



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Filogenómica para el estudio de la diversidad química de
metabolitos secundarios con actividad antiAGEs: el caso del 2,4-
diacetilfloroglucinol de *Pseudomonas* endófitas de *Piper auritum*”**

Tesis que presenta

Karina Gabriela Gutiérrez García

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de Tesis: **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera**
Dr. Francisco Barona Gómez

CDMX, México.

Agosto 2017

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico (No. De Registro 250617) brindado para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. Introducción	10
1.1. Diabetes mellitus: Una enfermedad a nivel mundial	11
1.2. Fitoterapia: Uso de plantas medicinales en la medicina tradicional	13
1.3. Microorganismos endófitos: Una fuente de metabolitos secundarios	14
1.3.1. El género de <i>Pseudomonas</i> y su capacidad de síntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol	15
1.4. Descubrimiento de metabolitos secundarios a través del uso de la genómica	18
1.4.1. Filogenómica: Una poderosa herramienta subutilizada	19
2. Justificación	21
3. Objetivos	23
3.1. General	24
3.2. Específicos	24
4. Materiales y métodos	25
4.1. Medios de cultivo	26
4.2. Identificación taxonómica de cepas endófitas bacterianas de <i>P. auritum</i>	26
4.2.1. Extracción del DNA genómico bacteriano (DNAg)	26
4.2.2. Amplificación de las secuencias conservadas rRNA 16S y <i>rpoB</i> de las bacterias endófitas	26
4.2.3. Análisis filogenético basado en la secuencia rRNA 16S y <i>rpoB</i>	27
4.3. Filogenómica	28
4.3.1. Secuenciación, ensamble, anotación y minería genómica de los genomas bacterianos.	28
4.3.2. Análisis filogenómicos	28
4.4. Aislamiento y purificación del compuesto con actividad antiAGEs	28
4.4.1. Cultivo masivo de la cepa <i>P. protegens</i> PA12	29
4.4.2. Purificación de EPA12 y obtención del compuesto	30
4.4.2.1. Identificación del 2,4- diacetilfloroglucinol (DAPG) (1)	33
4.4.2.2. Identificación de ácidos grasos por análisis de GC-MS/MS	33
4.5. Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la actividad antiAGEs	33
4.5.1. Obtención del extracto orgánico de cultivo bacteriano	33
4.5.1.1. Modelo BSA-Glucosa	34
4.5.1.2. Ensayo de hidroxilación del benzoato	34
4.5.1.3. Ensayo de frutosamina	35
4.5.1.4. Ensayo de MGO	35
5. Estrategia experimental	36
6. Resultados y discusión	38
6.1. Capítulo I: Selección e identificación de las cepas endófitas de <i>P. auritum</i>	39
6.2. Capítulo II: Análisis genómico de las <i>Pseudomonas</i> endófitas de <i>P. auritum</i>	44
6.3. Capítulo III: Distribución a nivel genómico del clúster de genes biosintéticos del DAPG (genes <i>phl</i>) y su historia evolutiva	47

6.4. Capítulo IV: Aislamiento e identificación del metabolito secundario con actividad antiAGEs por técnicas químicas	55
6.5. Capítulo V: Actividad antiAGEs y su mecanismo de acción del DAPG y sus congéneres	59
7. Conclusiones	63
8. Perspectivas	65
9. Bibliografía	67
10. Anexos	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el género de <i>Pseudomonas</i> (Gross y Loper, 2009).	16
Tabla 2. Tamizaje químico y biológico de los endófitos bacterianos de <i>P. auritum</i> .	43
Tabla 3. Características de los genomas de <i>Pseudomonas</i> endófitas de <i>P. auritum</i> .	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glicación de proteínas.	12
Figura 2. Fraccionamiento del extracto orgánico EPA12.	32
Figura 3. Árbol filogenético de las bacterias endófitas de <i>P. auritum</i> un segmento de la región que codifica para el RNA ribosómico 16S (rRNA 16S).	41
Figura 4. Árbol de especies del género de <i>Pseudomonas</i> basado en la secuencia conservada <i>rpoB</i> .	42
Figura 5. Estructuras químicas de metabolitos secundarios citados en este estudio.	46
Figura 6. Árbol filogenético de especies del género de <i>Pseudomonas</i> construido con una matriz concatenada de siete proteínas (RpoD, GyrB, AcnB, PFK, GAP, PGI y RpoB) señalando el clúster biosintético <i>phl</i> .	49
Figura 7. Reconstrucción filogenética basada en las proteínas ortólogas definidas por el clúster biosintético <i>phl</i> .	50
Figura 8. Diferentes rutas de síntesis del DAPG.	53
Figura 9. Ruta hipotética de la síntesis del OH-FA.	54
Figura 10. Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs de cada fracción obtenida en cada etapa de fraccionamiento del EPA12 por CC, determinado a través del modelo BSA-Glucosa (Brownlee <i>et al.</i> , 1995).	55
Figura 11. Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs de las siete fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de PA12-2.2.2.2 por TLC semipreparativa, determinado a través del modelo BSA-Glucosa (Brownlee <i>et al.</i> , 1995).	57
Figura 12. Evaluación de la actividad antiAGEs del DAPG, sus congéneres, sus posibles mezclas, y los ácidos grasos identificados previamente.	60
Figura 13. Mecanismos de inhibición de la formación de AGEs mediados por el DAPG y sus congéneres.	62

ANEXOS

Anexo I. Profundidad de las librerías pertenecientes al género de <i>Pseudomonas</i> endófitas de <i>P. auritum</i> antes y después de su edición a través de Trimmomatic 0.32.1	73
Anexo II. Ensamble del genoma PA1	74
Anexo III. Ensamble del genoma PA11	76
Anexo IV. Ensamble del genoma PA12	77
Anexo V. Ensamble del genoma PA14	79
Anexo VI. Ensamble del genoma PA15	80
Anexo VII. Ensamble del genoma PA19	81
Anexo VIII. Ensamble del genoma PA25	82
Anexo IX. Ensamble del genoma PA26	83
Anexo X. Ensamble del genoma PA27	84
Anexo XI. Identificación del DAPG aislado del extracto orgánico de la cepa PA12 a través de GC-MS	86
Anexo XII. Identificación del DAPG aislado del extracto orgánico de la cepa PA12 a través de ESI-MS/MS (modo positivo)	87
Anexo XIII. Identificación de ácidos grasos por análisis de CG-MS	88
Anexo XVI. Análisis automático de la fracción PA12-2.2.2.2 que sugiere la presencia del OH-FA	89
Anexo XV. Genomas de <i>Pseudomonas</i> analizados	90
Anexo XVI. Versión expandida del árbol filogenético de especies del género de <i>Pseudomonas</i> usando una matriz concatenada de siete proteínas (RpoD, GyrB, AcnB, PFK, GAP, PGI y RpoB) señalando la presencia del clúster biosintético <i>phl</i>	91

RESUMEN

El 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (**1**) es un policétido de tipo fenólico producido por algunas especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas, el cual posee diversas actividades biológicas y funciones ecológicas. En este trabajo, se utilizó un análisis filogenómico para reconstruir la historia evolutiva del clúster de genes biosintéticos (genes *phl*) del DAPG. Para ello, se obtuvieron nueve genomas de *Pseudomonas* endófitas aisladas de la planta medicinal *Piper auritum*, estos genomas, se agregaron a una base de datos construida con cerca de 1500 genomas públicos de este género bacteriano. Curiosamente, sólo 29 organismos pertenecientes a seis especies de *Pseudomonas* contienen los genes *phl*. Además, la reconstrucción de la evolución del clúster *phl*, mostró claramente dos clados que se relacionan con la diversidad química en torno al DAPG. Por otro lado, el DAPG identificado en el extracto orgánico de una de las *Pseudomonas* endófitas, posee gran capacidad de inhibir la formación de los productos finales de glicación avanzada. En este contexto, el ácido 5-hidroxiferúlico (**2**), un isómero del DAPG, detectado durante el fraccionamiento dirigido por actividad, junto con otros congéneres, potenciaron la actividad inhibitoria del DAPG. Este trabajo provee un ejemplo sobre la relación directa entre la evolución genética de un clúster biosintético de genes que codifican la síntesis de un metabolito secundario y su diversidad química.

ABSTRACT

2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (**1**) is a phenolic polyketide produced by some plant-associated *Pseudomonas* species, with many biological activities and ecological functions. Here, we aimed at reconstructing the evolutionary history of DAPG using phylogenomics focused at its biosynthetic gene cluster or *phl* genes. In addition to around 1500 publically available genomes, we obtained and analyzed the sequences of nine novel *Pseudomonas* endophytes isolated from the medicinal plant *Piper auritum*. We found that only 29 organisms belonging to six *Pseudomonas* species contain the *phl* genes at different frequencies depending on the species. The evolution of the *phl* genes was then reconstructed leading to at least two clades postulated to correlate with the known chemical diversity surrounding DAPG biosynthesis. Moreover, one of the newly obtained *Pseudomonas* endophytes with high antiAGEs activity were shown to exert their inhibitory activity against the formation of advanced glycation end-products, via DAPG and related congeners. Indeed, its isomer 5-hydroxy-ferulic acid (**2**) inferred during bioactivity-guided fractionation, together with other DAPG congeners, was found to enhance the detected inhibitory activity. This report provides evidence of a link between the evolution and chemical diversity of DAPG and congeners.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus: Una enfermedad a nivel mundial

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica-degenerativa cuya incidencia y prevalencia ha ido en aumento en los últimos años a nivel mundial, siendo las complicaciones asociadas con la diabetes la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos (Giardino *et al.*, 1994). La DM es un trastorno metabólico que resulta de un defecto en la secreción o la acción de la insulina endógena. La deficiencia de insulina conduce a la hiperglucemia crónica, condición que ha sido asociada con una alta incidencia de daños micro y macrovasculares que afectan a la retina, riñones, sistema nervioso, entre otros; representando la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos (Giardino *et al.*, 1994). Muchas de estas complicaciones se han vinculado con la glicación de las proteínas, la cual es el primer paso de una serie de reacciones posteriores que genera compuestos fluorescentes, en su mayoría, inestables y reactivos, conocidos como productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Yamagishi *et al.*, 2012).

La glicación de proteínas implica una reacción no enzimática reversible entre el grupo amino de la proteína con el carbonilo de la glucosa para formar bases de Schiff, compuestos inestables que por reordenación espontánea forman productos de Amadori. Los productos de Amadori, son compuestos estables que pueden transformarse en AGEs a través de una serie de reacciones irreversibles vía la formación de intermediarios dicarbonilos altamente reactivos (McCance *et al.*, 1993). El glioxal y el metilglioxal (MGO), son otra fuente adicional para la formación de AGEs, los cuales se forman a menudo por la autooxidación de azúcares reductores. Sin embargo, la autooxidación de azúcares reductores no es la única fuente capaz de generar estos compuestos; el glioxal, también puede formarse como producto de la peroxidación de los lípidos. Mientras que el MGO se forma como un producto secundario de varias vías metabólicas. A partir de la 3-aminoacetona, un intermedio del catabolismo de treonina, así como a través de la peroxidación lipídica. (Yamagishi *et al.*, 2012) (Figura 1).

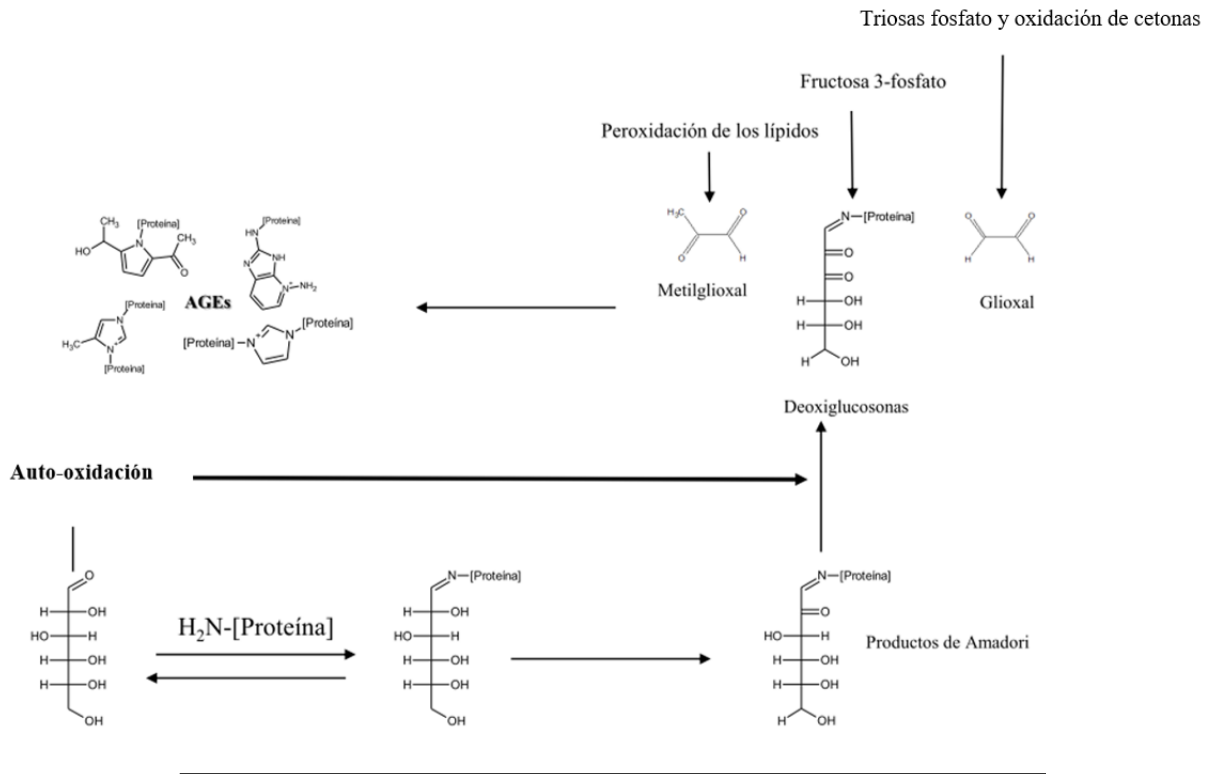


Figura 1. Uno de los principales mecanismos para la formación de AGEs es a través de la glicación de proteínas, una reacción no enzimática entre el grupo carbonilo de los azúcares reductores y el grupo amino de las proteínas. (McCance *et al.*, 1993).

Curiosamente, la acumulación de AGEs se ha asociado con el desarrollo de muchas complicaciones relacionadas con la DM, como la artritis, la aterosclerosis, la insuficiencia renal crónica, nefropatía, neuropatía y cataratas (Yamagishi *et al.*, 2012, Giardino *et al.*, 1994). Esto plantea la posibilidad de que la inhibición de la formación de AGEs podría prevenir el desarrollo de las complicaciones diabéticas.

En este contexto, compuestos sintéticos con actividad antiAGEs (i.e., aquellos que inhiben la formación de AGEs), tales como la aminoguanidina, piridoxamina, carnosina, ALT-711 (Alagebrium) y bromuro de fenil-tiazolio, han sido investigados en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Peyroux y Sternberg, 2006). La aminoguanidina, el compuesto más conocido y el más estudiado, fue descartado en la Fase III de ensayos clínicos por provocar efectos secundarios en humanos, tales como trastornos gastrointestinales, alteraciones en la función hepática, tumores renales, la producción de autoanticuerpos a las histonas y anemia (Vining, 1999). De igual forma, resultados fallidos se han obtenido con los otros compuestos mencionados (Peyroux y

Sternberg, 2006). Por otra parte, el uso de diferentes plantas medicinales ha sido quizá la alternativa más popular para el tratamiento de la DM.

1.2. Fitoterapia: Uso de plantas medicinales en la medicina tradicional

La fitoterapia (del griego *Phytos*, 'planta', 'vegetal' y *therapeia*, 'terapia') es el uso de productos de origen vegetal para la prevención, la curación o el alivio de una amplia variedad de síntomas y enfermedades. Se ha demostrado que las plantas medicinales tienen una gran capacidad de síntesis de compuestos con distintas actividades biológicas, denominados comúnmente metabolitos secundarios (Dahanukar *et al.*, 2000; Rates, 2001).

Una gran variedad de compuestos incluyendo floroglucinoles y ácidos cinámicos aislados de extractos de plantas medicinales, han mostrado una potente actividad antiAGEs (i.e., inhiben la formación de AGEs) *in vitro* e *in vivo* (Odjakova *et al.*, 2012). Así mismo, los extractos totales de una gran cantidad de plantas medicinales han mostrado ser eficaces para el tratamiento de la DM (Odjakova *et al.*, 2012). *Piper auritum* (Piperaceae), conocida coloquialmente como Hoja Santa, es una angiosperma endémica de Mesoamérica poco estudiada. En la medicina tradicional mexicana, las infusiones obtenidas de las hojas y frutos de esta planta han sido utilizadas principalmente para tratar la DM (Parmar *et al.*, 1997). Diversos metabolitos secundarios con potencial farmacológico, principalmente de tipo alcaloide, han sido aislados de extractos orgánicos del género *Piper*; sin embargo, la fitoquímica de *P. auritum* ha sido poco explorada (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

En el 2010, Gutiérrez *et al.*, reportaron por primera vez que los extractos orgánicos obtenidos de *P. auritum* inhiben fuertemente la formación de AGEs *in vitro* (EC₅₀ de 20.1 µg/ml), comparado con extractos provenientes de otras especies usadas en la cocina mexicana. Estudios subsecuentes con *P. auritum* se centraron en el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con actividad antidiabética, es decir, aquellos capaces de disminuir la concentración de glucosa en sangre (Gutiérrez, 2012; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012). Recientemente se han identificado sólo dos compuestos de naturaleza terpénica con la capacidad de disminuir significativamente los niveles de glucosa *in vivo* (Gutiérrez, 2012); sin embargo, no se ha logrado identificar los metabolitos secundarios responsables de la potente actividad

antiAGEs. Así, pudiera ser posible que los metabolitos secundarios provenientes de los microorganismos endófitos de esta planta sean los responsables de inhibir la formación de AGEs.

1.3. Microorganismos endófitos: Una fuente de metabolitos secundarios

Desde el descubrimiento de los microorganismos endófitos en Darnel, Alemania (1904); varios investigadores han definido a estos de distintas maneras. Según Wilson (1995), los microorganismos endófitos son aquellos organismos que residen en los espacios intercelulares, vasculares y raramente en los espacios intracelulares de los tejidos de las plantas sin causar un efecto negativo aparente o algún síntoma de enfermedad en el hospedero. La penetración a la planta ocurre principalmente a través de los estomas, heridas o bien por las raíces laterales, lo que provoca una íntima asociación con el hospedero.

La mayoría de los microorganismos endófitos sintetizan diferentes metabolitos secundarios, que con frecuencia protegen a la planta hospedante frente a condiciones adversas (Strobel, 2003; Strobel y Daisy, 2003; Gunatilaka, 2006). Los metabolitos secundarios bacterianos son compuestos orgánicos, generalmente de bajo peso molecular, que son sintetizados normalmente en la idiofase del crecimiento bacteriano, tienen una distribución taxonómica restringida y habitualmente suelen excretarse al medio externo. Además, la mayoría de estos no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del microorganismo (Strobel, 2003).

La síntesis de metabolitos secundarios con frecuencia es activada por diversos factores, entre los más comunes está el agotamiento de la fuente de carbono de fácil asimilación, o la falta de algún nutriente esencial como el nitrógeno o el fósforo (Luo, *et al.*, 2014). Los metabolitos secundarios comúnmente son producidos por rutas anabólicas especializadas a través de enzimas específicas que divergieron de enzimas involucradas en el metabolismo central (Guo *et al.*, 2008; Strobel y Daisy, 2003). Curiosamente, a casi todos los metabolitos secundarios bacterianos se les ha atribuido alguna actividad biológica, e.g., antibiótica, antifúngica, antihelmíntica, anticancerígena, etc. (Harvey, 2008).

