están involucradas en el proceso de traducción de las proteínas. Esta proteína se une al ARN 23s en presencia de la proteína L20. El ARN 23s, es un componente de la subunidad 50s de los ribosomas de los procariotas. En el caso de esta proteína no existe suficiente información que nos pueda indicar que función lleva a cabo ni como podría relacionarse su sobreexpresión con la respuesta de la bacteria a las condiciones de estrés salino.

7.2.5. Malato deshidrogenasa

La malato deshidrogenasa es una enzima que se encarga de catalizar la reacción de oxidación reversible de malato a oxalacetato utilizando NAD^+ como aceptor de electrones (UniProt Consortium, 2019). Esta reacción parte de distintas vías metabólicas, como en el ciclo del ácido cítrico, el proceso metabólico del ácido carboxílico, el ciclo del ácido tricarbóxico y el proceso metabólico de carbohidratos.

En el ciclo del ácido cítrico, la malato deshidrogenasa se encarga de catalizar la regeneración de oxalacetato. Esta reacción se produce por medio de la oxidación del grupo hidroxilo del malato y la reducción del NAD^+ . La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera: (S)-

malato + NAD⁺ = H⁺ + NADH + oxalacetato. En la gluconeogénesis o síntesis de glucosa. La enzima piruvato carboxilasa actúa sobre el piruvato para formar oxalacetato.

De igual manera en el ciclo del ácido tricarboxílico se cataliza la reacción de malato a oxalacetato, el cual se combina con el grupo acetilo del acetil coenzima A para formar citrato (Mathews *et al.*, 2013; Caspi *et al.*, 2014). Esta proteína está presente en todos los organismos aerobios, incluyendo a los procariotas halófilos.

En un estudio realizado sobre la MDH de la arquea halófila *H. salinarum*, se describió a la proteína como extremadamente halófila debido a que la concentración de sal requerida para el mantenimiento de su actividad enzimática es mucho mayor que las concentraciones normalmente asociadas con los cofactores enzimáticos y en ausencia de sales su actividad se inactiva. También establecen que la malato deshidrogenasa halófila es estable a 20 °C en disoluciones de NaCl de entre 2.5 a 5.0 M, pero por debajo de los 2.5 M se lleva a cabo una inactivación dependiente del tiempo paralela a cambios estructurales. Esto quiere decir que al reducir la salinidad la enzima puede sufrir cambios conformacionales mínimos como cambios en su forma molecular, disgregación o aumento en el volumen específico, pero al aumentar nuevamente la salinidad a condiciones óptimas, la enzima puede reactivarse. (Holmes y Halvorson, 1965). Tiempo después en otro estudio volvieron a aislar a la enzima a partir de bacterias extremadamente halófilas para conocer su estructura, y observaron que la composición de aminoácidos de MDH halófila es muy similar a la de otras proteínas halófilas, es decir, que tiene una mayor proporción de aminoácidos con carga negativa en comparación con la misma proteína, pero de organismos no halófilos, lo cual relacionan a la capacidad que tiene la enzima de asociarse con cantidades inusualmente grandes de agua y sales (Mevarech *et al.*, 1977).

7.2.6. Citocromo c oxidasa

La enzima citocromo c oxidasa o complejo IV es una proteína transmembrana presente en la cadena respiratoria en todos los organismos aerobios y aerobios facultativos; En las bacterias, se encuentra ubicada en la bicapa lipídica. Se trata de una enzima de la cadena de transporte de electrones que cataliza una reacción de reducción de oxígeno al recibir un electrón de cada citocromo c, estos electrones los transfiere a una molécula de oxígeno, que se reduce formando

dos moléculas de agua: $4 \text{Fe}^{+2}\text{citocromo c} + \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ = 4 \text{Fe}^{+3}\text{citocromo c} + 2 \text{H}_2\text{O}$ (UniProt Consortium, 2019). Por cada par de electrones que se transporta a partir del complejo, se translocan dos protones hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que utiliza la enzima ATP sintasa para sintetizar ATP (Mathews *et al.*, 2013).