Actualmente, se conocen más de 10,000 metabolitos secundarios bacterianos, siendo los Actinomicetos los principales productores (Guo *et al.*, 2008). La diversidad química de estos compuestos es amplia, sin embargo; las estructuras químicas más comunes son los péptidos no ribosomales (Gunatilaka, 2006) y policétidos (Strobel y Daisy, 2003). Si bien, el género de *Streptomyces*, es quizá el mayor productor de metabolitos secundarios, recientemente el género *Pseudomonas* ha demostrado tener una capacidad considerable de síntesis de compuestos con diferentes actividades.

Pocos microorganismos endófitos han sido aislados e identificados de plantas del género de *Piper* (Verma *et al.*, 2011). Las bacterias endófitas aisladas de dos especies del género de *Piper*, *P. nigrum* y *P. hispidum*, han sido estudiadas; demostrando que el género de *Pseudomonas* está íntimamente ligado a estas especies plantas (Kulkarni *et al.*, 2007; Aravind *et al.*, 2009). Curiosamente, la mayoría de los extractos orgánicos de *Pseudomonas* endófitas provenientes del género *Piper* han mostrado actividad antibiótica y antifúngica (Jasim *et al.*, 2013).

En el 2012, cerca de 100 bacterias endófitas, incluyendo Actinobacterias, fueron aisladas de material vegetal recolectado de plantas de *P. auritum* ubicadas en los sitios conocidos como Chilocuabe y Trapiche viejo, en el distrito de Cuicatlán en el municipio de Chiquihuitlán de Benito Juárez, en la parte noroeste del estado de Oaxaca. Entre los endófitos aislados, Neira-González (2015), trabajó con dos cepas bacterianas (PA26 y A3-1), i.e., con aquellas que cuyos extractos inhibieron la formación de AGEs hasta en un 90% en ensayos *in vitro* utilizando el modelo albúmina de suero bovino (BSA)-Glucosa (Brownlee *et al.*, 1986). Adicionalmente, partiendo del extracto de la cepa *P. protegens* PA26, aisló e identificó al 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (C₁₀H₁₀O₅) (**1**), como responsable de la actividad inhibitoria.

1.3.1 El género de *Pseudomonas* y su capacidad de síntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol

El género de *Pseudomonas* pertenece a la clase de las Gammaproteobacterias la cual comprende poco más de 60 especies. Es un género muy versátil capaz de vivir en diferentes tipos de suelo, agua, plantas y animales. Además, se caracteriza por su ubicuidad, por su

capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de energía, y por producir al menos dos docenas de metabolitos secundarios (Tabla 1) (Gross y Loper, 2009).

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el género de *Pseudomonas* (Gross y Loper, 2009).

COMPUESTO	TIPO	ORGANISMO PRODUCTOR
Piochelina	NRPs	<i>P. aeruginosa</i>
Pseudomonina	NRPs	<i>P. fluorescens</i> AH2 <i>P. fluorescens</i> WCS374 <i>P. entomophila</i> L48
Paerucumarina	NRPs	<i>P. aeruginosa</i>
Siringomicina	NRPs	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Siringopeptina	NRPs	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Artrofactina	NRPs	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38
Masetólidos	NRPs	<i>P. fluorescens</i> SS101 <i>Pseudomonas</i> sp. MF-30
Putisolvin	NRPs	<i>P. putida</i> PCL1445
Orfamida	NRPs	<i>P. fluorescens</i> Pf-5
Siringofactina	NRPs	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Safracina	NRPs	<i>P. fluorescens</i> A2-2
Tabtoxina	Aminoácido modificado	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
Pirrolnitrina	Aminoácido modificado	<i>P. fluorescens</i> <i>P. aurantiaca</i> BL915 <i>Pseudomonas</i> sp.
Ácido indoloacético	Aminoácido modificado	<i>Pseudomonas</i> spp.
Mupirocina	PKS	<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10586
2,4- diacetilfloroglucinol	PKS	<i>P. fluorescens</i>
2,5- dialquilresorcinol	PKS	<i>P. aurantiaca</i> BL915
Siringolina	PKS/NRPs	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Pioluteorina	PKS/NRPs	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> Pf-5 <i>Pseudomonas</i> sp. M18
Coranatina	NRPs/PKS	<i>P. syringae</i>
Pederina	NRPs/PKS	<i>Pseudomonas</i> sp.
Rozixinas	NRPs/PKS	<i>P. fluorescens</i> Pf-5
Fenazinas	Alcaloide	<i>P. chlororaphis</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. aeruginosa</i>
Faseolotoxina	NRPs	<i>P. syringae</i>
Quinolonas	Alcaloides	<i>P. aeruginosa</i>

Dónde: NRPs (Sintetasas de péptidos no ribosomales) y PKS (Policétidos sintetasas).

Uno de los principales metabolitos secundarios sintetizados por algunas especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas es el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (1). El DAPG (1), es un policétido de tipo fenólico (Troppens *et al.*, 2013). Se le han atribuido diferentes actividades biológicas, es decir, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y

nematodos, además, ayuda al control biológico de algunas enfermedades de plantas causadas por diversos patógenos. Además, se ha comprobado que juega un papel importante en el desarrollo de las plantas incrementando la longitud de las raíces radicales. Finalmente, se ha demostrado que puede actuar como molécula de señalización a bajas concentraciones y tiene efectos benéficos en el crecimiento de las plantas (Gross y Loper, 2009).

El clúster de genes (*phl*) implicado en la síntesis de DAPG fue descubierto en *P. fluorescens* F113 (Fenton *et al.*, 1992), y a partir de ahí, diferentes cepas de *P. fluorescens* y *P. protegens* han sido estudiadas (Mavdori *et al.*, 2011). El clúster biosintético *phl* está conformado por nueve genes denominados *phlACDEFGHI* que incluye genes de degradación (*phlG*), reguladores (*phlF* y *phlH*), transportadores (*phlEI*) y biosintéticos (*phlACBD*) (~8 Kbp) (Troppens *et al.*, 2013). Se ha propuesto que el origen evolutivo de este clúster incluye dos eventos independientes de transferencia horizontal que involucran diferentes loci: el primero asociado con el gen *phlD*, el cual tiene su origen en el phylum Actinobacteria; y el segundo, asociado con el operon *phlACB* el cual fue adquirido de las arqueas (Banger y Thomashow, 1996). La síntesis del DAPG es mediada por la enzima PhlD, una policétido sintasa (PKS) de tipo III, relativamente rara en las Proteobacterias (Pandith *et al.*, 2016).

Las PKSs tipo III son enzimas con un solo sitio activo, encargado de catalizar reacciones iterativas de extensión y ciclación para formar un policétido. La principal característica de este tipo de enzimas, es que, por sí misma, puede formar una gran variedad de moléculas, debido a su capacidad intrínseca para incorporar diferentes sustratos derivados de la acil-CoA, y ciclarlos de diferentes formas. Por lo tanto, las PKSs tipo III son capaces de sintetizar compuestos como chalconas, piranonas, floroglucinoles y estilbenos, entre otros más (Song *et al.*, 2006). Anteriormente, se pensaba que las PKSs tipo III se encontraban exclusivamente en plantas, sin embargo, estudios recientes revelan que estas enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias Gram positivas y hongos, pero en bacterias Gram negativas su distribución es limitada (Shen, 2003).

La síntesis del DAPG se ha demostrado en ciertas especies de *Pseudomonas*, incluyendo *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. chlororaphis* y *P. brassicacearum*, siendo *P. fluorescens* la más estudiada (Fenton *et al.*, 1992; Banger y Tomashow, 1996; Takeuchi *et al.*, 2014; Deng, *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2012; Bankhead *et al.*, 2016). A pesar de que *P. fluorescens* tiene una distribución cosmopolita, los primeros datos sugieren que el clúster *phl* sólo está presente en algunas cepas pertenecientes a esta especie (~ 1%) (Troppens *et al.*, 2013). Análisis filogenéticos de algunas cepas de *P. fluorescens* revelaron dos linajes: aquellas que sintetizan el DAPG y las que no. Las cepas productoras de DAPG aparentemente tienen un clúster conservado que incluye los nueve genes *phl*. Estas cepas colonizan las plantas de acuerdo a su edad, ubicación geográfica y la composición fisicoquímica del suelo (Moynihan *et al.*, 2009; Mavdori *et al.*, 2011). Recientemente, se descubrió en *P. protegens*, un intermediario de tipo floroglucinol producido durante la síntesis del DAPG, que es clave para coregular la expresión de genes implicados en la síntesis de la pioluteorina, un antifúngico compuesto de un pirrol biclorado unido a un resorcinol (Yang *et al.*, 2017). En este contexto, el DAPG, un floroglucinol importante para la interacción planta-bacteria, podría poseer otras actividades biológicas, incluso alguna de utilidad para la salud, como la capacidad de inhibir la formación de AGEs que fue reportada recientemente (Neira-González, 2015).

Por lo tanto, por las particularidades inherentes a las PKSs tipo III, es posible que la enzima PhlD pueda sintetizar una gran variedad de congéneres de DAPG. Sin embargo, hasta el momento, no existe ningún estudio que sustente esta hipótesis. En este contexto, la genómica podría ser una herramienta eficaz para el descubrimiento de metabolitos secundarios.

1.4. Descubrimiento de metabolitos secundarios a través del uso de la genómica.

Curiosamente, desde los años 70s, la tasa de descubrimiento de metabolitos secundarios ha descendido progresivamente (Harvey, 2008). Actualmente, es una prioridad encontrar nuevos compuestos que ayuden al tratamiento de diferentes enfermedades (Guo *et al.*, 2008). Sin embargo, son insuficientes los métodos clásicos para la búsqueda de estos compuestos. La detección de actividades enzimáticas, clonación mutacional y expresión heteróloga, entre otras; son técnicas que han quedado obsoletas (Strobel y Daisy, 2003).

En las últimas décadas, la genómica junto con el desarrollo de diferentes herramientas bioinformáticas, ha permitido acelerar el descubrimiento de nuevos grupos de genes implicados en la síntesis (clústeres biosintéticos) de metabolitos secundarios (Harvey, 2008). La minería genómica bacteriana ha demostrado ser una herramienta de gran ayuda para el descubrimiento de numerosos genes involucrados en la síntesis de nuevos metabolitos secundarios (Ziemert *et al.*, 2016). La identificación de los genes *ofaABC* en el genoma de *Pseudomonas protegens* F6 a través de la minería genómica, es uno de los ejemplos más recientes (Jang *et al.*, 2013). El establecimiento del vínculo gen – metabolito secundario (orfamida A), conllevó un trabajo de alrededor de cinco años, usando herramientas sofisticadas y costosas como resonancia magnética nuclear, marcajes de sustratos con isótopos radioactivos, entre otras más. Poniendo en claro que, la minería genómica requiere de otras herramientas para lograr resultados exitosos.

Por otro lado, la minería genómica no sólo se basa en la búsqueda de nuevos grupos de genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios, sino también en la búsqueda de semejanzas y/o diferencias de clústeres biosintéticos de organismos filogenéticamente cercanos. Hace algunos años, hablar de diversidad química de metabolitos secundarios era sinónimo de pérdida o ganancia de genes en un clúster biosintético implicado en la síntesis de estos compuestos. Estas modificaciones resultan, en la mayoría de los casos, en la síntesis de compuestos con ligeras modificaciones químicas al original que, en teoría, podría tener una actividad biológica diferente a la reportada (Tracanna *et al.*, 2017). Sin embargo, para llegar a un resultado exitoso, es necesario explorar cada uno de los clústeres biosintéticos del organismo de interés, comparándolo con una amplia base de datos genómicos, lo que conlleva una estrategia poco amigable. En la actualidad, los datos genómicos se han incrementado exponencialmente debido al desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva. El gran reto es transformar estos datos en conocimiento, y la filogenómica, promete jugar un papel clave.

1.4.1. Filogenómica: Una poderosa herramienta subutilizada

La filogenómica es el estudio de las relaciones evolutivas basadas en el análisis comparativo de genomas a gran escala, a través de la reconstrucción de árboles filogenéticos. Los árboles resultantes, a diferencia de un árbol filogenético convencional, construyen una hipótesis sobre la historia evolutiva de una familia de genes a lo largo de las especies

consideradas, y con base en esto, podría entenderse como los mecanismos de cambio que operan sobre el genoma, así como su interrelación con la evolución de los organismos y sus características fenotípicas (Eisen y Fraser, 2003).

En definitiva, la filogenómica constituye una herramienta poderosa para la interpretación de los sistemas biológicos en un contexto evolutivo. Se sabe que una divergencia a nivel de secuencia de genes comúnmente está relacionada con una pérdida o ganancia de funciones, lo que confiere una adaptación evolutiva de hospedero (Tierney *et al.*, 2017). Bajo este argumento, la filogenómica ha sido ampliamente utilizada en plantas, contestando una gran variedad de preguntas biológicas enfocadas principalmente a la convergencia o divergencia de funciones genéticas específicas asociadas con la resistencia a diferentes tipos de estrés (Burki *et al.*, 2012; Timme *et al.*, 2012). Existen pocos ejemplos en donde la filogenómica es utilizada para reconstruir la historia evolutiva del gen “principal” encargado de la síntesis de algún metabolito secundario, especialmente en plantas y organismos eucariontes (Theobald *et al.*, 2016). La mayoría de estos ejemplos se refieren al estudio de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), y en especial buscan entender el origen evolutivo del gen y sus implicaciones en la arquitectura de los dominios conservados que lo conforman, con el propósito de correlacionar una duplicación y/o pérdida de éstos dominios en respuesta a presiones específicas del nicho ecológico del microorganismo (Tierney *et al.*, 2017).

No obstante, la filogenómica no ha sido utilizada para la búsqueda de la diversidad química de metabolitos secundarios a partir de un clúster completo de genes biosintéticos específico. Por lo tanto, construir la historia evolutiva de un clúster completo de genes biosintéticos perteneciente a un metabolito secundario derivado de plantas o microorganismos con actividad antiAGEs, podría ser una herramienta que apoye la toma de decisiones que conlleve a la selección de aquellos organismos que potencialmente pudieran tener la capacidad de sintetizar diferentes compuestos a partir de un solo clúster de genes. Encontrar nuevos metabolitos secundarios ayudaría a tener otras alternativas de tratamiento para diferentes enfermedades degenerativas mundiales, como la diabetes mellitus.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta la humanidad es la poca disponibilidad de fármacos para tratar diferentes enfermedades. La DM es una enfermedad cosmopolita, en donde su tasa de incidencia, prevalencia y mortalidad están incrementándose a un ritmo acelerado. La acumulación de AGEs, con frecuencia se ha reconocido como la responsable del desarrollo de las complicaciones a largo plazo. Esto plantea la posibilidad de que la inhibición de la formación de AGEs, podría prevenir el progreso de las complicaciones diabéticas. No obstante, hasta el momento, no existe en el mercado un compuesto antiAGEs derivado de plantas o sintetizado químicamente que se use para este fin.

En este contexto, los microorganismos endófitos han sido objeto de estudio, debido a su capacidad de síntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios. El género de *Pseudomonas*, reiteradamente está asociado a plantas, pero además, es capaz de sintetizar diversos compuestos que podrían ser prometedores para su uso en el área de la salud, como el DAPG, un compuesto fenólico de tipo floroglucinol, al cual se le han atribuido diferentes actividades biológicas, entre ellas, recientemente, la actividad antiAGEs. La síntesis del DAPG está mediada por los genes *phl*, los cuales, aparentemente están altamente conservados. Entre los genes que conforman al clúster *phl*, se encuentra el gen *phlD*, que codifica una enzima PKS tipo III. Curiosamente, este tipo de enzimas han mostrado tener la capacidad de sintetizar diferentes compuestos, a través del reconocimiento de diversos sustratos derivados de la acil-CoA y su forma peculiar de ciclarlos. Por lo tanto, por las particularidades inherentes a las PKSs tipo III, es posible que la enzima PhlD pueda sintetizar una gran variedad de congéneres de DAPG. Sin embargo, hasta el momento, no existe ningún estudio que sustente esta hipótesis.

En este contexto, construir la historia evolutiva del clúster de genes biosintéticos perteneciente al DAPG, podría ser una estrategia de escrutinio para la selección de aquellos organismos que merezcan ser estudiados a detalle como posibles productores de una diversidad química en torno al DAPG.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. General

Construir la historia evolutiva del clúster de genes *phl* y establecer su relación con la diversidad química en torno al DAPG, dirigida a la búsqueda de compuestos antiAGEs.

3.2. Específicos

1. Evaluar la actividad antiAGEs *in vitro* de extractos obtenidos de cultivos de bacterias endófitas aisladas de *P. auritum*.
2. Caracterizar taxonómicamente las bacterias endófitas aisladas de *P. auritum*.
3. Secuenciar, ensamblar y anotar los genomas de aquellas las bacterias endófitas cuyos extractos presentaron la mayor actividad antiAGEs.
4. Construir la historia evolutiva del clúster de genes *phl*, encargado de la síntesis del DAPG, usando los datos genómicos disponibles en las bases de datos y las secuencias genómicas propias.
5. Comprobar que el DAPG sintetizado por alguna de las bacterias endófitas de *P. auritum* es el responsable de la actividad antiAGEs del extracto de la bacteria.
6. Buscar congéneres del DAPG en el extracto de la bacteria endófitas seleccionada previamente, mediante técnicas cromatográficas.
7. Evaluar el mecanismo de acción del DAPG y sus congéneres a través diferentes ensayos *in vitro* de la actividad antiAGEs.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medios de cultivo

- ❖ Medio S7 (g/l): Sacarosa 6, glucosa 1, fructosa 3, extracto de levadura 0.5, peptona de soya 1, MgSO₄·7H₂O 0.0036, ZnSO₄·7H₂O 0.0025, MnCl₂·H₂O 0.005, FeCl₃·4H₂O 0.002, CuSO₄·5H₂O 0.002, Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.0065, acetato de sodio 1, benzoato de sodio 0.1, fenilalanina 0.005 y amortiguador de fosfatos (pH 6.8) 1 M. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C por 15 min.
- ❖ Medio Almidón-Caseína (g/l): Almidón 10, caseína 0.30, KNO₃ 2, NaCl 2, K₂HPO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.02, FeSO₄·7H₂O 0.01. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C por 15 min.

4.2. Identificación taxonómica de cepas endófitas bacterianas de *P. auritum*

4.2.1. Extracción del DNA genómico bacteriano (DNAg)

Matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo BHI (Infusión cerebro-corazón) (Difco™) fueron inoculados con una colonia aislada de cada endófito bacteriano. Los matraces fueron incubados a 22 °C y 120 r.p.m. por 12 h. Transcurrido el tiempo, el medio de cultivo fue centrifugado a 3,500 r.p.m por 10 minutos para separar la biomasa del sobrenadante. Para la extracción del DNA genómico, se utilizó el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. A menos que se especifique lo contrario, todos los cultivos se llevaron a cabo en una incubadora orbital marca Scientific modelo BC-2008 (NJ, USA).

4.2.2. Amplificación de las secuencias conservadas rRNA 16S y *rpoB* de las bacterias endófitas

Los genes conservados rRNA 16S (~1,500 pb) y *rpoB* (~1,200 pb) (subunidad β de la RNA polimerasa) fueron amplificados utilizando el DNAg como molde de cada uno de los

organismos usados en este estudio. Para la secuencia rRNA 16S, se usó el par de cebadores universales descritos por Heuer *et al.*, 1997. El gen *rpoB* fue amplificado sólo en el género de *Pseudomonas*, utilizando el par de cebadores específicos descritos por Tayeb *et al.*, 2005.

La mezcla de reacción para la PCR fue la siguiente: 1 µl del cebador sentido (10 µM), 1 µl del cebador antisentido (10 µM), 0.5 µl de dNTP's (100 mM), 2.5 µl de buffer con MgCl₂ 10x, 0.5 µl de Kapa Taq™, 2.5 µl de DMSO, 1 µl de DNA (100 ng/µl) y 15.5 µl de agua. Las condiciones de PCR para la amplificación de ambas secuencias fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 25 ciclos de i) Desnaturalización a 95 °C por 30 seg., ii) Hibridación a 55 °C por 30 seg., iii) Elongación a 72 °C por 25 seg. Y finalmente un ciclo de elongación a 72 °C por 7 minutos.

Los productos de PCR fueron teñidos con GelRed (Biotium, Inc.) para su posterior visualización a través de un gel de agarosa al 0.8 %. Los amplicones fueron purificados usando el kit Expin PCR (GeneAll Biotechnology), siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de cada amplicón fue determinada a través del NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.2 (Thermo Scientific), para su secuenciación en Macrogen Inc. (Korea, Japón).

4.2.3. Análisis filogenético basado en las secuencias rRNA 16S y *rpoB*

Las secuencias nucleotídicas bacterianas (sentido y antisentido) de los genes rRNA 16S y *rpoB* fueron obtenidas por secuenciación fueron alineadas usando el programa Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012) para obtener las secuencias consenso. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias recuperadas de las bases de datos *The Ribosomal Database Project* (Maidak *et al.*, 1994) y NCBI, usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Las posiciones ambiguas del alineamiento fueron removidas con el programa Gblocks 0.91 (Talavera y Castresana, 2007). La construcción del árbol filogenético fue a través de MrBayes v3.2. (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), utilizando un método bayesiano. El modelo de sustitución nucleotídica se estimó mediante el programa jModeltest (Posada, 2008). La robustez del árbol fue valorada con 1,000,000 de réplicas. La representación gráfica del árbol filogenético fue obtenida a través de FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

La identidad taxonómica de los endófitos fue determinada considerando el criterio de Roselló-Mora y Amann (2001). Para considerar organismos de la misma especie, la identidad en secuencia nucleotídica entre el organismo problema y la referencia deberá ser mayor a 97.5%; organismos del mismo género tendrán un porcentaje de identidad entre 95-97.5%, la familia estará determinada en un rango de porcentaje de identidad del 90-95% y finalmente el orden se establecerá en organismos que tengan un porcentaje de identidad entre 80-90%.

4.3. Filogenómica

4.3.1. Secuenciación, ensamble, anotación y minería genómica de los genomas bacterianos.

El DNAg bacteriano fue obtenido cómo se describe en el Apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos. La tecnología MiSeq Illumina 2X250 se usó para la secuenciación genómica, la cual se realizó en Langebio-Cinvestav (Irapuato, México).

Las secuencias de las librerías resultantes fueron filtradas y rasuradas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014). La calidad y la longitud de las lecturas, fueron los principales parámetros que se tomaron en cuenta para filtrar las librerías, eligiendo los archivos con el mayor porcentaje de supervivencia del total de las secuencias (Anexo I). A partir de los archivos filtrados, se llevó a cabo el ensamble de cada uno de los genomas bacterianos a través de Velvet 1.0.17 (Zerbino y Birney, 2008), usando diferente tamaño de *k-mers* (secuencia nucleotídica de tamaño *n*). Finalmente, el mejor ensamblado se eligió de acuerdo a: (i) el total de *contigs* (segmentos de ADN superpuestos, que juntos representan una región consenso de ADN), (ii) número de N's, (iii) profundidad del ensamblado, (iv) longitud del ensamblado y (v) la cantidad del total de la secuencia usada para el ensamble (Anexos II-X). La anotación de los genomas bacterianos se hizo utilizando RAST (Aziz *et al.*, 2008), y para la búsqueda de secuencias implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios bacterianos se usó antiSMASH 3.0 (Weber *et al.*, 2015).

4.3.2. Análisis filogenómicos

Genomas de *Pseudomonas* (1,560) fueron descargados de la base de datos GenBank (Septiembre, 2015) y anotados utilizando RAST (Aziz *et al.*, 2008). Antes, la base de datos genómica fue filtrada con el propósito de incluir sólo los genomas con no más de 400 *contigs*. El árbol filogenético de especies se construyó usando el conjunto de datos generado de siete proteínas concatenadas: RpoD (~ 615 aa), GyrB (~ 792 aa), AcnB (~ 869 aa), PFK (~ 313 aa), GAP (~ 461 aa), PGI (~ 554 aa), y RpoB (~ 1,360 aa), las cuales fueron traducidas de las secuencias nucleotídicas sólo para los genomas que contenían los genes *phl*. Las proteínas ortólogas codificadas por el gen *phlD*, fueron buscadas en todos los genomas de *Pseudomonas* previamente anotados a través del mejor hit bidireccional (*bits-score cut off* 400 y *e-value cut off* 0.000001). El clúster de genes biosintético (BGC) involucrado en la síntesis del DAPG, fue definido analizando 30 genes río arriba y río debajo del gen *phlD* través del mejor hit bidireccional (*bits-score cut off* 100 y *e-value cut off* 0.00001).

El conjunto de datos de siete proteínas concatenadas se alineó a través de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), y el alineamiento resultante fue editado usando Gblocks 0.91 (Talavera y Castresana, 2007) para remover todas aquellas posiciones ambiguas. El árbol filogenético de especies fue construido mediante un modelo bayesiano con MrBayes v3.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), usando el modelo LG designado por el servidor ProtTest 2.4 (Abascal *et al.*, 2005). El análisis fue realizado con 1,000,000 de generaciones. El árbol del BGC de DAPG fue construido utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining, con el programa QuickTree (Howe *et al.*, 2002). Finalmente, las representaciones gráficas de los árboles filogenéticos fueron visualizadas a través de FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.4. Aislamiento y purificación del compuesto con actividad antiAGEs

4.4.1. Cultivo masivo de la cepa *P. protegens* PA12

Para la preparación del preinóculo, matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio S7, fueron inoculados con una colonia aislada de *P. protegens* PA12, cepa seleccionada en este estudio por su potente actividad antiAGEs (Capítulo I). Los matraces fueron incubados a 22 °C

y 120 r.p.m. por 12 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó 1 ml del preinóculo para inocular cada uno de 600 matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio S7, y se incubaron por 48 h bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se preparó un extracto orgánico del cultivo usando acetato de etilo, tal como se describe en el Apartado 4.5.1 de Materiales y Métodos. A este extracto se le denominó EPA12.

4.4.2. Purificación de EPA12 y obtención del compuesto

El extracto orgánico EPA12 (7.4 g) presentó un color café oscuro con una consistencia aceitosa. La purificación del extracto se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando siete sistemas de eluyentes de polaridades distintas (metanol, hexano, acetona, diclorometano, cloruro de metileno, cloroformo y éter de petróleo). El mejor perfil de separación se obtuvo con la mezcla de Hex:Me₂CO (2:1), la cual se usó para el fraccionamiento inicial del extracto EPA12 en una columna empacada con gel de sílice (100 g) Merck (Darmstadt, Alemania). Se obtuvieron 45 fracciones cada una de 5 ml, las cuales se analizaron por separado por CCF utilizando el mismo sistema de elución. Las fracciones que presentaron el mismo patrón de bandeo en CCF se juntaron para obtener seis fracciones denominadas PA12-1 a PA12-6. La actividad antiAGEs de cada una de estas fracciones se determinó usando el modelo BSA-Glucosa (Brownlee M., *et al* 1995). La fracción PA12-2 fue seleccionada, por presentar la mayor actividad (> 90%) (Figura 2).

La fracción PA12-2 fue separada usando la mezcla de éter de petróleo:*n*-hexano (2:1) como eluyente. Cuatro fracciones denominadas PA12-2.1 a PA12-2.4, fueron obtenidas. La subfracción PA12-2.2, la que presentó la mejor actividad, se fraccionó usando la mezcla de CH₂Cl₂:CHCl₃ (9:1) para obtener cuatro subfracciones denominadas PA12-2.2.1 a PA12-2.2.4. La subfracción PA12-2.2.2 (800 mg), con la mayor actividad, fue seleccionada y fraccionada mediante HPLC semipreparativo. La separación a través del HPLC semipreparativo, se llevó en fase inversa con una columna V-yadac C-18, 4,6 x 250 mm x 5 mm, utilizando agua + TFA 0.1 % y acetonitrilo 100 %. El volumen de inyección fue de 10 µl/min a 25 °C, con un detector de longitud de onda de λ 254 nm. Se obtuvieron cuatro subfracciones denominadas PA12-2.2.2.1 a PA12-2.2.2.4, la fracción PA12-2.2.2.2 fue seleccionada por presentar la mayor actividad. El sistema de elución CHCl₃:MeOH (3:1) fue utilizado para la separación de la fracción PA12-

2.2.2.2, para obtener siete fracciones denominadas PA12-2.2.2.2.1 a PA12-2.2.2.2.7. Dos fracciones presentaron la mayor actividad: i) la fracción F12-2.2.2.2.1 (32 mg) que correspondió al 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (**1**) inhibió la formación de AGEs en un 83%; y ii) la fracción F12-2.2.2.2.2 (12 mg) que fue una mezcla de ácidos grasos, la cual inhibió la formación de AGEs en un 63%.

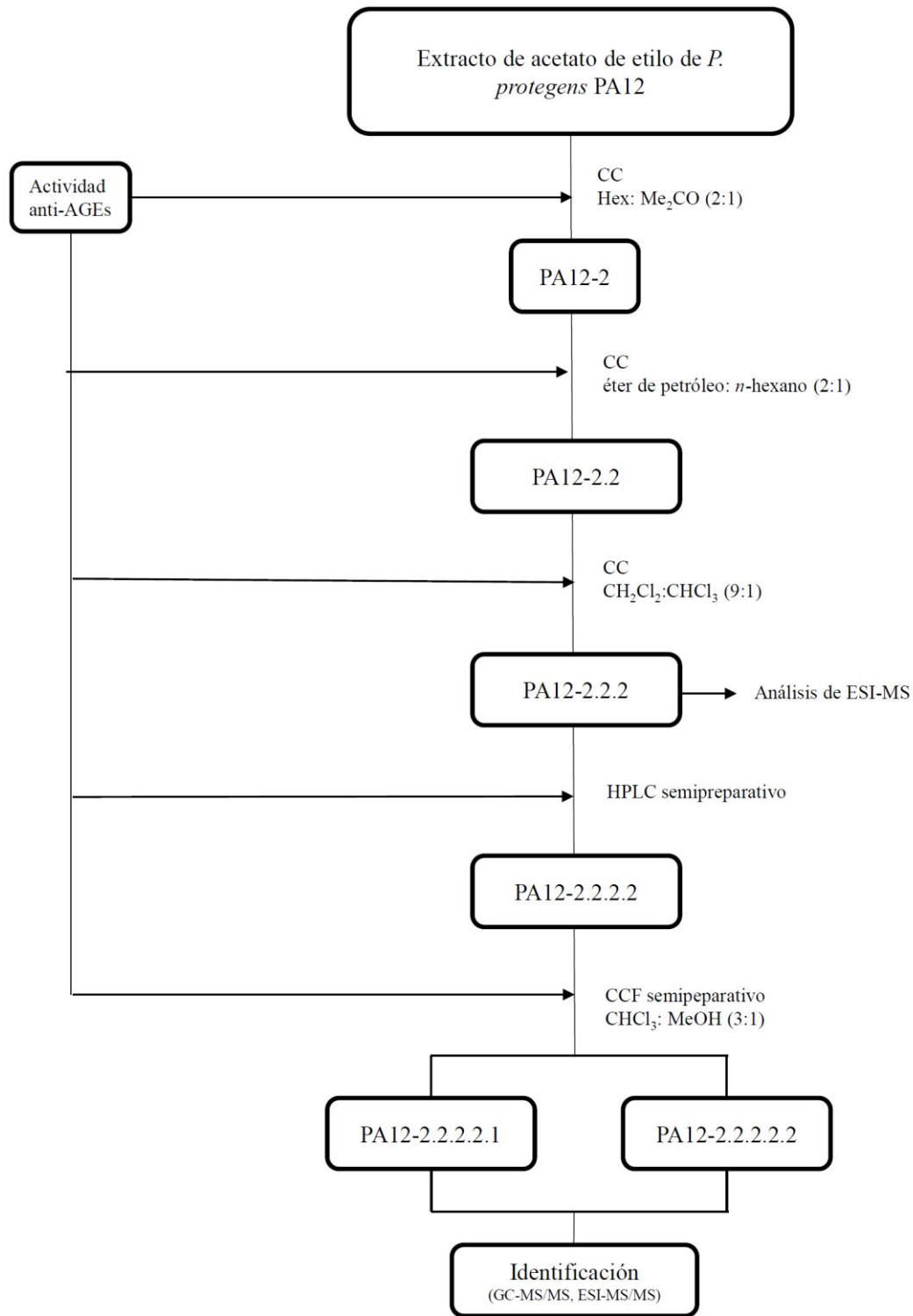


Figura 2. Diagrama general del aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antiAGEs a partir del extracto orgánico EPA12 obtenido de la cepa *P. protegens* PA12. CC (Cromatografía en columna), CCF (Cromatografía en capa fina).

4.4.2.1. Identificación del 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (1)

El DAPG (1) fue identificado por ESI-MS/MS y GC-MS/MS, usando un estándar de DAPG (USBiological). Para la separación se utilizó una columna BR-5 (Bruker Daltonics) y helio como gas transportador a un flujo de 1 ml/min. La temperatura de la columna fue programada a: 50 °C por 1 min., 20 °C/min, 300 °C por 2 min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µl. La muestra fue disuelta en MeCN y CD₃OD para el análisis de ESI-MS/MS y GC-MS/MS, respectivamente; y fue inyectada en modo *Split* con un ratio de 1:100. El espectrómetro de masas fue configurado para analizar en el rango de 50 – 400 *m/z* con un impacto de electrón (EI) de 70 eV.

4.4.2.2. Identificación de ácidos grasos por análisis de GC-MS/MS

Los cuatro ácidos grasos contenidos en la fracción PA12-2.2.2.2 fueron identificados por GC-MS/MS, las condiciones de separación fueron las mismas que se utilizaron para la identificación del DAPG (1). La fracción PA12-2.2.2.2 fue disuelta en CHCl₃ a una concentración de 1 mg/1 ml.

4.5. Ensayos *in vitro* para determinar la actividad antiAGEs.

4.5.1. Obtención del extracto orgánico de cultivo bacteriano

Matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio S7, fueron inoculados con una colonia aislada de cada endófito bacteriano. Para los endófitos pertenecientes a Actinobacterias, se usó el medio almidón-caseína. Los matraces fueron incubados a 22 °C y 120 r.p.m. por 12 h.

El caldo de cultivo y la biomasa de cada matraz se homogenizaron con acetato de etilo en una relación 4:1 (v/v) en una licuadora Osterizer por 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 6,000 r.p.m. a 20.000 g por 5 minutos. La fase orgánica se recuperó y se evaporó hasta sequedad en un rotavapor Büchi R-200/20 con temperatura del baño de 37 °C, temperatura de vapor 30 °C y presión de vacío 245 mbar. La extracción con acetato de etilo se realizó tres veces. Los tres

extractos orgánicos obtenidos, fueron juntados y transferidos a un vial ámbar de 7 ml, para finalmente evaporar el solvente en atmósfera de nitrógeno. El vial una vez cerrado y sellado con Parafilm, se guardó en refrigeración a 4-7 °C hasta su análisis.

4.5.1.1. Modelo BSA-Glucosa

De acuerdo a Brownlee *et al.*, (1995), se preparó una solución de albúmina sérica de bovina (BSA) a una concentración de 10 mg/ml en el amortiguador PBS (pH 7.4). En un vial ámbar se colocaron 0.6 ml de la solución junto con 0.6 ml del extracto orgánico a ensayar (a 5 mg/ml), 0.6 ml de glucosa 500 mM, 0.1 ml de azida sódica al 0.02 %. Finalmente, la mezcla se llevó a un volumen final de 3 ml con el amortiguador PBS. Como control positivo se empleó la aminoguanidina (10 mM) (Sigma-Aldrich), un conocido inhibidor de la producción de AGEs; y como control negativo se utilizó el extracto obtenido con acetato de etilo del medio S7. El ensayo se llevó a cabo por triplicado, incubando los viales durante 15 días a 37 °C. La formación de AGEs se evaluó por fluorescencia (excitación longitud de onda de 370 nm y de emisión de longitud de onda de 440 nm).

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de la formación de AGEs} = (\text{fluorescencia control} - \text{fluorescencia problema}) / (\text{fluorescencia control}) \times 100$$

4.5.1.2. Ensayo de hidroxilación del benzoato

La inhibición de la producción de radicales hidroxilo por el DAPG se evaluó mediante el ensayo de hidroxilación del benzoato (Hunt *et al.*, 1988). La mezcla de reacción de 5 ml contenía: benzoato de sodio (1 mM), amortiguador de fosfato de potasio (100 mM, pH 7,2), ribosa (50 mM), CuSO₄·5H₂O (0.1 mM), y los inhibidores (1 mg/ml) previamente disueltos en DMSO. La mezcla se incubó durante cuatro días a 37 °C, y después se determinó la fluorescencia (Ex 308 nm, Em 440 nm). El porcentaje inhibición de la hidroxilación de benzoato (%) se calculó como:

$$\% = [(Ab - As) / Ab] \times 100$$

En donde,

As es la fluorescencia obtenida de la mezcla de reacción con el inhibidor

Ab es la fluorescencia de la mezcla de reacción sin el inhibidor.

La aminoguanidina (Sigma-Aldrich) a 10 mM se utilizó como control positivo.

4.5.1.3. Ensayo de fructosamina

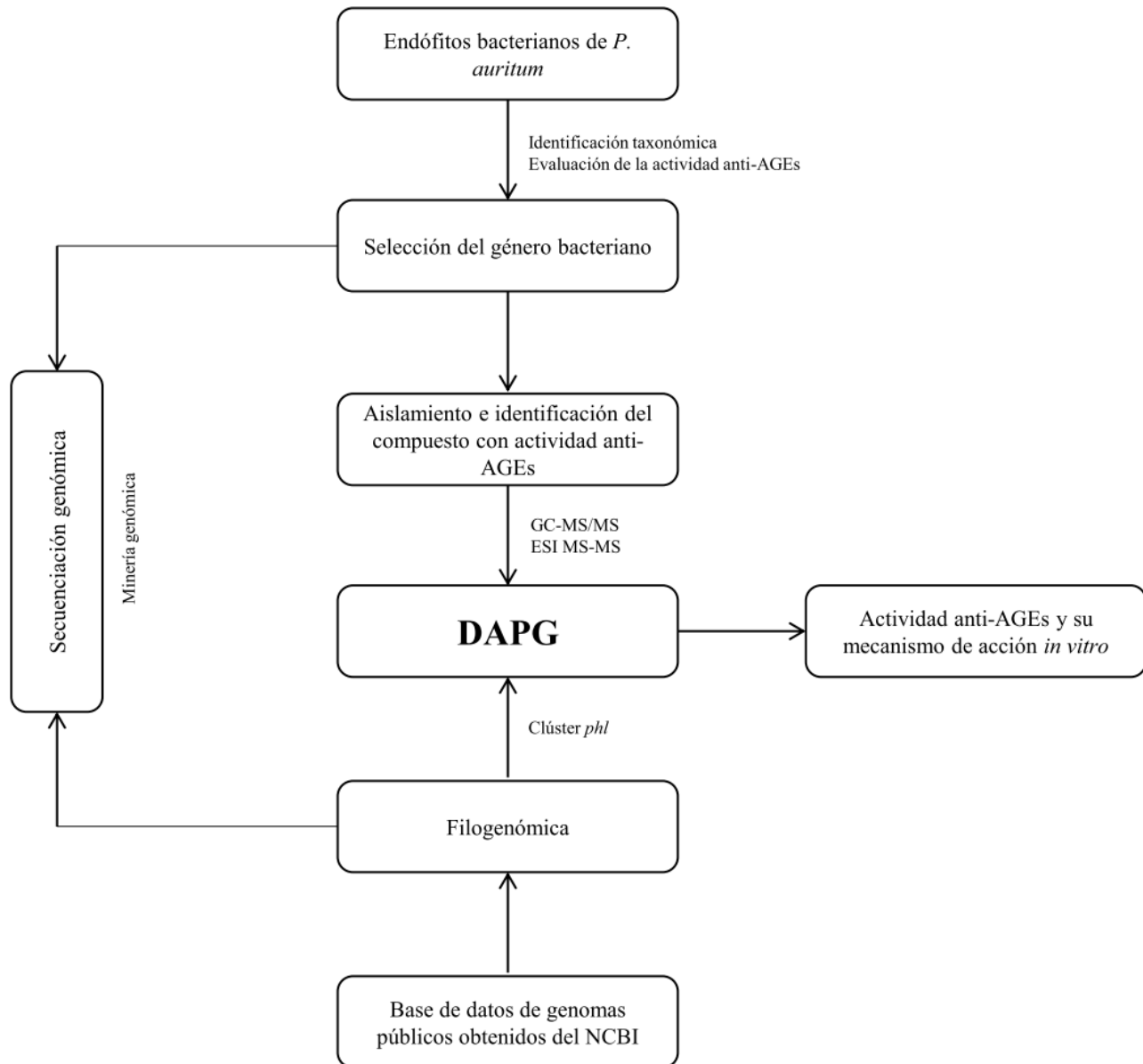
La inhibición de la formación de productos de Amadori a partir de BSA en presencia de glucosa fue evaluada (Johnson *et al.*, 1983). La mezcla de reacción de 5 ml contenía: BSA (10 mg/ml), glucosa (500 mM), reactivo de nitroazul de tetrazolio (NBT) (NBT 0.5 mM, amortiguador de carbonato de sodio 0.2 M a pH 10.4) y los inhibidores (1 mg/ml), disueltos en DMSO. La mezcla se incubó a 37 °C durante siete días. El grado de reducción del NBT en la mezcla de reacción, fue determinado por absorbancia (530 nm). La aminoguanidina (Sigma-Aldrich) a 10 mM se utilizó como control positivo.