De acuerdo a la secuencia genómica de *S. ruber*, esta posee una cadena respiratoria que contiene citocromo c. La comparación de proteínas de la cadena respiratoria de *S. ruber* indicó que hay dos grupos de genes de la subunidad I y II de la citocromo c oxidasa, en el primero están *coxA1* y *CoxB1* que están relacionados con los de *R. marinus*; mientras que en el segundo, *coxB2* y *coxA2* están relacionados con sus homólogos haloarqueales. También posee componentes de una citocromo c oxidasa del tipo *cbb3*, cuyas oxidasas tienen una afinidad muy alta por el O_2 , permitiendo que la respiración continúe aún con niveles bajos de O_2 . Esto se considera una adaptación compartida a las condiciones microoxicas a menudo asociada con la hipersalinidad (Antón *et al.*, 2002); ya que cuando la sal aumenta en un medio, el oxígeno disuelto disminuye.

8. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos hasta el momento se puede inferir que si hay cambios en la abundancia de la expresión de las proteínas de *Salinibacter ruber* al exponerla a medios con distinta salinidad atribuible no solo a la concentración molar salina sino también a la naturaleza química de la sal en cuestión.

Cuando se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se logró observar que hay una diferencia en la cantidad total de proteínas (41347.15 μg) que resalta en la condición de 1.7 M de NaCl de la cantidad total de proteína de las demás condiciones, que oscilan entre 70799.53 y 79490.78 μg . Así como una diferencia menos significativa pero no menos importante en la condición de 0.5 M Na₂SO₄ / 1.0 M MgSO₄ con una cantidad total de proteína de 61049.15 μg . En un principio estos resultados indican que si hay un cambio en la expresión de proteínas de *S. ruber* en estas condiciones que le ocasionan estrés al disminuir la concentración de NaCl o aumentar la concentración de sales sulfatadas. Sin embargo, no es posible conocer con exactitud a las proteínas que presentan esos cambios, ya que no se tienen los resultados del análisis masivo de proteínas.

Es por ello, que se presentan los resultados hipotéticos de un análisis masivo de proteínas en el que se utilizan etiquetas isobáricas. Con este estudio hipotético es posible proponer algunas proteínas cuya expresión cambia y además proponer la abundancia con la que se expresan en cada condición experimental de interés. De esta manera es más sencillo comentar cuáles son las proteínas que están respondiendo a los cambios en la composición y concentración salina. Además, permite evidenciar que la técnica propuesta permite conocer a los aminoácidos que conforman a esas proteínas con expresiones diferenciadas, información que también es útil para comparar los cambios conformacionales de estas proteínas con las de otros organismos, y conocer con más detalle sus funciones y su estrategia de adaptación.

A partir del análisis de los resultados hipotéticos propuestos para el análisis masivo de proteínas, se puede comentar que *S. ruber* posee una eficiente respuesta a las fluctuaciones de salinidad externa, que la fuerzan a combinar diferentes estrategias que le confieren una ventaja adaptativa que le permite seguir desarrollándose en condiciones de estrés salino. Por ejemplo, con la disminución de la salinidad (condición 2.2 M de NaCl) y en ausencia de MgSO₄ (0.5 M de Na₂SO₄) *S. ruber* responde aumentando la producción de proteínas como chaperonas, un

factor de elongación y enzimas catalizadoras. Entidades que tienen un papel fundamental en la biosíntesis de proteínas. También en este caso, la enzima malato deshidrogenasa que normalmente participa en procesos metabólicos, se inactivó, es decir dejó de producirse cuando la bacteria se expuso a la condición mínima de salinidad (1.7 M NaCl). Lo que podría indicar que, en concentraciones muy bajas de sal, la bacteria podría verse afectada en sus procesos metabólicos, produciendo menos energía; esto también podría explicar por qué en algunas condiciones como 1.7 M NaCl, la bacteria presenta una fase lag más prolongada, es decir, tarda más en crecer.

En el caso del aumento de la salinidad, se puede observar a proteínas como citocromo c oxidasa, que, de acuerdo con la información citada, podría ayudarle a *S. ruber* a adaptarse a la disminución de oxígeno relacionada con la hipersalinidad, permitiendo que continúe con su vía respiratoria aun con niveles bajos de O₂.