4.5.1.4. Ensayo de metilglioxal (MGO)

La inhibición de la formación de proteínas modificadas por el metilglioxal fue evaluada (Lee *et al.*, 1998). Una solución de BSA (50 mg/ml) fue incubada a 37 °C por nueve días con una solución de glioxal (100 mM) (Sigma-Adrich) y azida de sodio (0.02 %), en un amortiguador de fosfato a 0.1M (pH 7.4), en presencia de los inhibidores (1 mg/ml) disueltos previamente en DMSO. La fluorescencia fue medida (Ex 330 nm, Em 410 nm) y comparada con el blanco (la mezcla de reacción sin el inhibidor). El porcentaje de inhibición fue calculado de la misma forma que en el ensayo de la hidroxilación del benzoato. La aminoguanidina (Sigma-Aldrich) a 10 mM fue utilizada como control positivo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS ENDÓFITAS DE *P. auritum*

En el 2012, 82 bacterias endófitas de *P. auritum*, incluyendo siete Actinobacterias, fueron aisladas por Neira-González, 2015. Para este trabajo se seleccionaron 27 cepas endófitas de *P. auritum*, con base en su morfología macroscópica diferente. Una cepa (PA26) adicional que había sido analizada previamente por Neira Gonzalez, 2015 se retomó en el presente trabajo para estudios adicionales.

Primero, un segmento de la región que codifica para el RNA ribosómico 16S (rRNA 16S) se amplificó y secuenció para cada una de las bacterias seleccionadas. Las secuencias rRNA 16S fueron usadas para la asignación taxonómica después de un análisis filogenético. Como se puede observar en el Figura 3, entre las 28 cepas bacterianas analizadas, el género que predominante fue *Pseudomonas* (52%), sin embargo, también se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* (11%), *Enterobacter* (11%), *Agrobacterium* (7%), *Streptomyces* (7%), *Xanthomonas* (4%), *Pantoea* (4%) y *Microbacterium* (4%). Con base en nuestro conocimiento, estos resultados son el primer acercamiento sobre el microbioma de *P. auritum*. Estudios relacionados con endófitos del género *Piper* sugieren que los géneros *Pseudomonas* y *Streptomyces*, en orden de prioridad, son los principales colonizadores de estas plantas (Aravind *et al.* 2008). El género *Pseudomonas* ha sido objeto de estudio debido a sus múltiples funciones asociadas a plantas como: fijación de nitrógeno, contribución a la defensa del ataque de diversos patógenos y promotor del crecimiento del hospedero, entre otras (Smirnov y Kiprianova, 1990).

Una vez identificadas taxonómicamente las bacterias endófitas, se obtuvieron por separado extractos con acetato de etilo de cada cultivo bacteriano. A continuación, los extractos se evaluaron *in vitro*, usando el modelo BSA-Glucosa (Brownlee *et al.*, 1995), con el propósito de detectar aquellos con fuerte actividad antiAGEs. La mayoría de los extractos obtenidos, en especial aquellos obtenidos de cultivos de *Pseudomonas* inhibieron *in vitro* la formación de AGEs (Tabla 2). Algunas especies de *Pseudomonas* tienen una capacidad excepcional para producir una gran variedad de metabolitos secundarios, incluyendo sideróforos, fenazinas, y

pequeñas moléculas de bajo peso molecular que pueden actuar como antibióticos, surfactantes y fitotoxinas (Gross y Loper, 2009). Además de esto, se ha mostrado que el DAPG posee una potente actividad antiAGEs (Neira-González, 2015).

Con base en los resultados obtenidos *in vitro*, se consideraron sólo las cepas de *Pseudomonas* (14 en total) para los análisis subsecuentes. La correcta afiliación taxonómica hasta especie dentro del género de *Pseudomonas* se considera relativamente complicada. Estudios con diferentes marcadores moleculares sugieren que el uso del gen *rpoB* (subunidad β de la RNA polimerasa) provee una buena resolución taxonómica en *Pseudomonas* (Tayeb *et al.*, 2005). Para definir una afiliación taxonómica con una mayor resolución dentro del género de *Pseudomonas*, se amplificó y secuenció el gen *rpoB*. Como se puede observar en la Figura 4, entre las 14 bacterias preseleccionadas pertenecientes a *Pseudomonas*, la mayoría corresponden a la especie *P. protegens* (6), seguido por *P. fulva* (3). Estas nueve cepas fueron seleccionadas para su secuenciación genómica con el propósito de analizar los clústeres biosintéticos de metabolitos secundarios (Capítulo II, Tabla 3).

La bacteria *P. protegens* PA12, fue elegida para el aislamiento e identificación del compuesto responsable de la actividad antiAGEs, debido a que su extracto orgánico inhibió la formación de AGEs más del 90%, una actividad mayor a la obtenida con el control positivo, la aminoguanidina (52%), una hidrazina que ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para inhibir la formación de AGEs (Brownlee *et al.*, 1995).

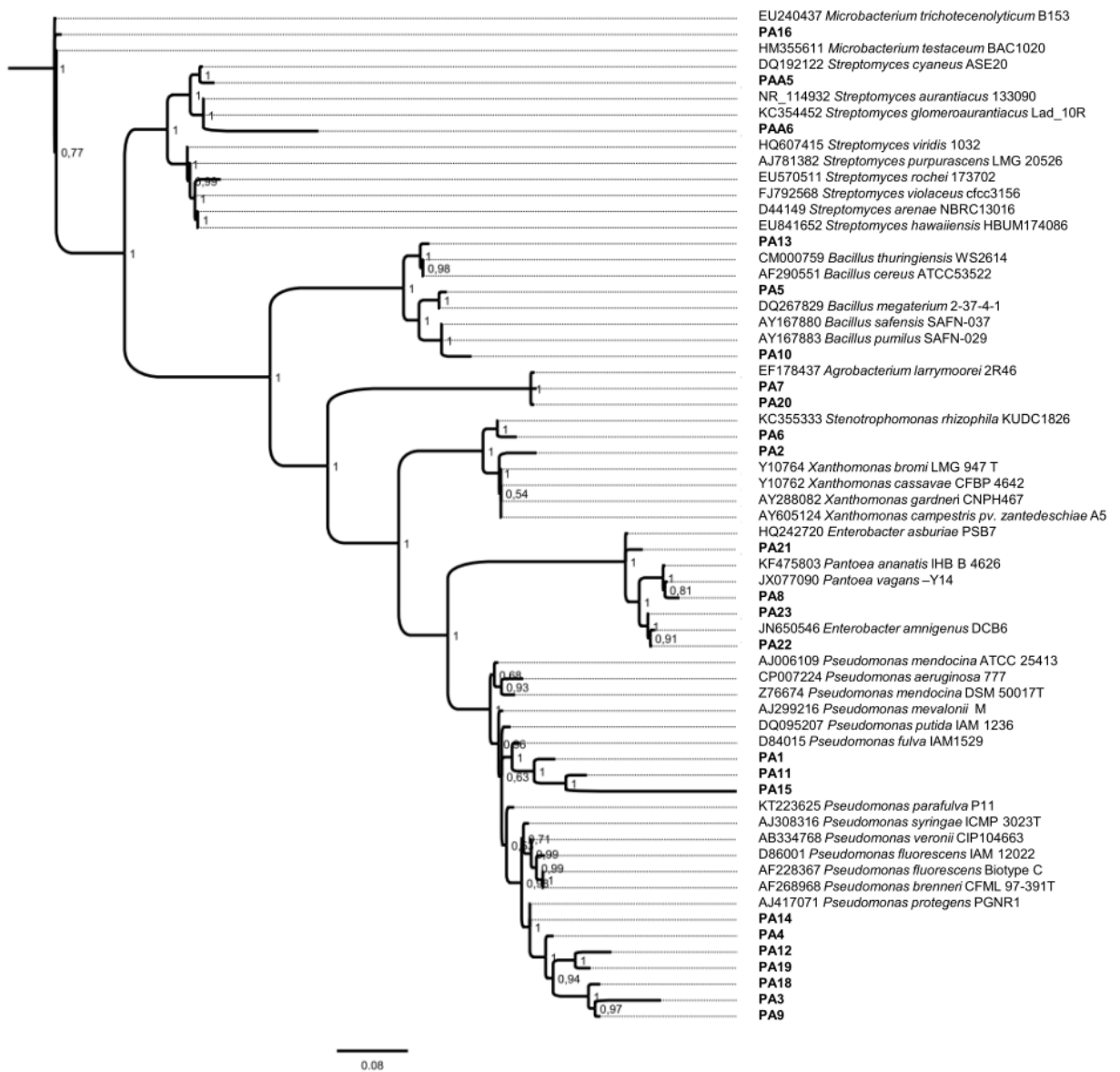


Figura 3. Árbol filogenético de las bacterias endófitas de *P. auritum* usando un segmento de la región que codifica para el RNA ribosómico 16S (rRNA 16S). Para construir el árbol se usó un método bayesiano, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica 4by4. El número posterior de cada nodo, indica la probabilidad posterior valuada en 1,000,000 de réplicas.

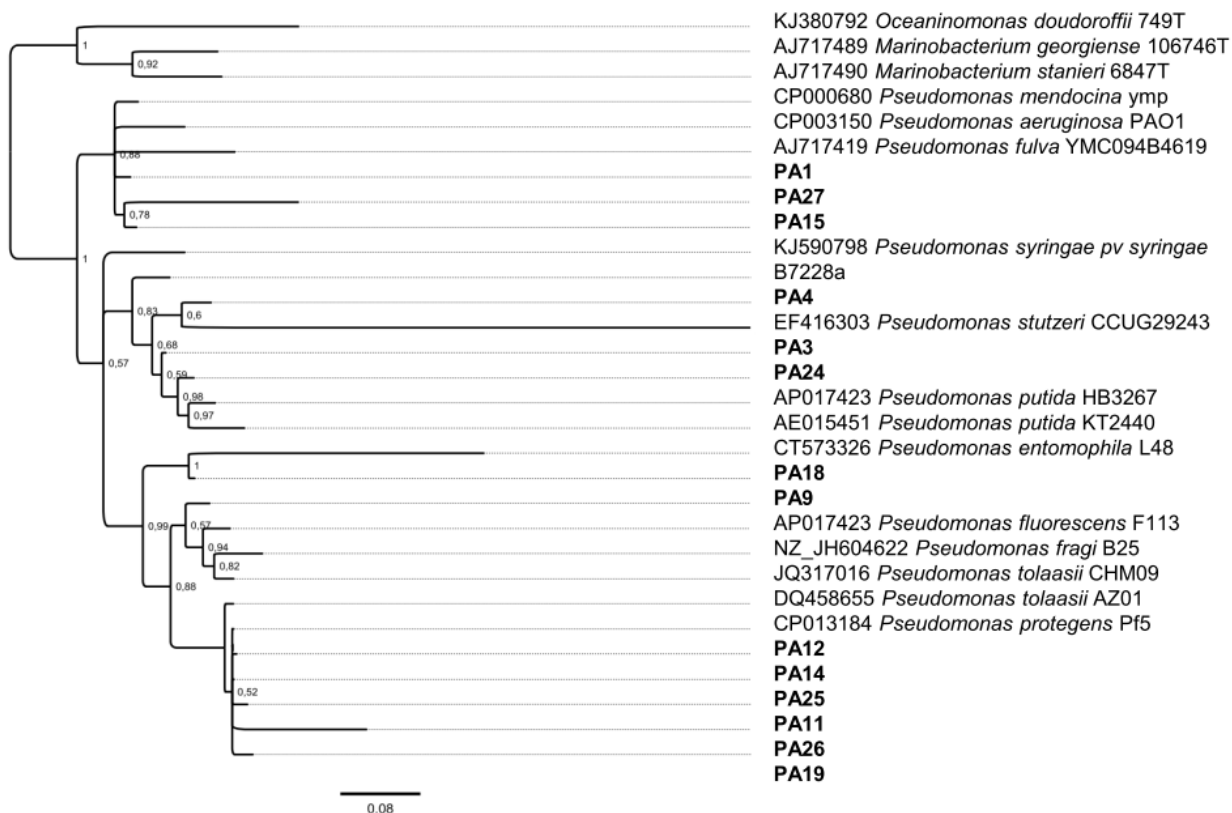


Figura 4. Árbol filogenético de las bacterias endófitas de *P. auritum* usando su secuencia génica *rpoB*. Un método bayesiano se usó con el modelo de sustitución nucleotídica 4by4 para construir el árbol. El número posterior de cada nodo, indica la probabilidad posterior valuada en un millón de réplicas. Sirvieron como raíz secuencias de *Oceaninomonas doudoroffii* 749T, *Marinobacterium georgiense* 106746T y *Marinobacterium stanieri* 6847T.

Tabla 2. Tamizaje químico y biológico de los endófitos bacterianos de *P. auritum*.

Cepa	Género	% Identidad ^a	Organismo más cercano ^b	Parte de la planta de donde se asiló	% Inhibición de la formación de AGEs ^c
PA12*	<i>Pseudomonas</i>	98/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Flor	97.34 ± 0.3
PA26*	<i>Pseudomonas</i>	99/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Hoja	92.93 ± 0.3
PA11*	<i>Pseudomonas</i>	97/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Hoja	93.82 ± 0.7
PA19*	<i>Pseudomonas</i>	97/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Hoja	93.58 ± 0.3
PA14*	<i>Pseudomonas</i>	97/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Tallo joven	93.22 ± 0.4
PA25*	<i>Pseudomonas</i>	99/99	<i>P. protegens</i> / <i>P. protegens</i>	Tallo joven	92.34 ± 0.2
PA27*	<i>Pseudomonas</i>	97/98	<i>P. fulva</i> / <i>P. fulva</i>	Hoja	89.46 ± 0.1
PA1*	<i>Pseudomonas</i>	97/99	<i>P. fulva</i> / <i>P. fulva</i>	Flor	86.77 ± 0.5
PA20	<i>Agrobacterium</i>	99	<i>Agrobacterium</i> sp.	Hoja	80.05 ± 1.5
PA8	<i>Pantoea</i>	99	<i>Pantoea ananatis</i>	Tallo joven	78.93 ± 3.5
PA5	<i>Bacillus</i>	99	<i>Bacillus</i> sp.	Tallo joven	78.2 ± 3.8
PA3	<i>Pseudomonas</i>	96/97	<i>P. plecoglossicida</i> / <i>P. stutzeri</i>	Hoja	78.09 ± 2.9
PA15*	<i>Pseudomonas</i>	98/99	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. fulva</i>	Tallo joven	77.37 ± 3.3
PA2	<i>Xhantomonas</i>	97	<i>X. axonopodis</i>	Hoja	76.87 ± 2.1
PA9	<i>Pseudomonas</i>	97/98	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. entomophila</i>	Tallo joven	76.7 ± 3.6
PA4	<i>Pseudomonas</i>	99/97	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. syringae</i>	Tallo viejo	76.38 ± 1.8
PA10	<i>Bacillus</i>	99	<i>B. pumilus</i>	Tallo viejo	74.93 ± 4.3
PA7	<i>Agrobacterium</i>	99	<i>Agrobacterium</i> sp.	Hoja	73.59 ± 5.0
PA16	<i>Microbacterium</i>	99	<i>Microbacterium</i> sp.	Flor	73.33 ± 3.0
PA24	<i>Pseudomonas</i>	97/98	<i>P. putida</i> / <i>P. stutzeri</i>	Flor	65.73 ± 2.0
PA13	<i>Bacillus</i>	99	<i>B. thuringiensis</i>	Hoja	61.06 ± 6.37
PA6	<i>Stenotrophomonas</i>	99	<i>S. rhizophila</i>	Hoja	59.63 ± 0.7
PA18	<i>Pseudomonas</i>	97/97	<i>P. koreensis</i> / <i>P. entomophila</i>	Tallo joven	56.89 ± 0.25
PAA5	<i>Streptomyces</i>	99	<i>Streptomyces</i> sp.	Flor	56.77 ± 1.1
PAA6	<i>Streptomyces</i>	96	<i>Streptomyces</i> sp.	Flor	52.33 ± 1.5
PA21	<i>Enterobacter</i>	99	<i>Enterobacter</i> sp.	Hoja	5.28 ± 2.14
PA22	<i>Enterobacter</i>	99	<i>E. amnigenus</i>	Hoja	0.96 ± 1.31
PA23	<i>Enterobacter</i>	99	<i>Enterobacter</i> sp.	Hoja	0.21 ± 1.5

* Cepas seleccionadas para su secuenciación genómica (ver Tabla 6).

^a Identificación taxonómica basada en la secuencia de los genes conservados rRNA 16S /*rpoB*.

^b Asignación del organismo más cercano de acuerdo a la base de datos del NCBI.

^c Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs a través del Modelo BSA-Glucosa a partir del extracto orgánico de los endófitos. Los resultados son presentados como la media (±) del error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.

CAPITULO II

ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS *Pseudomonas* ENDÓFITAS DE *P. auritum*

Entre las 14 *Pseudomonas* endófitas preseleccionadas en el Capítulo I, nueve cepas pertenecientes a *P. protegens* (6) y *P. fulva* (3), fueron elegidas para secuenciar sus genomas con base a su destacada capacidad de inhibir la formación de AGEs *in vitro* (Tabla 1). Los genomas fueron ensamblados y anotados (Tabla 3, Anexos II al X), para su posterior análisis centrado en la búsqueda del clúster biosintético *phl* a través de antiSMASH (Weber *et al.*, 2015).

Tabla 3. Características de los genomas de *Pseudomonas* endófitas de *P. auritum*.