Estos hallazgos, aunque basados en resultados simulados, pero sustentados en bibliografía existente sobre el tema, permiten tener una visión más amplia de como *S. ruber* podría adaptarse funcionalmente a las diferentes condiciones salinas de interés, por lo que se podría también realizar propuestas de cómo se adaptaría en el océano de agua líquida del satélite Europa en lo que respecta a salinidad.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto, se pueden proponer algunos temas que permitirían ampliar el conocimiento que se tiene sobre la capacidad de *Salinibacter ruber* para adaptarse a escenarios con condiciones salinas extremas, así como a otras variables como temperatura, radiación, presión, pH, etc. y conocer con mayor certeza como se adaptaría esta bacteria a escenarios como el océano subsuperficial del satélite Europa, tomando en cuenta los factores mencionados.

Se sugiere estudiar con mayor detalle los resultados del análisis proteómico de *Salinibacter ruber* para conocer que otras proteínas estarían involucradas en su adaptación a las diferentes condiciones salinas ensayadas. Así como entender cuál es la función de esas proteínas y analizar cómo se relacionan con su proceso de haloadaptación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas. *Proteómica*, 16-35.
- Abián, J., Gay, M., & Carrascal, M. (2014). Estrategias en proteómica de alto rendimiento (high throughput). Caracterización de proteomas. LC-MS/MS. FDR. En F. Corrales, & J. J. Calvete, *Manual de proteómica* (págs. 615-636). Sociedad española de proteómica.
- Anderson, J. D., Schubert, G., Jacobson, R. A., Lau, E. L., Moore, W. B., & Sjogren, W. L. (1998). Europa's differentiated internal structure: inferences from four Galileo encounters. *Science (New York, N. Y.)*, 281(5385), 2019-2022. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2019>
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., & Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 2), 485-491. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-485>
- Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., & Rosselló-Mora, R. (2008). Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-15>
- Arnez, J. G., & Moras, D. (2009). Aminoacyl-t RNA Synthetases. In *eLS*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000530.pub2>
- Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Boichenko, V. A., Antón, J., Wang, J. M., & Lanyi, J. K. (2005). Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5743), 2061-2064. <https://doi.org/10.1126/science.1118046>
- Balashov, S. P., & Lanyi, J. K. (2009). Study of Xanthorhodopsin, the Retinal-Protein Proton Pump of *Salinibacter ruber* with Light-Harvesting Carotenoid Antenna. University of California, Irvine.
- Barnett, A. (2021). Solar System Exploration: Europa ocean moon | in depth. Recuperado en noviembre de 2021, de NASA Science: <https://solarsystem.nasa.gov/moons/jupiter-moons/europa/in-depth/>
- Biosystems, A. (s.f.). *Multiplex protein quantitation using iTRAQ reagents - 8 plex*. Recuperado el Octubre de 2020, de Applied Biosystems: <http://www.appliedbiosystems.com>
- Brock, T. D. (1979). Ecology of saline lakes. *Strategies of microbial life in extreme environments*. (M. Siloh, Ed.). 29-47.
- Brown, M. E., & Hand, K. P. (2013). Salts and radiation products on the surface of Europa. *The Astronomical Journal*, 145(4), 110-117. <https://doi.org/10.1088/0004-6256/145/4/110>
- Caldas, T. D., El Yaagoubi, A., & Richarme, G. (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11478-11482. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11478>
- Carlson, R. W., Johnson, R. E., & Anderson, M. S. (1999). Sulfuric acid on Europa and the radiolytic sulfur cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5437), 97-99. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.97>
- Casado-Vela, J., Martínez-Esteso, M. J., Rodríguez, E., Borrás, E., Elortza, F., & Bru-Martínez, R. (2010). iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range. *Proteomics*, 10(2), 343-347. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900509>
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P., & Karp, P. D. (2014). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D459-71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>
- Cazzulo, J. J. (2014). De la Genómica a la Proteómica. En F. Corrales, & C. J. J., *Manual de Proteómica* (págs. 13-20). Argentina: Sociedad Española de Proteómica.

- Chen, L., & Sigler, P. B. (1999). The crystal structure of a GroEL/peptide complex. *Cell*, 99(7), 757–768. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81673-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81673-6)
- Chyba, C. F., & Phillips, C. B. (2002). *Origins of Life and Evolution of the Biosphere: The Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 32(1), 47–67. <https://doi.org/10.1023/a:1013958519734>
- Clare, D. K., Vasishtan, D., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G. W., Topf, M., Horwich, A. L., & Saibil, H. R. (2012). ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell*, 149(1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.047>
- Cockell, C. S., Bush, T., Bryce, C., Direito, S., Fox-Powell, M., Harrison, J. P., Lammer, H., Landenmark, H., Martin-Torres, J., Nicholson, N., Noack, L., O'Malley-James, J., Payler, S. J., Rushby, A., Samuels, T., Schwendner, P., Wadsworth, J., & Zorzano, M. P. (2016). Habitability: A review. *Astrobiology*, 16(1), 89–117. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1295>
- Demirjian, D. C., Morís-Varas, F., & Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 144–151. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00183-6)
- Echavarría, M. C. (2019). Estudio de la haloadaptación de *Salinibacter ruber* ante condiciones que simulan el océano del satélite Europa. Morelos, Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., & Georgopoulos, C. (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1379–1385. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1379-1385.1989>
- Fernández, V. V. (2016). *Desarrollo de herramientas bioinformáticas para estudios de proteómica a gran escala de *Candida albicans**. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Microbiología, Madrid.
- Fernández-Lainez, C., Vela-Amieva, M., & Ibarra-González, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 30(5), 258–263. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=423640319005>
- Fleming, P. J., & Richards, F. M. (2000). Protein packing: dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition. *Journal of Molecular Biology*, 299(2), 487–498. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3750>
- Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–3685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401031>
- Greenberg, R. (2002). Tides and the Biosphere of Europa: A liquid-water ocean beneath a thin crust of ice may offer several habitats for the evolution of life on one of Jupiter's moons. *American Scientist*, 90(1), 48–55. <http://www.jstor.org/stable/27857596>
- Hand, K. P., & Carlson, R. W. (2015). Europa's surface color suggests an ocean rich with sodium chloride: Sodium chloride on Europa's surface. *Geophysical Research Letters*, 42(9), 3174–3178. <https://doi.org/10.1002/2015gl063559>
- Hand, K. P., & Chyba, C. F. (2007). Empirical constraints on the salinity of the European ocean and implications for a thin ice shell. *Icarus*, 189(2), 424–438. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2007.02.002>
- Hand, K. P., Carlson, R. W., & Chyba, C. F. (2007). Energy, chemical disequilibrium, and geological constraints on Europa. *Astrobiology*, 7(6), 1006–1022. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0156>
- Harding, T., Roger, A. J., & Simpson, A. G. B. (2017). Adaptations to high salt in a halophilic protist: Differential expression and gene acquisitions through duplications and gene transfers. *Frontiers in Microbiology*, 8, 944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00944>
- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL-GroES chaperonin machine: A nanocage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>