Genoma	ID NCBI	Tamaño del genoma (pb)	No. de contigs	No. de proteínas	RNAs totales	Contenido de GC (%)
<i>Pseudomonas protegens</i> PA11	PRJNA356314	6,978,909	20	6,327	55	63,4
<i>Pseudomonas protegens</i> PA12	PRJNA327129	6,990,049	11	6,327	67	63,4
<i>Pseudomonas protegens</i> PA14	PRJNA356318	6,986,565	11	6,324	64	63,4
<i>Pseudomonas protegens</i> PA19	PRJNA356317	6,986,104	11	6,323	62	63,4
<i>Pseudomonas protegens</i> PA25	PRJNA356319	6,986,790	8	6,321	66	63,4
<i>Pseudomonas protegens</i> PA26	PRJNA327131	6,986,019	12	6,317	62	63,4
<i>Pseudomonas fulva</i> PA1	PRJNA359501	5,457,532	18	4,820	59	63,1
<i>Pseudomonas fulva</i> PA15	PRJNA359503	5,498,827	61	4,994	63	63,1
<i>Pseudomonas fulva</i> PA27	PRJNA359513	5,400,277	64	4,796	68	63,1

La Tabla 3 muestra que los seis genomas pertenecientes a *P. protegens* (PA12, PA26, PA11, PA19, PA14 y PA25) tienen un tamaño de genoma y un contenido de CG similar (6.9 Mbp y 63.4%, respectivamente)). La minería genómica por medio de antiSMASH (Weber *et al.*, 2015), reveló la presencia de clústeres de genes de metabolitos secundarios conservados y bien caracterizados en el género de *Pseudomonas*. El clúster de genes que sintetiza al DAPG (1) (Figura 5), fue encontrado en los seis genomas, es decir, en todas las cepas de *P. protegens*

analizadas. Los nueve genes que conforman al clúster *phl*, denominados *phlACBDEFGHI* (Troppens *et al.*, 2013), se encontraron en todas las cepas de *P. protegens* con un porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica arriba del 90 %, lo que sugiere una alta conservación.

Por otro lado, los genomas de *P. fulva* (PA1, PA15 y PA27) mostraron un tamaño de genoma y un contenido de CG similar (5.4 Mbp y 63.1%, respectivamente) (Tabla 3). Resultados de antiSMASH revelaron pocos clústeres de genes biosintéticos para metabolitos secundarios (menos de cuatro). Además, el clúster de genes *phl* no fue encontrado sugiriendo que otros metabolitos secundarios son los responsables de la actividad antiAGEs mostrada en el Capítulo I.

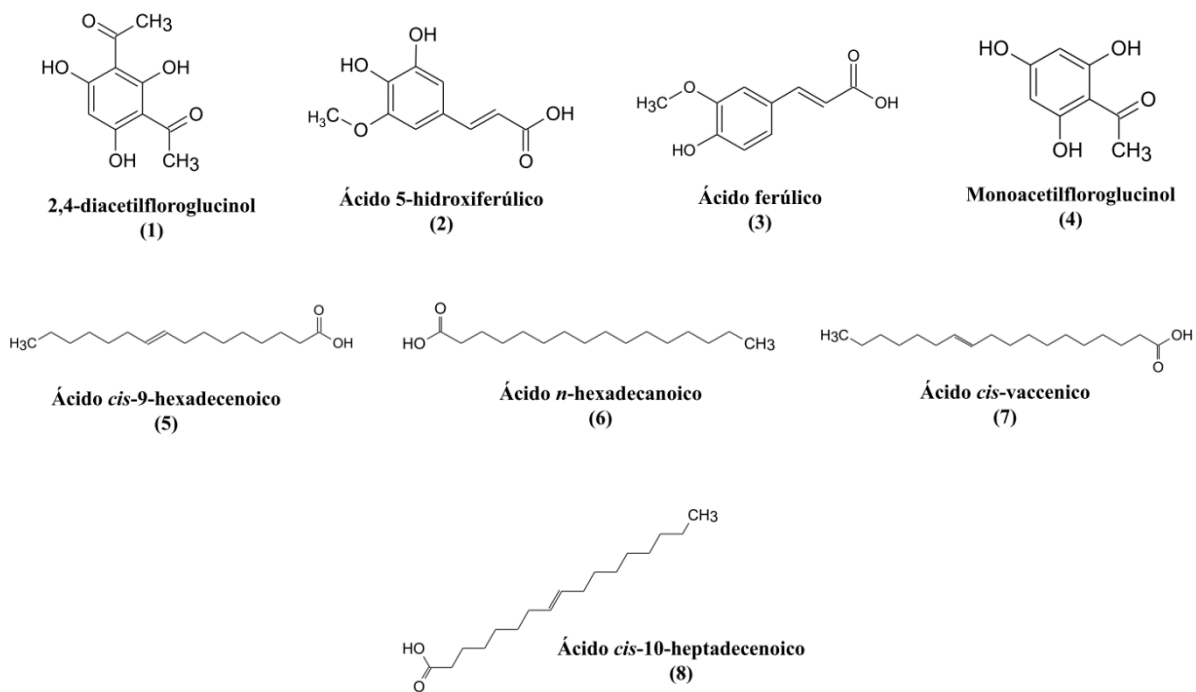


Figura 5. Estructuras químicas de metabolitos secundarios citados en este estudio.

CAPITULO III

DISTRIBUCIÓN A NIVEL GENÓMICO DEL CLÚSTER DE GENES BIOSINTÉTICOS DEL DAPG (GENES *phl*) Y SU HISTORIA EVOLUTIVA

En este capítulo se estudió la distribución taxonómica de los genes *phl* dentro del género de *Pseudomonas* a través de un estudio filogenómico robusto. El propósito fue entender la evolución del clúster de genes biosintéticos, para establecer su posible relación con la diversidad química que va más allá de la síntesis del DAPG.

Para el análisis filogenómico del clúster *phl*, fueron analizados 1,560 genomas de *Pseudomonas* disponibles en NCBI (Septiembre, 2015). Los genomas de *Pseudomonas* pertenecen a 47 especies diferentes, siendo *P. aeruginosa* la especie predominante (70%) (Anexo XVI). Sorprendentemente, el análisis filogenómico reveló que sólo 29 genomas (1.3%) contienen los genes *phl*, lo que demuestra la limitada distribución de este clúster; incluso cuando los datos son normalizados por el sesgo impuesto por *P. aeruginosa* (i.e., 7%, cuando se normalizó con el promedio de las especies).

Simultáneamente, se construyó un árbol filogenético de especies usando siete marcadores de proteínas conservadas (RpoD, GyrB, AcnB, PFK, GAP, PGI y RpoB), los cuales se han descrito de manera independiente como proteínas que proveen una buena resolución filogenética del género de *Pseudomonas* (Tayeb *et al.*, 2005). El árbol filogenético completo de 1560 *Pseudomonas* fue usado como guía para explorar la distribución de los genes *phl* dentro de los genomas, en dónde se identificaron organismos que no contienen este clúster (Anexo XVII). Una versión simplificada de este árbol de especies (Figura 11) fue construida con base en: (i) la omisión de los organismos que no contienen el clúster *phl* (por ejemplo, *P. aeruginosa*); (ii) la inclusión de organismos que no contienen el clúster *phl*, pero que están estrechamente relacionados con los organismos que si lo tienen, es decir; situados en el mismo clado (por ejemplo, *P. fluorescens*); y (iii) organismos taxonómicamente cercanos a los productores de DAPG situados en clados colapsados, los cuales no contienen los genes *phl* (por ejemplo, algunas cepas de *P. fluorescens*).

El árbol de especies simplificado de *Pseudomonas* en dónde se señala la distribución del clúster *phl*, está conformado por ocho linajes (Figura 11). Los linajes III, V, VI y VIII incluyen los organismos que contienen el clúster *phl*, mientras que los linajes restantes (I, II, IV y VII) pertenecen a los organismos filogenéticamente cercanos que carecen de estos genes. El linaje III incluye 14 organismos en total, los cuales pertenecen a tres especies diferentes: *P. fluorescens* (8), *P. brassicacearum* (4) y *P. chlororaphis* (1); el linaje V incluye sólo un organismo perteneciente a la especie *P. gingeri*; el linaje VI incluye 11 organismos pertenecientes a *P. fluorescens* (6) y *P. protegens* (5); y finalmente el linaje VIII incluye cinco organismos pertenecientes a dos especies, *P. alcaligenes* (3) y *P. protegens* (1).

La Figura 11 muestra que el 100% de los organismos pertenecientes a la especie *P. protegens* contiene el clúster *phl*, lo cual contrasta con su limitada ocurrencia en *P. chlororaphis* (14%) y *P. fluorescens* (17%), en dónde ha sido reportado previamente (Fenton *et al.*, 1992; Banger y Tomashow, 1996; Takeuchi *et al.*, 2014; Bankhead *et al.*, 2016). Además, el análisis filogenómico reveló organismos que pertenecen a otras especies que contienen los genes *phl*, como *P. alcaligenes* (1), *P. gingeri* (1), y *P. brassicacearum* (3). Algunas cepas pertenecientes a estas especies, pero cuyos genomas no han sido secuenciados, se han descrito como productoras de DAPG (Deng *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2012; Brucker *et al.*, 2008), sugiriendo que esos linajes podrían tener una alta ocurrencia del clúster *phl*. Los resultados sugieren que la síntesis del DAPG de cepas diferentes a las del presente trabajo está restringida principalmente a algunas de especies de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera, en dónde se ha comprobado que confiere una serie de beneficios al hospedero (Troppens *et al.*, 2009).

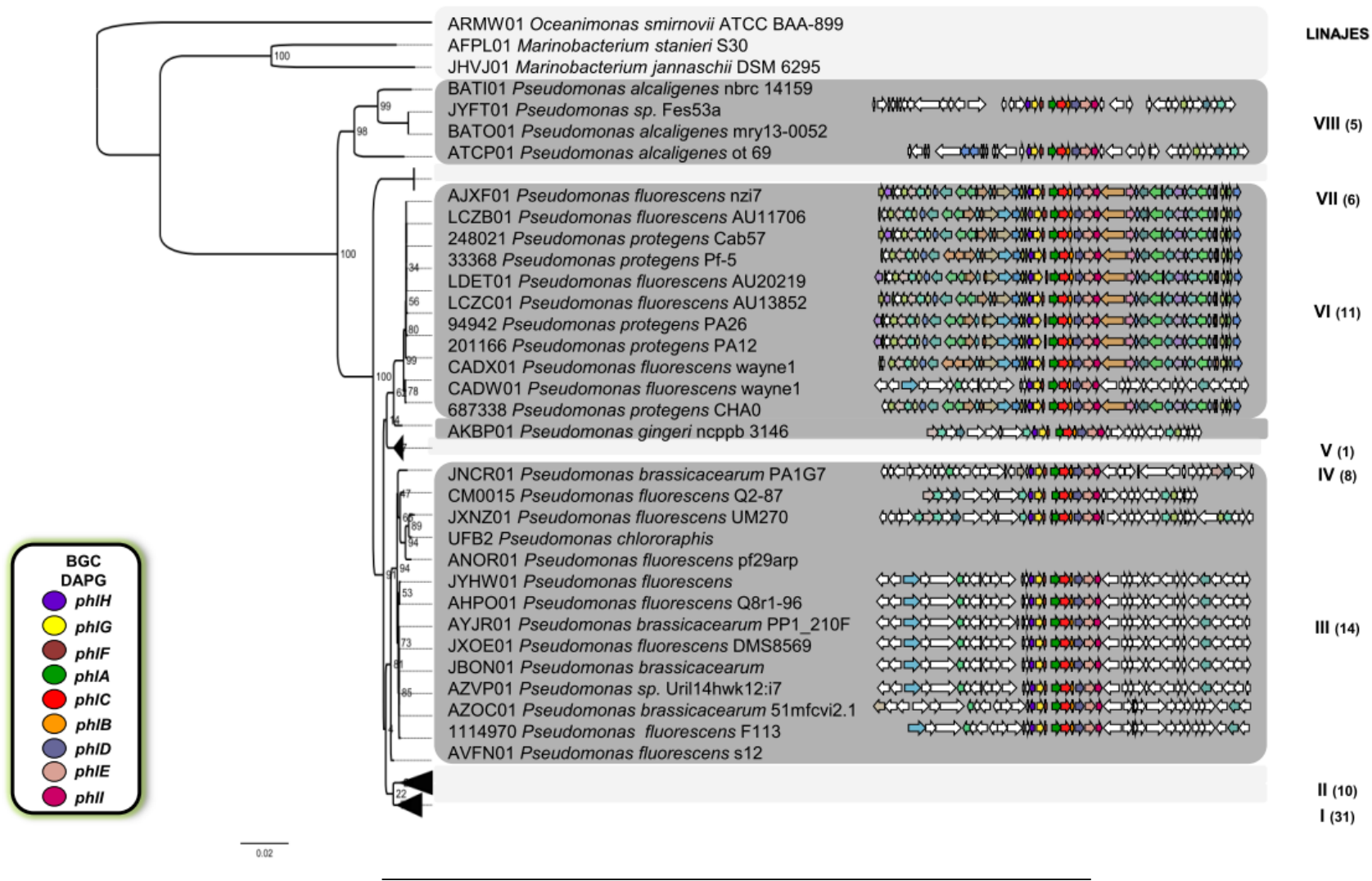


Figura 6. Árbol filogenético de especies del género de *Pseudomonas* construido con una matriz concatenada de siete proteínas (RpoD, GyrB, AcnB, PFK, GAP, PGI y RpoB). El árbol fue construido a través de un método Bayesiano con el método LG. El número que se muestra en cada nodo indica la probabilidad posterior valuada en 1,000,000 réplicas. Las secuencias de *Oceanimonas doudoroffii* 749T, *Marinobacterium georgiense* 106746T y *Marinobacterium stanieri* 6847T fueron usadas como raíz. Una versión expandida de este árbol está incluida en la sección de anexos (Anexo XVII). El clúster *phl*, el cual muestra una ocurrencia clado-específica (linajes III, V, VII y VIII), se muestra al lado del árbol. El número (#) indicado en cada linaje se refiere al número de organismos incluidos en cada claro.

Por otro lado, para entender la evolución de los genes *phl* y su posible relación con la diversidad química que va más allá de la síntesis del DAPG, se construyó un árbol filogenético con las proteínas ortólogas conservadas que conforman el clúster *phl* de los 29 genomas de *Pseudomonas*. Para ello, se analizaron 30 genes río arriba y abajo del gen *phlD* de cada organismo, a través del mejor hit bidireccional (BBH). Las proteínas PhlACBDEFGHI, codificadas por los genes *phl*, fueron confirmadas como las únicas proteínas ortólogas conservadas en este sistema biosintético. A partir de éstas, se construyó una matriz concatenada para la construcción del árbol filogenético (Figura 12).

El árbol filogenético basado en las proteínas Phl revela una notoria divergencia de las enzimas que sintetizan el DAPG. Además, muestra la existencia de dos clados discretos, formados por los linajes III y VIII, y los linajes V y VI, respectivamente. Cabe resaltar, que sólo los organismos *P. fluorescens wayne1* y *P. brassicacearum* PP1_210F mostraron una incongruencia topológica respecto al árbol de especies, es decir, aparecen junto con organismos del linaje III en lugar del linaje VI, y viceversa, respectivamente.

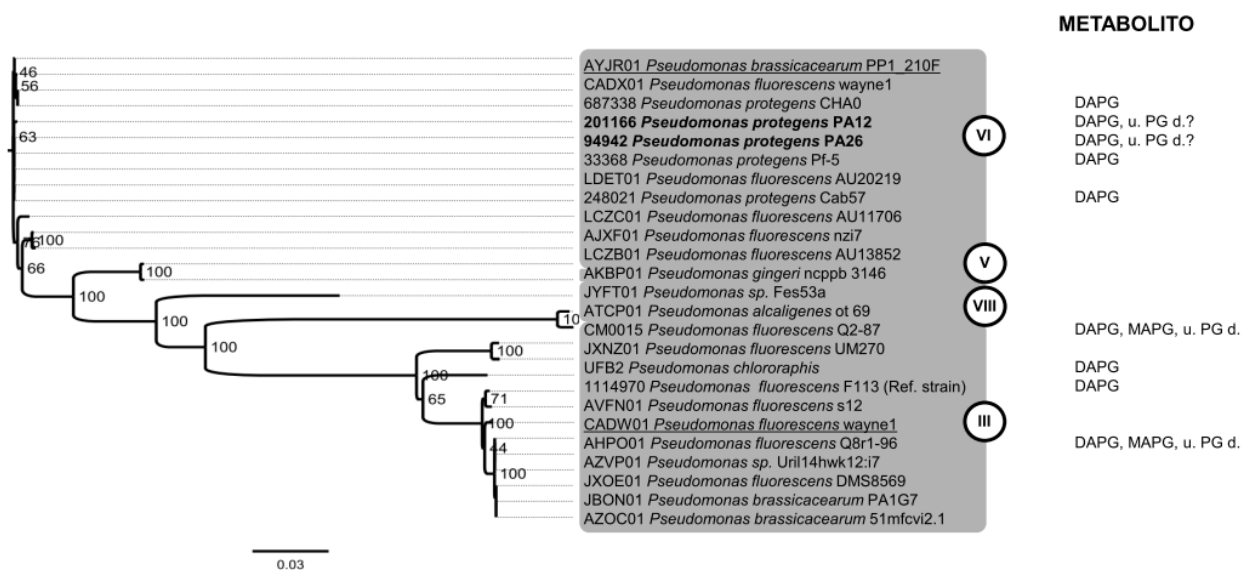


Figura 7. Reconstrucción filogenética basada en las proteínas ortólogas del clúster *phl*. El árbol fue construido usando el algoritmo Neighbor-Joining. El número que se encuentra en cada nodo indica el valor del *bootstrap* de 1,000,000 réplicas. La nomenclatura de los linajes (III, VIII, V y VI) es de acuerdo a la Figura XX. Las únicas dos cepas que muestran incongruencia topológica con el árbol de especies de la Figura 20 se muestran subrayadas. PA12 se muestra en negritas. La ocurrencia del DAPG y sus congéneres basada en la literatura (McSpadden *et al.*, 2001) se muestra a la derecha del árbol. DAPG, MAPG y derivados del floroglucinol no caracterizados (u. PG d.)

Estudios recientes sobre la diversidad genética de microorganismos productores de DAPG, han provisto de información relevante para el análisis del árbol basado en las proteínas Phl. Las cepas Q8r1-96, F113 y Q2-87 (Linaje III), y CHA0 y Pf-5 (Linaje VI), han mostrado tener cierta divergencia en sus genes *phlD*. Notablemente, estas cepas tienen la capacidad de sintetizar diferentes congéneres de DAPG, como el monoacetilfloroglucinol (MAPG) (4) (Figura 5); y tres compuestos derivados del floroglucinol no caracterizados (u. PG d.) (McSpadden *et al.*, 2001). Por lo tanto, esto sugiere que la divergencia evolutiva de genes biosintéticos altamente conservados como lo son los genes *phl*, podría estar relacionada con la diversidad química reportada previamente.

Así, la enzima PhlD, una PKS tipo III, representa una razonable fuente de diversidad química asociada con sus características intrínsecas, como la capacidad de incorporar diferentes sustratos derivados de la acil-CoA y su forma peculiar de ciclarlos (Song *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2009). Por lo tanto, por las particularidades inherentes a las PKSs tipo III, es posible que la enzima PhlD pueda sintetizar una gran variedad de congéneres de DAPG.