- Holmes, P. K., & Halvorson, H. O. (1965). Properties of a purified halophilic Malic dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 90(2), 316–326. <https://doi.org/10.1128/jb.90.2.316-326.1965>
- Hough, D. W., & Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)80008-8](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)80008-8)
- Hunter, S. E., & Spremulli, L. L. (2004). Interaction of mitochondrial elongation factor Tu with aminoacyl-tRNAs. *Mitochondrion*, 4(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.04.003>
- Javaux, E. J. (2006). Extreme life on Earth—past, present and possibly beyond. *Research in Microbiology*, 157(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.008>
- Kargel, J. S., Kaye, J. Z., Head, J. W., III, Marion, G. M., Sassen, R., Crowley, J. K., Ballesteros, O. P., Grant, S. A., & Hogenboom, D. L. (2000). Europa's crust and ocean: Origin, composition, and the prospects for life. *Icarus*, 148(1), 226–265. <https://doi.org/10.1006/icar.2000.6471>
- Khurana, K. K., Kivelson, M. G., Stevenson, D. J., Schubert, G., Russell, C. T., Walker, R. J., & Polansky, C. (1998). Induced magnetic fields as evidence for subsurface oceans in Europa and Callisto. *Nature*, 395(6704), 777–780. <https://doi.org/10.1038/27394>
- Kivelson, M. G., Khurana, K. K., Russell, C. T., Volwerk, M., Walker, R. J., & Zimmer, C. (2000). Galileo magnetometer measurements: a stronger case for a subsurface ocean at Europa. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5483), 1340–1343. <https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1340>
- Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38(3), 272–290. <https://doi.org/10.1128/br.38.3.272-290.1974>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos* (14th ed.). Madrid, España: Pearson Education.
- Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2012). *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and of *Salinibacter ruber*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 7), 1521–1527. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.031971-0>
- Marcotte, E. M. (2007). How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? *Nature Biotechnology*, 25(7), 755–757. <https://doi.org/10.1038/nbt0707-755>
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Bioquímica* (4ta ed.). Pearson.
- McCord, T. B., Hansen, G. B., Fanale, F. P., Carlson, R. W., Matson, D. L., Johnson, T. V., Smythe, W. D., Crowley, J. K., Martin, P. D., Ocampo, A., Hibbitts, C. A., Granahan, J. C., & the NIMS Team. (1998). Salts on Europa's surface detected by Galileo's Near Infrared Mapping Spectrometer. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5367), 1242–1245. <https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1242>
- McCord, T. B., Hansen, G. B., Matson, D. L., Johnson, T. V., Crowley, J. K., Fanale, F. P., Carlson, R. W., Smythe, W. D., Martin, P. D., Hibbitts, C. A., Granahan, J. C., & Ocampo, A. (1999). Hydrated salt minerals on Europa's surface from the Galileo near-infrared mapping spectrometer (NIMS) investigation. *Journal of Geophysical Research*, 104(E5), 11827–11851. <https://doi.org/10.1029/1999je900005>
- Mevarech, M., Eisenberg, H., & Neumann, E. (1977). Malate dehydrogenase isolated from extremely halophilic bacteria of the Dead Sea. 1. Purification and molecular characterization. *Biochemistry*, 16(17), 3781–3785. <https://doi.org/10.1021/bi00636a009>
- Miranda Blancas, R. (2015). Estudio de las estrategias de adaptación de *Salinibacter ruber* en escenarios de interés astrobiológico. Cuernavaca, Morelos, México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Daugherty, S., Deboy, R. T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D. A., Papke, R. T., Sanchez Perez, G., Sharma, A. K., Nesbø, C. L., MacLeod, D., Bapteste, E., Doolittle, W. F., Charlebois, R. L., Legault, B., & Rodriguez-Valera, F. (2005). The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18147–18152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509073102>

- Morales Sanchez , D., & Gallo Ramírez , L. E. (2006). *Plataformas de proteómica*. UNAM. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2009). *Lehninger principios de bioquímica* (5a. ed.). Omega.
- Oren, A. (2006). Life at high Salt Concentrations. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt , *The Prokaryotes* (págs. 263-282). New York, NY, USA: Springer.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4(2). <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>
- Oren, A. (2013). Salinibacter: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiology Letters*, 342(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12094>
- Oren, A., & Rodríguez-Valera, F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 123-130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00832.x>
- Oren, A., Haldal, M., Norland, S., & Galinski, E. A. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, 6(6), 491–498. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0286-3>
- Orlando, T. M., McCord, T. B., & Grieves, G. A. (2005). The chemical nature of Europa surface material and the relation to a subsurface ocean. *Icarus*, 177(2), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2005.05.009>
- Oueriaghli, N. (2013). *Estudio de la diversidad procariota en ambientes salinos empleando técnicas moleculares*. Granada, España: Universidad de Granada.
- Pando Robles, V., & Ferreira Batista, C. (2007). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología*, 14, 97-108.
- Paul, S., Bag, S. K., Das, S., Harvill, E. T., & Dutta, C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology*, 9(4), R70. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r70>
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology* (5th ed.). USA: The Mc Graw - Hill Companies.
- Ramírez, N. D., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71. ISSN: 1870-0195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>
- Ramírez, S. (2009). Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos. *Inventio*, 57-66.
- Ramírez, S. I., & Terrazas, H. (2006). Astrobiología, una nueva disciplina científica. *Inventio*, 45-56.
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(3), 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Rauniyar, N., & Yates, J. R., III. (2014). Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 5293–5309. <https://doi.org/10.1021/pr500880b>
- Rhodes, M., Spear, J., Oren, A., & House, C. (2011). Differences in lateral gene transfer in hypersaline versus thermal environments. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 199. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-199>
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Roessler, M., & Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental microbiology*, 3(12), 743–754. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00252.x>
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhász, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., & Pappin, D. J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 3(12), 1154–1169. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>

- Rubiano, C. (2014). *Análisis comparativo de la expresión de proteínas de Tistlia consotensis en respuesta a cambios en la salinidad externa*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., Beechem, J. M., Xu, Z., Sigler, P. B., & Horwich, A. L. (1997). Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*, 388(6644), 792–798. <https://doi.org/10.1038/42047>
- Arevalo-Ferro, C., Sanchez de Gomez, M., Umaña-Pérez, A., Sandoval-Usme, M. C., & Vallejo-Pulido, A. F. (2009). LA PROTEOMICA EN LA ERA POSTGENOMICA. *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), 19–30. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiolo/article/view/9222>
- Showman, A. P., & Malhotra, R. (1999). The Galilean satellites. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5437), 77–84. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.77>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de analisis instrumental* (6ta ed.). Cengage Learning.
- Souza, V., Escalante, A., Espinoza, L., & Valera, A. (2004). Cuatro Ciénegas, un laboratorio natural de Astrobiología. *Ciencias*, 75, 4-12.
- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K. A., & Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>
- Torrades, S. (2004). Proteómica: el diseño molecular de la vida. *Offarm*, 23(4), 126-130.
- Trumbo, S. K., Brown, M. E., & Hand, K. P. (2019). Sodium chloride on the surface of Europa. *Science Advances*, 5(6), eaaw7123. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7123>
- Vaudel, M., Sickmann, A., & Martens, L. (2012). Current methods for global proteome identification. *Expert Review of Proteomics*, 9(5), 519–532. <https://doi.org/10.1586/epr.12.51>
- Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C., & Marquez, M. C. (2008). Halophilic and halotolerant microorganisms from soils. En *Microbiology of Extreme Soils* (pp. 87-115). Springer Berlin Heidelberg.
- Viver, T., Orellana, L., González-Torres, P., Díaz, S., Urdiain, M., Farías, M. E., Benes, V., Kaempfer, P., Shahinpei, A., Ali Amoozegar, M., Amann, R., Antón, J., Konstantinidis, K. T., & Rosselló-Móra, R. (2018). Genomic comparison between members of the Salinibacteraceae family, and description of a new species of Salinibacter (*Salinibacter altiplanensis* sp. nov.) isolated from high altitude hypersaline environments of the Argentinian Altiplano. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(3), 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.12.004>
- Vu, T. H., Hodyss, R., Choukroun, M., & Johnson, P. V. (2016). Chemistry of frozen sodium–magnesium–sulfate–chloride Brines: Implications for surface expression of Europa’s ocean composition. *The Astrophysical Journal. Letters*, 816(2), L26. <https://doi.org/10.3847/2041-8205/816/2/L26>
- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., & Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 14(1), 61–65. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>
- Williamson, B., & Nimkar, S. (2008). *Identification and quantitation of proteins using mass spectrometry-based peptide multiplex labelling methods*. Recuperado el mayo de 2019, de Spectroscopy europe: <https://www.spectroscopyeurope.com/article/identification-and-quantitation-proteins-using-mass-spectrometry-based-peptide-multiplex>

Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C., & Yates, J. R., 3rd. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, *113*(4), 2343–2394.
<https://doi.org/10.1021/cr3003533>

Cuernavaca, Morelos a 8 de diciembre de 2021

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

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **MELISSA SEMIRAMIS FANDIÑO MIRANDA**, con el título del trabajo: **Estudio proteómico de *Salinibacter ruber* ante diferentes condiciones salinas.**

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

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

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO
RAMÍREZ

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

VOCAL: DRA. SANDRA IGNACIA RAMÍREZ JIMÉNEZ

SUPLENTE: DRA. LILIA MONTOYA LORENZANA

SUPLENTE: DRA. JOSEFINA VERGARA SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-12-09 17:30:58 | Firmante

yXnws0Zxfvfa1EYhrrejOrWjsptaKRjWatbhsyPK2i50HrrGnEmOXC19CeQ9GbiDQmY9pOIR1bA4iobTDwhLamrHqp2XITQ+qiN8FliJC51TcVIVsfkEAobBhoCzNe+/CASfhmCkmryh9HoWIBLWvYLT9Yv2+jLjwiBLPRsEocuRY7MfcnyIMRDWhK5icTC2TTiFrhR8C4Qfzw/qhF04oUZMfRkcCbWqMqO+zhB8lOehqPUTop6Hf2RBpsraDut1MRITULC2HPhd429xTSu3kUI5pmk/yI6bERYIZOp5xqAAclqUGHqxENbUHE8INSaLzL4/PxuHMXSdUt6x1nnA==