Bajo este contexto, la ruta para la síntesis del DAPG no ha sido completamente elucidada (Troppens *et al.*, 2013). Ésta inicia con la típica descarboxilación y condensación de tres unidades de malonil-CoA por la enzima PhlD para formar un intermediario heptacétido lineal (poly- β -cetometileno). El heptacétido después de subsecuentes descarboxilaciones seguidos de la ciclación vía Claisen da lugar a la formación del DAPG. De acuerdo a las características intrínsecas de las PKSs tipo III, la formación del DAPG podría seguir tres rutas. En la primera ruta (Figura 13A), las condensaciones iterativas vía Claisen de las tres unidades de malonil-CoA ocurren del C-1 al C-7, formando el floroglucinol (PG) (5) (Figura 5). Un complejo proteico (PhlACB), asignado como aciltransferasas, transfiere subsecuentemente dos grupos acilos en la posición C4 y C6 del PG, formando al DAPG como principal producto. En la segunda ruta (Figura 13B), las condensaciones iterativas vía Claisen de las tres unidades de malonil-CoA podrían ocurrir del C-7 al C-1, generando un anillo tipo floroglucinol altamente inestable. Después de una descarboxilación oxidativa, el grupo carbonilo es removido de la molécula, formando un carbanión con el desprendimiento de una molécula de dióxido de carbono. La incorporación del grupo acilo por el complejo proteico PhlACB podría ocurrir a través de un ataque nucleofílico al carbón electrofílico para formar, en primera instancia el

MAPG y subsecuentemente el DAPG. Finalmente, la tercera ruta (Figura 13C), podría ocurrir después de la ciclación iterativa vía Claisen del C-7 al C-1 para formar el anillo tipo floroglucinol con un grupo carbonilo en la posición C6. La incorporación del grupo acetilo en C4 por PhlACB podría dar origen a otro congénere del DAPG, el 2-carbonil,4-acil-floroglucinol 3(1).

Por otro lado, la enzima PhlD podría sintetizar el ácido 5-hidroxiferúlico (OH-FA) (3), un isómero del DAPG (Figura 5), el cual fue identificado por LR-MS en el extracto orgánico de la cepa PA12 (Capítulo IV). La síntesis del OH-FA podría llevarse a cabo incorporando dos unidades de malonil-CoA, una metoxi-malonil-ACP o hidroxí-malonil-ACP; y finalmente otra unidad de hidroxí-malonil-ACP (Figura 23). Primeramente, los intermediarios lineales llamados 2-hidroxí,4-metoxí-nonacétido o el 2,4-hidroxí-nonacétido, son originados posteriormente a la descarboxilación y condensación de las unidades derivadas de acil-CoA. A partir de estos, el OH-FA puede sintetizarse a través de dos posibles rutas. En la primer ruta (Figura 14A), posteriormente a las reacciones de descarboxilación y ciclaciones tipo Claisen, el 2-hidroxí,4-metoxí-nonacétido puede formar el 2-hidroxí-4-metoxí-6-propanodiol-1,2,3,5-ciclohenanotriona. Este intermediario puede dar origen al 4-metoxí-6-propanodiol-1,3,5-tetrahidroxibenceno, a través de una reacción de tautomerización. Finalmente, tras reacciones de reducción y oxidación, puede originarse el OH-FA. En la segunda ruta (Figura 14B), posteriormente a las reacciones de descarboxilación y ciclaciones tipo Claisen, el 2,4-hidroxí-nonacétido puede formar la 2,4-hidroxí-6-propanodiol-1,2,5-ciclohenanotriona. Este intermediario puede formar el 6-propanodiol-1,2,3,4,5-pentahidroxibenceno, a través de una reacción de tautomerización. Una enzima *O*-metiltransferasa puede atacar el C4 para generar el grupo metoxí, conduciendo a la formación del compuesto 4-metoxí-6-propanodiol-1,2,3,5-tetrahidroxibenceno, el cual tras reacciones de reducción y oxidación, puede originar el OH-FA.

Con base en estas posibles rutas de síntesis propuestas para el DAPG y OH-FA, la síntesis de isómeros del DAPG podría ser plausible y merece ser estudiada más a fondo.

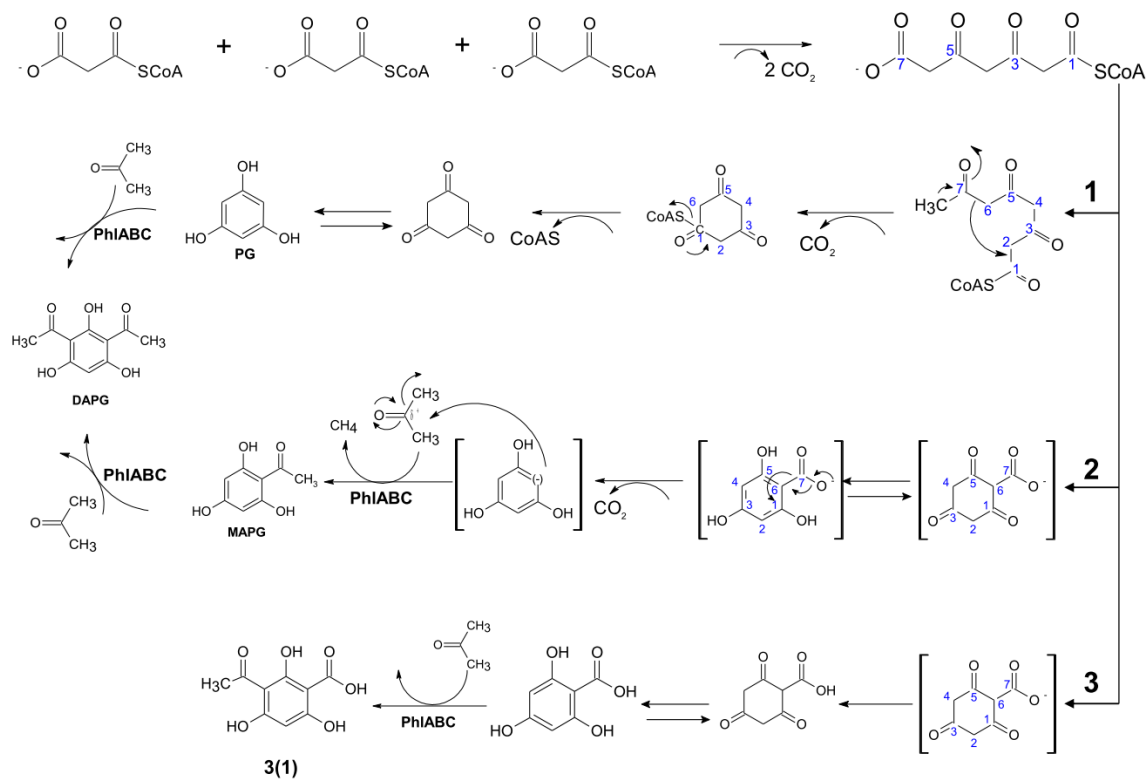


Figura 8.- La síntesis del DAPG inicia con la típica descarboxilación y condensación de tres unidades de malonil-CoA por la enzima PhlD para formar un intermediario heptacétido lineal (poly-β-cetometileno). El heptacétido después de subsecuentes descarboxilaciones seguidos de la ciclación vía Claisen da lugar a la formación del DAPG. De acuerdo a las características intrínsecas de las PKSs tipo III, la formación del DAPG podría seguir tres rutas. **A.** Las condensaciones iterativas vía Claisen de las tres unidades de malonil-CoA ocurren del C-1 al C-7, formando el PG. El complejo proteico (PhlACB) transfiere subsecuentemente dos grupos acilo en la posición C4 y C6 del PG, formando al DAPG. **B.** Las condensaciones iterativas vía Claisen de las tres unidades de malonil-CoA podrían ocurrir del C-7 al C-1, generando un anillo tipo floriglucinol altamente inestable. Después de una descarboxilación oxidativa, el grupo carbonilo es removido de la molécula, formando un carbanión con el desprendimiento de una molécula de dióxido de carbono. La incorporación del grupo acilo por el complejo proteico PhlACB podría ocurrir a través de un ataque nucleofílico al carbón electrofílico para formar, en primera instancia el MAPG y subsecuentemente el DAPG. **C.** La síntesis del DAPG podría ocurrir después de la ciclación iterativa vía Claisen del C-7 al C-1 para formar el anillo tipo floriglucinol con un grupo carbonilo en la posición C6. La incorporación del grupo acetilo en C4 por PhlACB podría dar origen a otro congénere del DAPG, el 2-carbonil, 4-acil-floriglucinol 3(1).

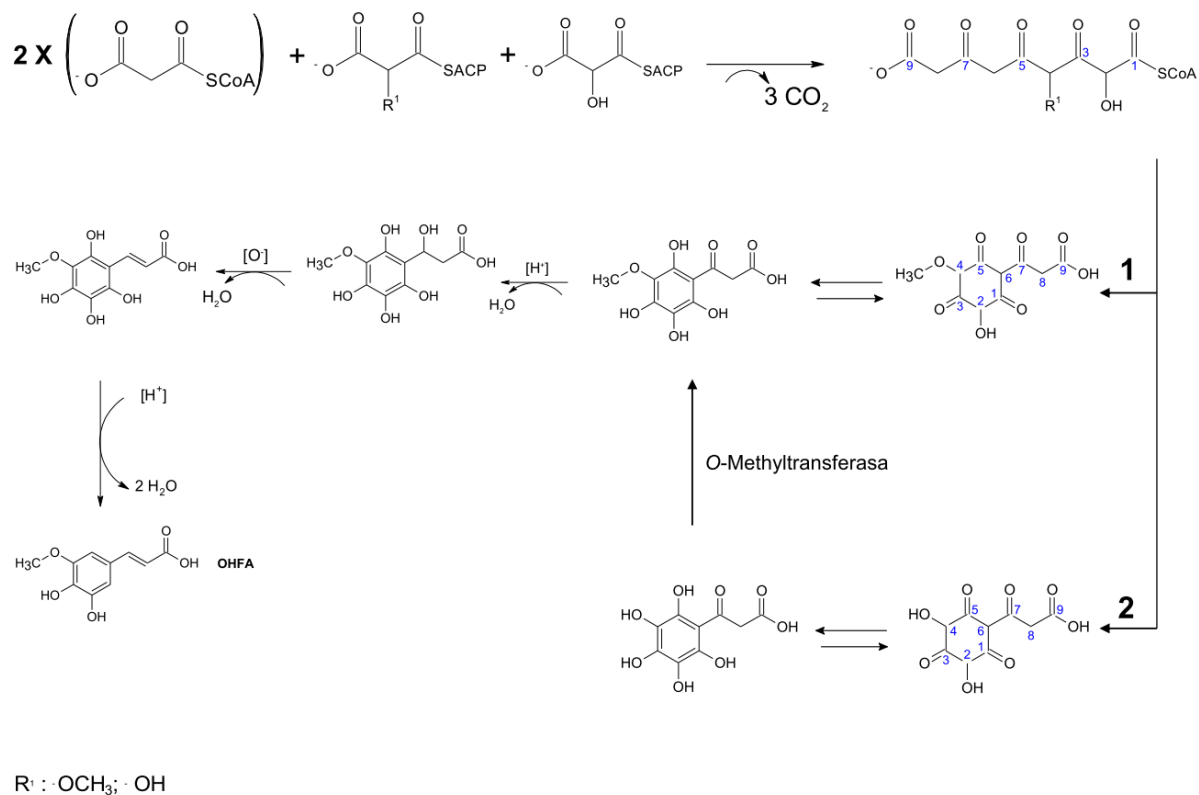


Figura 9. La síntesis del OH-FA podría llevarse a cabo incorporando dos unidades de malonil-CoA, una metoxi-malonil-ACP o hidroximalonil-ACP; y finalmente otra unidad de hidroximalonil-ACP. Primeramente, los intermediarios lineales llamados 2-hidroxi,4-metoxinonacétido o el 2,4-hidroxi-nonacétido, son originados posteriormente a la descarboxilación y condensación de las unidades derivadas de acil-CoA. A partir de estos, el OH-FA puede sintetizarse a través de dos posibles rutas. **A.** Posteriormente a reacciones de descarboxilación y ciclaciones tipo Claisen, el 2-hidroxi,4-metoxinonacétido puede formar el 2-hidroxi-4-metoxi-6-propanodiol-1,2,3,5-ciclohexanotrión. Este intermediario puede dar origen al 4-metoxi-6-propanodiol-1,3,5-tetrahidroxibenceno a través de una reacción de tautomerización. Finalmente, tras reacciones de reducción y oxidación, puede originarse el OH-FA. **B.** Posteriormente a reacciones de descarboxilación y ciclaciones tipo Claisen, el 2,4-hidroxi-nonacétido puede formar el 2,4-hidroxi-6-propanodiol-1,2,5-ciclohexanotrión. Este intermediario puede formar el 6-propanodiol-1,2,3,4,5-pentahidroxibenceno a través de una reacción de tautomerización. Una enzima *O*-metiltransferasa puede atacar el C4 para generar el grupo metoxi, conduciendo a la formación del compuesto 4-metoxi-6-propanodiol-1,2,3,5-tetrahidroxibenceno, el cual, tras reacciones de reducción y oxidación, puede originar el OH-FA.

CAPITULO IV

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL METABOLITO SECUNDARIO CON ACTIVIDAD ANTIAGEs POR TÉCNICAS QUÍMICAS

Este capítulo está enfocado al aislamiento e identificación del metabolito secundario responsable de inhibir la formación de AGEs en el extracto obtenido de *P. protegens* PA12. En primer lugar, se obtuvieron 7.4 g de extracto orgánico de PA12 (EPA12), a partir de 60 litros de medio fermentado. El extracto fue fraccionado cinco veces por cromatografía y cada fracción obtenida fue analizada para determinar su capacidad de inhibir la formación de AGEs (Figura 10).

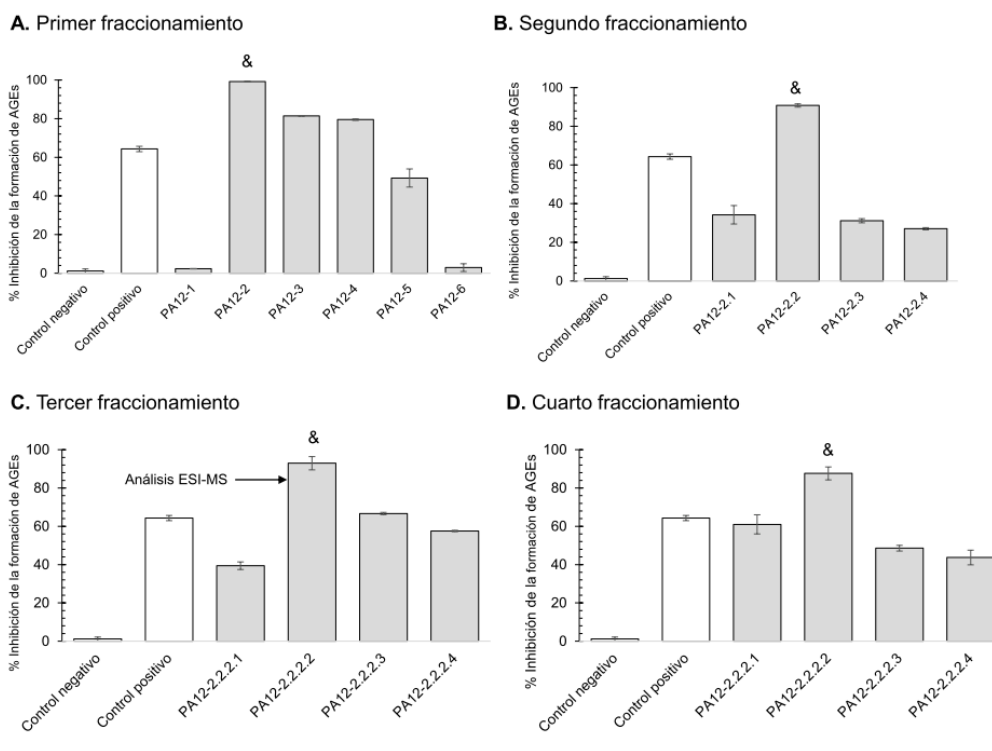


Figura 10. Inhibición de la formación de AGEs de las fracciones obtenidas en cada etapa de fraccionamiento del EPA12 por CC, determinada a través del modelo BSA-Glucosa (Brownlee *et al.*, 1995). La aminoguanidina (10 mM) fue usada como control positivo, mientras que el extracto orgánico obtenido del medio S7 fue utilizado como control negativo. Los resultados son presentados como la media \pm SEM (del error estándar de la media) de tres experimentos separados. Después del tercer fraccionamiento, la fracción PA12-2.2.2 fue analizada a través de LR-MS, en dónde se sugirió la presencia del OH-FA. (&) Fracciones seleccionadas.

En el quinto fraccionamiento de la fracción PA12-2.2.2.2 se obtuvieron siete sub-fracciones, entre las cuales dos inhibieron la formación de AGEs por arriba del control positivo (aminoguanidina 10 mM) (Figura 11). La fracción PA12-2.2.2.2.1 presentó la mayor actividad, inhibiendo la formación de AGEs en un $83 \pm 2\%$. Curiosamente, el DAPG ($C_{10}H_{10}O_5$) (**1**), un policétido de tipo fenólico, resultó ser el principal responsable de inhibir la formación de AGEs. La identificación del DAPG se realizó a través de CG-MS-MS y ESI MS-MS, en donde las señales obtenidas para el DAPG aislado de la cepa PA12 (DAPG_PA12), fueron idénticas a los espectros obtenidos utilizando el estándar (DAPGs), además de los reportados en la literatura (Anexos XII y XIII) (Ramette *et al.*, 2011).

El DAPG_PA12 y el DAPGs fueron marcadamente más activos ($EC_{50} 31 \pm 3 \mu\text{g/ml}$) que la aminoguanidina ($EC_{50} 236 \mu\text{g/ml}$) y del mismo orden de magnitud que el extracto hidroalcohólico obtenido de hojas de *P. auritum* ($EC_{50} 20.1 \mu\text{g/ml}$) (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012). El DAPG independientemente de su origen, inhibió la formación de AGEs en un grado mayor que cualquier otro congénere del DAPG derivado de planta, como las dihidro-chalconas y algunos derivados del floroglucinol, reportados previamente (Ođjakova *et al.*, 2012). El DAPG ha sido reportado como un compuesto canónico del género de *Pseudomonas*, que está íntimamente asociado con un rol ecológico, es decir, favorece el crecimiento de la planta y de raíces radicales, así como también inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y nematodos (Troppens *et al.*, 2013; Marchand *et al.*, 2000; Ramette *et al.*, 2011). Sin embargo, este trabajo y el de nuestro grupo han conducido al descubrimiento por primera vez de la potente actividad antiAGEs del DAPG (Neira Gonzalez, 2015; Gutiérrez-García *et al.*, 2017).

Por otro lado, la segunda fracción obtenida del quinto fraccionamiento (PA12-2.2.2.2.2), presentó una actividad antiAGEs del $66 \pm 1\%$ (Figura 16). El análisis de esta fracción a través CG-MS/MS reveló la presencia de cuatro ácidos grasos identificados como: (i) ácido *cis*-9-hexadecenoico (**5**), (ii) ácido *n*-hexadecanoico (**6**), (iii) ácido *cis*-vacénico (**7**), y (iv) ácido *cis*-10-heptadecanoico (**8**) (Anexo XIV). Cabe mencionar, que solamente se obtuvieron trazas de la mezcla de los ácidos grasos, lo cual impidió su purificación y análisis por separado. Algunos ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, aislados a partir de plantas y algas, han mostrado la capacidad de inhibir la formación de AGEs, tales como el ácido linoleico, ácido araquidónico, ácido palmitoleico, ácido oleico y el ácido eicosapentaenoico, (Ođjakova *et al.*,

2012). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, ninguno de los ácidos grasos identificados en este estudio han sido reportados como inhibidores de la formación de AGEs.