SANDRA IGNACIA RAMIREZ JIMENEZ | Fecha:2021-12-09 19:31:35 | Firmante

UH32Vv82IVQExY77db6lOndWXqPoLQDR+eswi1G7QufvZkVF6muT0B6SZ2DLTjdmVLOBrcEfvOlhn93lvyX03ouGfwoHMzJGTN9PJYht2neFGF+2rGfccggI7jfwA66J/OUP8ELAFweX9lHXQg8lyv+19d+h4iUG5Tf5SCG6Ghf+SlrDE5qpzKDGagTch/FLpAZVh/SqxGUWckew8YtyVWCpsRkuP/XwuvvMHLErSpMATrJYyKa+9ohsIGrf0XTGEy8iOD849x6/H0lXn6OK06BcAOC3yyNncp8RmNyZLiR00QjhT0v0oGnXWtQa/0QZzZAGAR4cu2KkOA4Fh4XsA==

JOSEFINA VERGARA SANCHEZ | Fecha:2021-12-09 20:48:24 | Firmante

NgOucyslFm6LIGoGgJtzucjd4hnsBQDeNVPW6XOBHT7v3ZAO0mDJfcWEryXBInhv4N4pPam/hZDs/wowVDj38bf2ltWHZP4jVF86dS6hYjIN0ZTBnM+bqAtU4cDb7Z3FlhZsiqVA1bAgLpKtpsLQMEUk+5XJBipFICR0xtqLZ9K0bfr+HWpQRsrAPMCAZIO6U71fL9nVx8yUZ60UvKZpeGa5sUvqWwB0MwChCbOErM8N47iwEOBonltkjm1saRodl1/Bzn8bdDWnAN+OmOBoPvFKF7EHPkQ3+xEBaFAlTgHCukkuHsqNva8YSgbCh1jVW4V39VDcpBpgV9gUcZTGw==

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2021-12-09 21:56:46 | Firmante

UT0magSM1Q/O2RE2UjoIPIHUS7cBicN+LihCjnHRne6NwZc/1lkgivMPpLGlcXeHKHZkGhCh5VSU7J4nzgzbU4ZHdX+7A/A0EGwF/tdf/eQ/EipL8n7x9P9LbGBcflHaXSPcTfoClO3k/bZl6cKeKv8wDwBjvUkDL8EaiyhCe5aKUOLjp6xXCIUCG1DPKG4r0zuHbf19p1JB9LS8i2TYTfwbQwSbJ7nBags+FZef5KgUmVQ8lzgVWxTSqrFN6PCFNrbLzQbdtkCWulbssw9yWinn3XLN6Kq4RyORRw7GswuqwcWOyITPVPX3ufPRj4u5+vYJavMVuZVcx4qXw==

LILIA MONTOYA LORENZANA | Fecha:2021-12-10 15:09:49 | Firmante

zZmFillm6JUMl8WXtdtW/zBvNdtDX1PAHFTaddDnEuFGEvr9tEkxAdq0GMnbGkysgSjXlt6R00T401C9OabAy94aQ/3DapwGnM6uKSYqTwpNYzBKuWZ6EbPlx0iWsi9teAtMEYBdU8ht2Lykl4NyQvkNPVAJtnWK7F7uQ/SrZgeXP5tFuscwZvPZYOmwsu0RHgqHPK47ywBYU+hZ/e0wELt9wPUJYGiFR0ZKDSBLT5ju3T1KEnChxxu40O9aH5W0uFdgYvdk3jX/W4NMl9pyKQFyF0ukZiDwKuio5ZjjV8Vbp+j7lBs4PqKJdOgt2bKdFRlVwvcuxht2BMyC057zdJw==

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



56euVr8jg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ORM8bluHVMCsod13uh3xa96seVklrN4A>