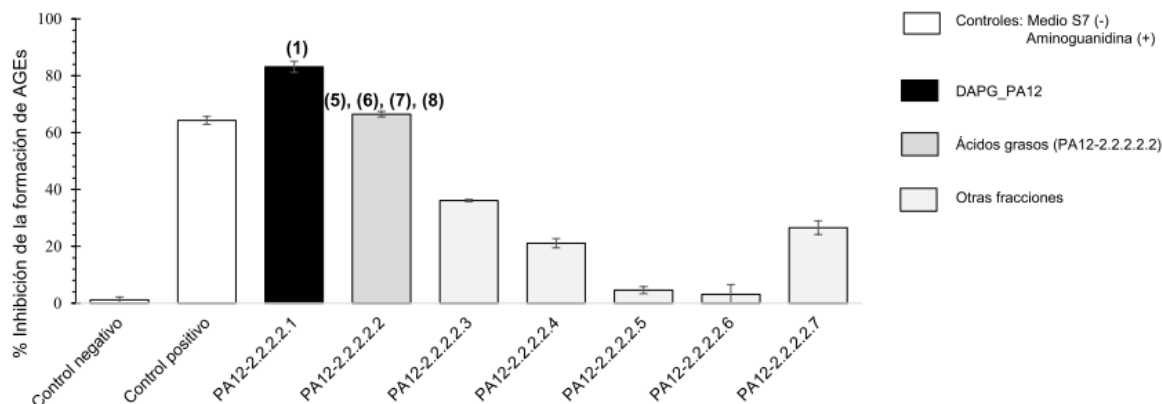


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs de las siete fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de PA12-2.2.2.2 por TLC semipreparativa, determinado a través del modelo BSA-Glucosa (Brownlee *et al.*, 1995). Dos fracciones con una alta actividad antiAGEs fueron identificados que corresponden a: (i) el DAPG (1) con un $83 \pm 2\%$ de actividad; y (ii) una mezcla de ácidos grasos (5), (6), (7) y (8); con una actividad del $66 \pm 1\%$. La aminoguanidina (10 mM) y el extracto orgánico obtenido del medio S7 fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente. Los resultados son presentados como la media \pm SEM (error estándar de la media) de tres experimentos independientes.

Notablemente, después del tercer fraccionamiento del extracto orgánico de PA12 (EPA12) un análisis a través de LR-MS sugirió la presencia del OH-FA ($C_{10}H_{10}O_5$) (2), un isómero estructural del DAPG (Figura 5, Figura 15, Anexo XV). El OH-FA está estructuralmente relacionado con derivados del ácido cinámico, algunos de ellos como el ácido ferúlico, han mostrado actividad antiAGEs (Ođjakova *et al.*, 2012). La ruta de síntesis de estos metabolitos secundarios sólo se ha reportado en las plantas a través de la ruta del ácido shikímico (Dixon *et al.*, 2012), por lo que una vía bacteriana que conduzca a la síntesis de cualquiera de estos metabolitos podría ser una posibilidad interesante para ser estudiada.

En el Capítulo III, se mencionó que la divergencia evolutiva del clúster *phl*, podría estar relacionada con la síntesis de congéneres de DAPG. Esta idea es reafirmada al encontrar fuertes indicios de la presencia del OH-FA, un isómero del DAPG, en el extracto orgánico obtenido de la cepa PA12. Lamentablemente, el OH-FA no pudo ser purificado por actividad, por lo cual no se obtuvo la elucidación estructural definitiva. Sin embargo, análisis de la

actividad antiAGEs *in vitro*, utilizando estándares, también sugieren la presencia del OH-FA de manera indirecta (Capítulo V).

CAPITULO V

ACTIVIDAD ANTIAGEs Y SU MECANISMO DE ACCIÓN DEL DAPG Y SUS CONGÉNERES

Con el propósito de tener una visión general sobre la actividad antiAGEs de los compuestos identificados en el capítulo anterior, los estándares de cada compuesto fueron evaluados usando el modelo BSA-Glucosa (Brownlee *et al.*, 1995). En este capítulo, se incluyó un derivado del ácido cinámico conocido como ácido ferúlico (ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico) (C₁₀H₁₀O₄) (FA) (**3**) (Figura 5), cuya capacidad para inhibir la formación de los AGEs es controvertida (Adisakwattana *et al.*, 2012). Los compuestos (**1**), (**2**) y (**3**) se utilizaron para generar cuatro mezclas, incluyendo todas las combinaciones posibles; además también fue evaluada la mezcla de los cuatro ácidos grasos. La aminoguanidina y el extracto orgánico del medio S7 fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente.

El DAPG (**1**), independientemente de su origen, inhibió la formación de AGEs en un grado similar ($84 \pm 1\%$), es decir en mayor grado respecto a la aminoguanidina ($p < 0.05$, $64 \pm 1\%$). Inesperadamente, la actividad antiAGEs del DAPG fue ligeramente inferior a la del extracto EPA12. La mezcla de los cuatro ácidos grasos (1 mg/ml) inhibió la formación de AGEs ($66 \pm 1\%$) de manera similar al control positivo. Finalmente, cuando el FA (**2**) y OH-FA (**3**) fueron probados por separado, su actividad antiAGEs fue pequeña ($p < 0.05$, $6 \pm 4\%$ y $7 \pm 5\%$, respectivamente) (Figura 12).

Dos incrementos considerables de la actividad fueron observados en estos experimentos. El primer caso con la mezcla del DAPG con el OH-FA, la cual mostró inhibir la formación de AGEs en un $98 \pm 1\%$, teniendo una diferencia significativa con respecto a la actividad antiAGEs del DAPG ($p < 0.05$). Este resultado concuerda con la observación de la reducción de la actividad antiAGEs de la fracción PA12-2.2.2 (de $96 \pm 3\%$ a $87 \pm 3\%$), en la que se sugirió la presencia del OH-FA (Figura 15).

El segundo caso es la mezcla del OH-FA con el FA, la cual mostró una actividad inhibitoria incrementada ($57 \pm 3\%$) con respecto a cualquiera de los compuestos cuando actúan

de forma independiente. No obstante, su actividad antiAGEs estuvo aún por debajo del control positivo. Aunque la combinación de los tres compuestos no condujo a un aumento de la actividad inhibitoria, los resultados anteriores muestran que el DAPG y sus congéneres pueden actuar conjuntamente para potenciar la actividad antiAGEs.

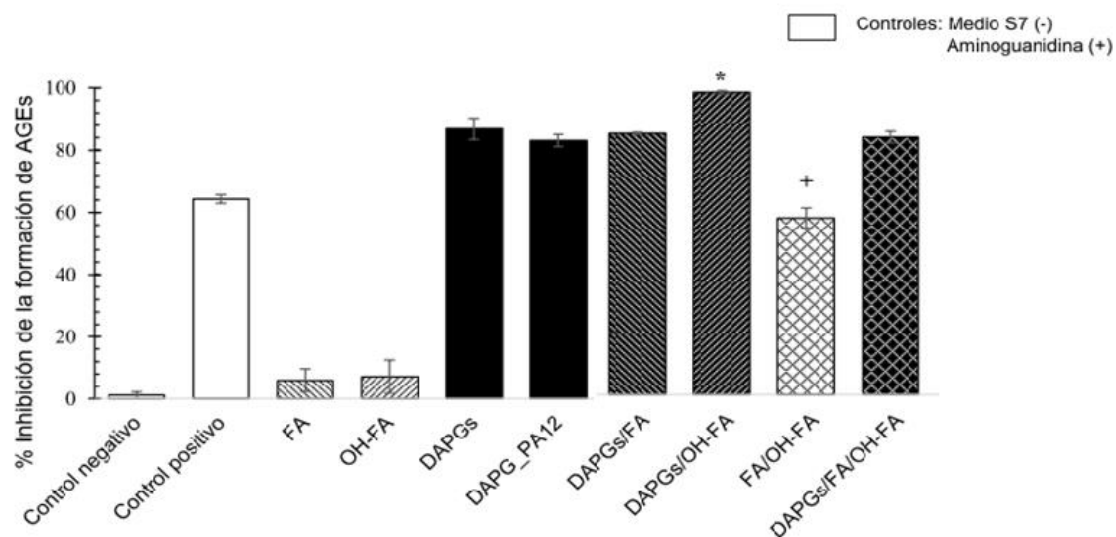


Figura 12. Evaluación de la actividad antiAGEs del DAPG, sus congéneres, sus posibles mezclas, y los ácidos grasos identificados previamente. (* $p \leq 0.05$ comparado con la actividad inhibitoria de todas las formas de DAPG; $^+p \leq$ comparado con la actividad inhibitoria del FA y OH-FA, por separado; ANOVA de un solo factor seguido de la prueba de Tukey–Kramer). La aminoguanidina (10 mM) fue usada como control positivo, mientras que el extracto orgánico obtenido del medio S7 fue utilizado como control negativo. Los resultados son presentados como la media \pm SEM (del error estándar de la media) de tres experimentos separados.

Por otro lado, se realizaron experimentos usando tres ensayos distintivos, para conocer el mecanismo de acción de los compuestos (1), (2) y (3) en cuanto a su capacidad de inhibir la formación de AGEs. Cada panel de la Figura 13 muestra el efecto de los compuestos ensayados sobre la formación de AGEs, de acuerdo a: (i) el ensayo de la hidroxilación del benzoato (Figura 13A), el cual mide indirectamente la autooxidación de azúcares reductores responsables de iniciar y propagar la formación de AGEs en presencia de metales de transición y oxígeno; (ii) el ensayo de fructosamina (Figura 13B), que mide la formación de productos de Amadori a través de bases de Schiff; y (iii) el ensayo del MGO (Figura 13C), que mide la formación de AGEs derivados de compuestos α -dicarbonilos.

Los resultados del ensayo de la hidroxilación del benzoato indican que el DAPG, independientemente de su origen, inhibe fuertemente la autooxidación de azúcares ($90 \pm 1\%$), y notablemente por encima de la aminoguanidina ($59 \pm 1\%$). El OH-FA y el FA, cuando se ensayaron por separado mostraron poca actividad ($17 \pm 2\%$ y $19 \pm 6\%$, respectivamente). Sin embargo, la mezcla de estos compuestos inhibió $49 \pm 6\%$ la autooxidación de azúcares, i.e., en mezcla aumentaron su actividad. Esta observación sugiere que el incremento de la actividad mostrada en la Figura 12 de la mezcla FA/OH-FA, se debe principalmente a la inhibición de la autooxidación de azúcares reductores. Finalmente, las mezclas de DAPGs/FA y DAPGs/OH-FA mostraron una actividad similar ($55 \pm 2\%$ y $50 \pm 6\%$, respectivamente), lo que indica que el FA y el OH-FA inhiben la actividad antioxidante del DAPG. Esta interpretación se refuerza al observar que la mezcla DAPGs/FA/OH-FA presentó una actividad inhibitoria aún más baja ($22 \pm 2\%$), y próxima a la del FA y OH-FA cuando se probaron por separado.

Los resultados del ensayo de fructosamina muestran que el DAPG, independientemente de su origen, inhibe menos la formación de productos de Amadori ($53 \pm 3\%$) que la aminoguanidina ($65 \pm 2\%$). Los compuestos OH-FA y FA mostraron por separado poca actividad inhibitoria ($19 \pm 2\%$ y $16 \pm 3\%$, respectivamente). Notablemente, la mezcla del DAPG con el OH-FA, previamente identificada como una de las mezclas con notable actividad antiAGEs (Figura 12), inhibió considerablemente la formación de productos de Amadori ($75 \pm 3\%$). Las mezclas del DAPGs/FA, FA/OH-FA y DAPGs/FA/OH-FA, así como los compuestos por separado FA y OH-FA; todos mostraron una escasa capacidad para inhibir la formación de productos de Amadori (alrededor de $15 \pm 1\%$).

Finalmente, los resultados del ensayo del MGO mostraron que el DAPG, independientemente de su origen, inhibe la formación de compuestos α -dicarbonilos ($86 \pm 3\%$) en un grado mayor que la aminoguanidina ($74 \pm 3\%$). Esta actividad inhibitoria no se incrementó después de la adición de cualquiera de los congéneres. Finalmente, el OH-FA y el FA, junto con su mezcla, mostraron poca actividad ($7 \pm 1\%$, $10 \pm 4\%$ y $12 \pm 5\%$, respectivamente).

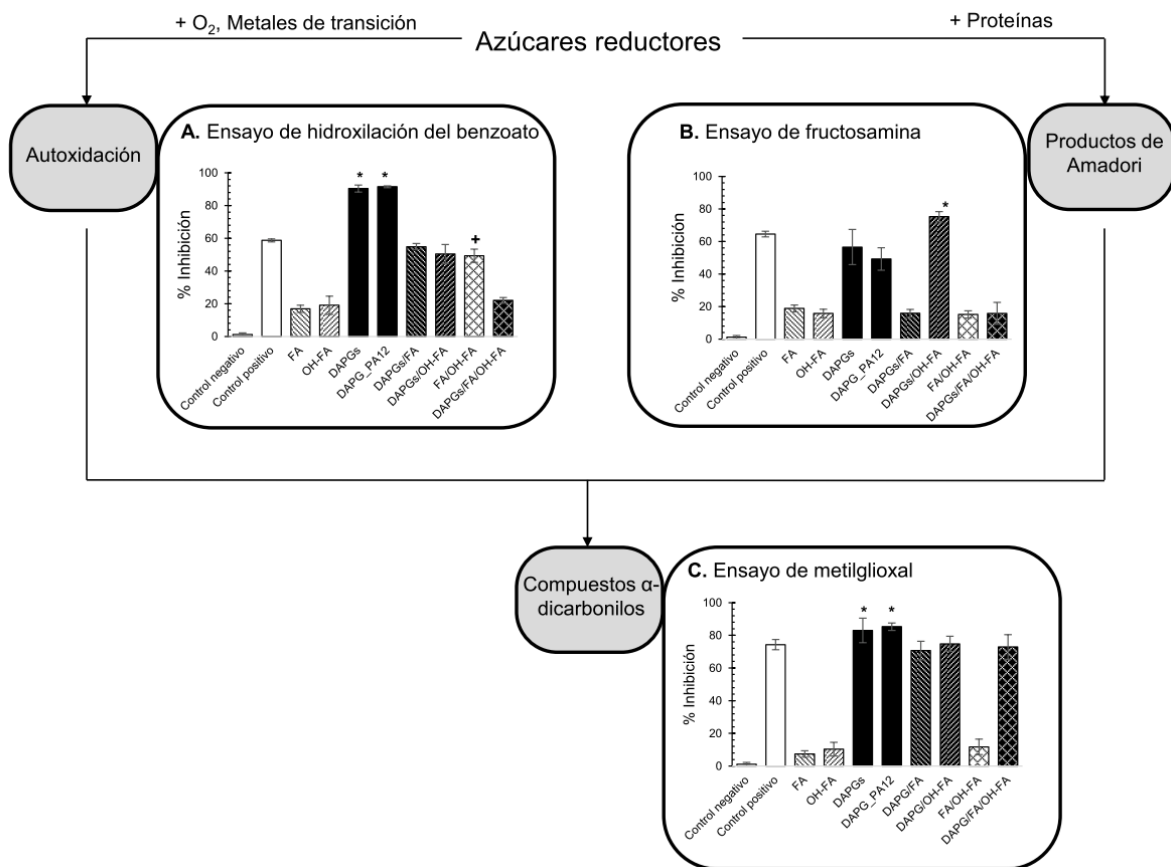


Figura 13. Mecanismos de inhibición de la formación de AGEs mediados por el DAPG y sus congéneres. **A.** Ensayo de la hidroxilación del benzoato. **B.** Ensayo de fructosamina. **C.** Ensayo del MGO. La aminoguanidina (10 mM) fue usada como control positivo, mientras que el extracto orgánico del medio S7 sirvió como control negativo. ANOVA de un factor seguida por la prueba Tukey–Kramer fueron realizadas. Los resultados se presentan como la media ± SEM (error estándar de la media) de tres experimentos independientes.

CONCLUSIONES

- ❖ En el género de *Pseudomonas*, la distribución a nivel genómico del clúster de genes biosintéticos del DAPG, genes *phl*, es limitada.
- ❖ Sólo algunas cepas pertenecientes a *P. protegens*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. brassicacearum*, *P. chlororaphis* y *P. gingeri* poseen el cluster de genes.
- ❖ El clúster está altamente conservado, es decir, no existe una pérdida o ganancia de genes. Sin embargo, al construir la historia evolutiva de los genes *phl* se revela una clara divergencia, la cual está relacionada con su capacidad de síntesis de diferentes congéneres del DAPG.
- ❖ Se confirmó que el DAPG es un compuesto con una potente actividad antiAGEs, capaz de inhibir la autooxidación de azúcares reductores y la formación de los compuestos α -dicarbonilos.
- ❖ La presencia de OH-FA, un isómero del DAPG, fue sugerida durante el fraccionamiento del extracto orgánico EPA12.
- ❖ El OH-FA por sí solo, no inhibe la formación de AGEs. Sin embargo, la mezcla DAPG/OH-FA inhibe la formación de AGEs en mayor grado que el DAPG solo, por vía de la inhibición de la formación de productos de Amadori.

PERSPECTIVAS

El DAPG es un compuesto comercializado actualmente por Sigma Aldrich, que ha sido estudiado durante dos décadas por su actividad antibiótica y antifúngica. En este trabajo, se confirma en ensayos *in vitro* que el DAPG es un compuesto con potente actividad antiAGEs. Al construir la historia evolutiva de los genes *phl* se revela una clara divergencia, la cual está relacionada con su capacidad de síntesis de diferentes congéneres del DAPG, esto abre la posibilidad a una exploración más profunda en torno al DAPG y sus congéneres como compuestos capaces de inhibir la formación de AGEs. Por lo tanto, se sugiere continuar investigando al DAPG y su actividad antiAGEs en ensayos *in vivo*, evaluando su farmacocinética y farmacodinamia. Además, el DAPG y/o sus congéneres no han sido investigados en relación a su toxicidad en modelos, por lo que sería interesante conocer la dosis letal media y todos los demás parámetros toxicológicos.

Por otro lado, las demás cepas de *P. protegens* endófitas de *P. auritum*, merecen ser objeto de estudio. Éstas podrían proveer diferentes congéneres de DAPG, los cuales podrían estar asociados con una potente actividad antiAGEs.

La construcción de la historia evolutiva del clúster biosintético del DAPG, ha mostrado ser una buena estrategia para guiar el descubrimiento de posibles congéneres. Entonces, la estrategia usada es una prueba de concepto que podría ser útil para el estudio de otros grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios, principalmente, en aquellos donde exista la presencia de una PKS tipo III o una terpen-sintasa cuyas características, inherentes a éstas, favorecen la diversidad química.

BIBLIOGRAFÍA

- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, **13**(19), 894-901.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**(2), 136-142.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**(4), 491-502.
- Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural Product Reports*, **33**(8), 988-1005.
- Oprea, T. I., & Mestres, J. (2012). Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *The AAPS Journal*, **14**(4), 759-763.
- Eisen, J. A., & Fraser, C. M. (2003). Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. *Science*, **300**(5626), 1706.
- Burki, F., Okamoto, N., Pombert, J. F., & Keeling, P. J. (2012). The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **279**(1736), 2246-2254.
- Timme, R. E., Bachvaroff, T. R., & Delwiche, C. F. (2012). Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. *PLoS one*, **7**(1), e29696.
- Giardino, I., Edelstein, D., Brownlee, M. (1994). Nonenzymatic glycosylation *in vitro* and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, **94**(1), 110.
- Yamagishi, S. I., Maeda, S., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K., Okuda, S. (2012). Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1820**(5), 663-671.
- McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Bailie, K. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Lyons, T. J. (1993). Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, **91**(6), 2470.
- Dahanukar, S. A., Kulkarni, R. A., Rege, N. N. (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology*, **32**(4), S81-S118.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicol.* **39**(5), 603-613.
- Gilani, A. H. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**(1), 43-49.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, **3**(5), 371-390.
- Goossens, A., Häkkinen, S. T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Inzé, D. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(14), 8595-8600.
- Tsala, D. E., Amadou, D., Habtemariam, S. (2013). Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*, **4**(3), 532-60.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, **78**(5), 431-441.
- Odjakova, M., Popova, E., Merilin, S., and Mironova, R. (2012). Plant-derived agents with anti-glycation activity. In *Glycosylation* (Petrescu, S., Ed.), pp 223-256, InTech Open Access Publisher. DOI: 10.5772/2917.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**(3), 173-289.
- De Campos, M. P., Cechinel Filho, V., Da Silva, R. Z., Yunes, R. A., Zacchino, S., Juarez, S., Bella Cruz, A. (2005). Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**(8), 1527-1530.
- S El-Khayat, E., R Mohamed Ibrahim, S., A Mohamed, G. (2012). Plant Endophytes, Renewable Source of New Natural Products. *The Natural Products Journal*, **2**(3), 225-234.
- Pérez Alonso, N., Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, **11**(4), 195-211.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**(13), 1222-1239.
- Strobel, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, **5**(6), 535-544.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**(4), 491-502.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.

- Gunatilaka, A. L. (2006). Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Journal of Natural Products*, **69**(3), 509-526.
- Luo, Y., Cobb, R. E., Zhao, H. (2014). Recent advances in natural product discovery. *Current Opinion in Biotechnology*, **30**, 230-237.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**(2), 136-142.
- Gross, H., Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp.* *Natural Product Reports*, **26**(11), 1408-1446.
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, **303**(5665), 1805-1810.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, **106**(8), 3468-3496.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**(2), 285-295.
- Hutchinson, C. R., Fujii, I. (1995). Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annual Reviews in Microbiology*, **49**(1), 201-238.
- Fenton, A. M., Stephens, P. M., Crowley, J., O'callaghan, M., & O'gara, F. (1992). Exploitation of gene (s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(12), 3873-3878.
- Mavrodi, D. V.; Mavrodi, O. V.; Parejko, J. A.; Weller, D. M.; Thomashow, L. S. In *Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management*; Maheshwari, D. K., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg: NY, USA, 2011; Vol. 1, Chapter 12, pp 267-283.
- Troppens, D. M., Moynihan, J. A., Barret, M., O'Gara, F., and Morrissey, J. P. (2013) Genetics and evolution of 2, 4-diacetylphloroglucinol synthesis in *Pseudomonas fluorescens*. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (de Bruijn, F. J., Ed.), 1st ed., pp 593-605, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New York.
- Marchand, P. A., Weller, D. M., Bonsall, R. F. (2000). Convenient synthesis of 2, 4-diacetylphloroglucinol, a natural antibiotic involved in the control of take-all disease of wheat. *J. Agric. Food Chem.* **48**(5), 1882-1887.
- Peyroux, J., & Sternberg, M. (2006). Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie*, **54**(7), 405-419.
- Vining, L. C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annual Reviews in Microbiology*, **44**(1), 395-427.
- Yang, F., & Cao, Y. (2012). Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms—review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**(2), 487-495.
- Dewick, P. M. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*; Wiley, J.; Sons, L., Ed.; Chichester: UK, 2009; Vol. 1, Chapter 4, pp 121-166. DOI: 10.1002/9780470742761.ch4
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. **46**(4), 597-673.
- Pérez Gutiérrez, R., Neira Gonzalez, A., & Hoyo-Vadillo, C. (2013). Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **13**(2), 163-193.
- Gutiérrez, R. M. P., Diaz, S. L., Reyes, I. C., Gonzalez, A. M. N. (2010). Anti-glycation effect of spices and chilies uses in traditional mexican cuisine. *Journal of Natural Products*, **3**, 95-102.
- Gutierrez, R. M. P. (2012). Effect of the hexane extract of *Piper auritum* on insulin release from β -cell and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat. *Pharmacognosy Magazine*, **8**(32), 308.
- Perez Gutierrez, R. M., Flores Cotera, L. B., Gonzalez, A. M. N. (2012). Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*, **17**(10), 11897-11919
- Verma, V. C., Lobkovsky, E., Gange, A. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Piperine production by endophytic fungus *Periconia sp.* isolated from *Piper longum* L. *The Journal of Antibiotics*, **64**(6), 427-431.
- Kulkarni, A. A., Kelkar, S. M., Watve, M. G., & Krishnamurthy, K. V. (2007). Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in in vitro cultures of *Piper spp.*, *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**(1), 63-74.
- Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S. J., & Ramana, K. V. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*, **48**(1), 58-64

- Jasim, B., Jimtha, C. J., Jyothis, M., & Radhakrishnan, E. K. (2013). Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*, *71*(1), 1-11.
- Bangera, M. G., & Thomashow, L. S. (1996). Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, *9*(2), 83-90.
- Pandith, S. A., Dhar, N., Rana, S., Bhat, W. W., Kushwaha, M., Gupta, A. P. & Lattoo, S. K. (2016). Functional Promiscuity of Two Divergent Paralogs of Type III Plant Polyketide Synthases. *Plant physiology*, *171*(4), 2599-2619.
- Song, L., Barona-Gomez, F., Corre, C., Xiang, L., Udway, D. W., Austin, M. B., Challis, G. L. (2006). Type III polyketide synthase β -ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(46), 14754-14755.
- Takeuchi, K., Noda, N., & Someya, N. (2014). Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS one*, *9*(4), e93683.
- Deng, P., Wang, X., Baird, S. M., & Lu, S. E. (2015). Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. *Standards in Genomic Sciences*, *10*(1), 117.
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., Shen, B. (2012). Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological Research*, *167*(7), 388-394.
- Bankhead, S. B., Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (2016). Rhizosphere Competence of Wild-Type and Genetically Engineered *Pseudomonas brassicacearum* is affected by the Crop Species. *Phytopathology*, *106*(6), 554-561.
- Moynihan, J. A., Morrissey, J. P., Coppoolse, E. R., Stiekema, W. J., O'Gara, F., & Boyd, E. F. (2009). Evolutionary history of the phl gene cluster in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 2122-2131.
- Yan, Q., Philmus, B., Chang, J. H., & Loper, J. E. (2017). Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*. *eLife*, *6*, e22835.
- Neira-González, A.M. Actividad Hipoglucemiante, Antioxidante y Antiglicación de Hojas y Endófitos de *Piper auritum*. Ph.D. Thesis, CINVESTAV, México, 2015, p.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 3233-3241.
- Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol*, *156*(5), 763-773
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649.
- Maidak, B. L., Larsen, N., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Olsen, G. J., Fogel, K., Woese, C. R. (1994). The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, *22*(17), 3485-3487.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* *22*(22), 4673-4680.
- Talavera, G., Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systems Biology*, *56*(4), 564-577.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* *17*(8), 754-755
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(7), 1253-1256.
- Roselló-Mora, R., Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(1), 39-67.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* *btu170*.
- Zerbino, D. R., Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* *18*(5), 821-829.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, A. R., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* *9*(1), 75.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., Breitling, R. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W237-W243.

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**(9), 2104-2105.
- Howe, K., Bateman, A., Durbin, R. (2002). QuickTree: building huge Neighbour-Joining trees of protein sequences. *Bioinformatics* **18**(11), 1546-1547.
- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., and Cerami, A. (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, **232**(4758), 1629-1632.
- Smirnov, V. A., Kiprianova, E. A. (1990). Bacteria of *Pseudomonas* genus. *Naukova Dumka, Kiev, Ukraine*, 100-111.
- Moorthy, K., Srinivasan, K., Subramanian, C., Mohanasundari, C., Palaniswamy, M. (2007). Phytochemical screening and antibacterial evaluation of stem bark of *Mallotus philippinensis* var. *Tomentosus*. *African Journal of Biotechnology*, **6**(13).
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, **95**(2), 200-204.
- Jang, J. Y., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Lee, C. W., Park, M. S., Kim, J. C., Kim, I. S. (2013). Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(28), 6786-6791.
- Mootz, H. D., & Marahiel, M. A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *Journal of Bacteriology*, **179**(21), 6843-6850.
- Schöner, T. A., Gassel, S., Osawa, A., Tobias, N. J., Okuno, Y., Sakakibara, Y., Shindo K, Sandmann G, Bode, H. B. (2016). Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. *ChemBioChem*, **17**(3), 247-253.
- Beatty, P. H., & Jensen, S. E. (2002). *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**(2), 159-169.
- Brucker, R. M., Baylor, C. M., Walters, R. L., Lauer, A., Harris, R. N., Minbiole, K. P. (2008). The identification of 2, 4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* **34**(1), 39-43.
- McSpadden Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S., Weller, D. M. (2001). A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology* **91**(1), 44-54.
- Chan, Y. A., Podelvels, A. M., Kevany, B. M., and Thomas, M. G. (2009). Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, **26**(1), 90-114.
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, Sutra, L., Moënné-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Journal of Chemical Ecology*. **34**(3), 180-188.
- Adisakwattana, S., Sompong, W., Meeprom, A., Ngamukote, S., Yibchok-anun, S. (2012). Cinnamic acid and its derivatives inhibit fructose-mediated protein glycation. *ChemBioChem*, **13**(2), 1778-1789.
- Jang, J. Y., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Lee, C. W., Park, M. S., Kim, J. C., & Kim, I. S. (2013). Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(28), 6786-6791.
- Turner, N., Zeng, X. Y., Osborne, B., Rogers, S., & Ye, J. M. (2016). Repurposing drugs to target the diabetes epidemic. *Trends in Pharmacological Sciences*, **37**(5), 379-389.
- Zhang, M., Luo, H., Xi, Z., & Rogaeva, E. (2015). Drug repositioning for diabetes based on 'omics' data mining. *PloS one*, **10**(5), e0126082.
- Tracanna, V., de Jong, A., Medema, M. H., & Kuipers, O. P. (2017). Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function. *FEMS Microbiology Reviews*, **41**(3), 417-429.
- Tierney, S. M., Friedrich, M., Humphreys, W. F., Jones, T. M., Warrant, E. J., & Wcislo, W. T. (2017). Consequences of evolutionary transitions in changing photic environments. *Austral Entomology*.
- Theobald, S., Vesth, T. C., Rasmussen, J. L. N., Kjærboelling, I., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., ... & Baker, S. E. (2016). Phylogenomic analysis of secondary metabolism genes sheds light on their evolution in Aspergilli. In *15th European Conference on Computational Biology*.

ANEXOS

ANEXO I

Profundidad de las librerías pertenecientes al género de *Pseudomonas* endófitas de *P. auritum* antes y después de su edición a través de Trimmomatic 0.32.1

LIBRERÍA ^a	PROFUNDIDAD	
	SIN EDITAR	EDITADOS A TRAVÉS DE TRIMMOMATIC ^b
PA27	966 x	246 x
PA12	230 x	159 x
PA1	195 x	118 x
PA14	126 x	76 x
PA26	78 x	62 x
PA25	114 x	91 x
PA11	111 x	90 x
PA15	127 x	105 x
PA19	74 x	58 x

^a Miseqllumina 2X250 pair end.

^b Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

ANEXO II

Ensamble del genoma PA1

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	30	30	200	60.57
		33	33	200	51.1
		33	33	150	89.63
		35	35	150	77.34
		35	35	170	64.12
		*33	33	170	79.95
		30	30	170	87.78
2	2:30:10	33	33	180	72.1
		30	30	200	0
		30	30	150	0.64
		*30	30	100	48.13
		28	28	100	49.3
		28	28	90	65.2

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de <i>contigs</i>	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	5423973	0.631996557	18779	41	67X	83
40	5433592	0.63179697	10440	36	71X	74
50	5438005	0.631701048	5907	32	63X	69
60	5444603	0.631620063	5550	26	65X	66
70	5452763	0.631546173	5573	25	59X	63
*80	5457532	0.631473594	5190	18	48X	59
90	5460783	0.631476409	5078	20	58X	56
100	5462881	0.631478571	4984	22	47X	53
110	5467344	0.631414887	6258	17	25X	50
120	5469818	0.631422866	8101	16	23X	48
130	5469905	0.631484188	9545	20	20X	45
140	5469628	0.631424614	6401	25	18X	42
150	5473230	0.631388684	7413	25	16X	40
160	5472058	0.631402502	6226	31	14X	37

*Ensamble seleccionado

ANEXO III

Ensamble del genoma PA11

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	35	35	200	94.25
		35	35	220	90.28
		*35	35	230	86.76
		35	35	240	81.44
		35	35	250	73.06

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
20	7361591	0.63250165	834348	290	66X	98
30	6984994	0.63431319	23682	38	128X	99
40	6976201	0.63432992	5349	23	167X	99
*50	6978909	0.63429015	3483	20	120X	98

*Ensamble seleccionado

ANEXO IV

Ensamble del genoma PA12

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	30	30	200	91.6
		33	33	250	48.93
		33	33	200	86.55
		*35	35	200	76.8
		35	35	250	29.82
		34	34	200	82.2
		34	34	250	34.7
		34	34	220	64.13
2	2:30:10	30	30	200	90.56
		33	33	250	39.23
		33	33	200	86.66
		*35	35	200	76.79
		35	35	250	22.64
		34	34	200	84.21
		34	34	250	27.5
		34	34	220	64.21
3	2:30:10	30	30	200	92.01
		33	33	250	52.89
		33	33	200	88.25
		*35	35	200	79.71
		35	35	250	35.19
		34	34	200	86.1
		34	34	250	43.46
		34	34	220	71.93

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
40	6975628	0.634431736	9241	30	239X	98
50	6978117	0.634402361	5892	28	263X	98
60	6981031	0.634348115	4130	28	259X	97
70	6979498	0.63433322	1440	22	215X	97
80	6984939	0.634295719	2948	17	187X	96
90	6984016	0.634313853	3191	12	174X	95
100	6984450	0.634309958	1282	15	194X	93
110	6986603	0.634349911	2940	18	164X	91
120	6986703	0.634318331	1171	17	143X	89
130	6990049	0.634287425	612	11	127X	87
140	6986231	0.6343094	577	13	107X	85
150	6988553	0.634304784	1166	16	86X	82
160	6989919	0.634338102	1280	17	76X	79
170	6987425	0.634296043	30	16	70X	76

*Ensamble seleccionado

ANEXO V

Ensamble del genoma PA14

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	30	30	200	70.73
		33	33	200	54.62
		32	32	200	58.68
		30	30	170	89.27
		*33	33	170	82.16

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde del inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	6976787	0.634623317	35742	41	42X	84
40	6967801	0.634546368	6253	13	90X	74
50	6971464	0.634467497	2423	12	59X	69
60	6976791	0.6344404	3649	12	47X	65
70	6978788	0.634434938	2815	15	40X	61
80	6980585	0.634408886	2155	14	60X	57
90	6983287	0.634354895	2116	12	79X	55
*100	6986565	0.634281486	1827	11	85X	52
120	6990213	0.634250109	10755	39	17X	46
130	6992942	0.634235725	10125	47	14X	44
140	6993642	0.634259218	4971	54	13X	41
150	7005416	0.634303238	9639	87	10X	38
160	7025409	0.634351132	17768	178	8X	36
30	6976787	0.634623317	35742	41	42X	84

*Ensamble seleccionado

ANEXO VI

Ensamble del genoma PA15

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	35	35	200	95.04
		35	35	220	91.23
		*35	35	230	87.8
		35	35	240	82.63
		35	35	250	74.32

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K</i> -mer	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	5449602	0.63191934	11207	95	111X	97
40	5455178	0.63187382	4623	93	115X	97
50	5465513	0.63177039	3269	91	107X	97
60	5470142	0.63176026	4097	84	89X	97
70	5472886	0.63171114	3603	77	81X	96
80	5480012	0.63163935	2516	75	76X	96
90	5484126	0.63158335	2916	79	70X	95
100	5489717	0.6315442	3466	71	64X	94
110	5496258	0.63154255	4894	64	67X	92
*120	5498827	0.63148014	3514	61	52X	91
130	5501366	0.6314615	4266	61	49X	89
140	5502737	0.63145936	4201	55	46X	87
150	5506691	0.63142934	4438	57	42X	85
160	5508021	0.63142685	4701	52	37X	83

*Ensamble seleccionado

ANEXO VII

Ensamble del genoma PA19

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	35	35	200	93.32
		35	35	220	88.49
		*35	35	230	84.32
		35	35	240	78.28
		35	35	250	69.09

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde del inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

K-mer	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	6975357	0.6342149	16886	42	78X	99
40	6975207	0.6342975	7423	19	86X	99
50	6980268	0.63431048	3437	15	91X	98
60	6984123	0.6342767	3083	16	83X	98
70	6987453	0.63417683	1012	15	80X	97
80	6983393	0.63427259	1469	13	78X	96
90	6985578	0.63427946	2038	11	80X	94
*100	6986104	0.6342779	904	11	74X	93
110	6987366	0.63429284	1897	13	60X	91
120	6989854	0.63428287	3479	13	56X	89
130	6988945	0.6342781	1223	15	47X	88
140	6988022	0.63427712	1024	14	45X	85
150	6989422	0.63427364	470	16	39X	82

*Ensamble seleccionado

ANEXO VIII

Ensamble del genoma PA25

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	35	200	93.39%	35
		35	220	89.07	35
		*35	230	85.33	35
		35	240	79.74	35
		35	250	71.12	35

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	6973483	0.63437865	20202	41	116X	98
40	6978582	0.63432455	9804	22	238X	98
50	6983381	0.63429644	7083	19	173X	98
60	6982961	0.63428591	3189	15	146X	98
70	6982868	0.63428777	2828	14	134X	97
80	6983466	0.63427516	1400	15	125X	96
90	6984962	0.63427074	1460	11	134X	95
100	6987206	0.63427749	1117	10	132X	93
110	6987957	0.63428285	1536	9	129X	92
*120	6986790	0.634289	462	8	130X	90
130	6989968	0.63428352	1847	10	103X	88
140	6988150	0.63428248	254	11	89X	86
150	6990278	0.63428208	1613	9	95X	84

*Ensamble seleccionado

ANEXO IX

Ensamble del genoma PA26

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	35	35	220	89.94
		*35	35	230	86.2
		35	35	240	80.69
		34	34	250	72.12

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
30	6971645	0.63425781	13979	33	71X	99
40	6976802	0.63430212	6696	18	87X	99
50	6980940	0.63429348	3241	17	85X	98
60	6981739	0.63428363	2355	16	83X	98
70	6984976	0.6342832	2338	15	75X	97
80	6984321	0.63428107	3285	13	78X	96
*90	6986019	0.63427747	1817	12	75X	95

*Ensamble seleccionado

ANEXO X

Ensamble del genoma PA27

Edición de las lecturas a través de Trimmomatic 0.32.1 (Bolger *et al.*, 2014)

Corrida	Adaptadores ^a	Rasurado de 5' a 3' ^b	Rasurado de 3' a 5' ^c	Longitud de lecturas ^d	% de supervivencia
1	2:30:10	30	30	200	88.9
		33	33	250	39.2
		33	33	200	81.58
		35	35	200	69.06
		*35	35	250	21.8
		34	34	200	75.44
		34	34	250	25.89
		34	34	220	54.11
		2	2:30:10	30	30
33	33			250	44.82
33	33			200	84.76
35	35			200	73.79
*35	35			250	27.9
34	34			200	81.97
34	34			250	35.82
34	34			220	65.11
3	20:30:10			30	30
		33	33	250	30.95
		33	33	200	81.33
		35	35	200	69.34
		*35	35	250	16.54
		34	34	200	78.57
		34	34	250	20.73
		34	34	220	55.39

^a Corta los adaptadores y otras secuencias específicas de Illumina de las lecturas.

^b Corta las bases desde el inicio de la lectura, hasta la calidad deseada.

^c Corta las bases desde el final de la lectura, hasta la calidad deseada.

^d Elimina las lecturas de una longitud menor al parámetro establecido.

* Parámetros seleccionados.

Ensamble del genoma

<i>K-mer</i>	Longitud del ensamble	Contenido de GC	Total de N's	Total de contigs	Profundidad	(%) Lecturas usadas
40	5307887	0.632799256	474	486	214X	95
50	5336044	0.632347032	352	316	206X	95
60	5356234	0.632102915	845	200	187X	95
70	5364996	0.632001693	936	153	167X	95
80	5375417	0.631850053	1517	133	177X	95
90	5380242	0.631770243	1410	118	155X	94
100	5387401	0.631682337	1523	115	162X	93
110	5389061	0.631764315	1487	99	131X	91
120	5393519	0.631555312	240	92	125X	90
130	5390157	0.631675659	277	88	127X	88
140	5398051	0.631495104	120	78	112X	86
*150	5400277	0.631442266	100	64	118X	84
160	5401404	0.631428575	440	65	106X	82
170	5402917	0.631433586	40	65	95X	79

*Ensamble seleccionado

ANEXO XI

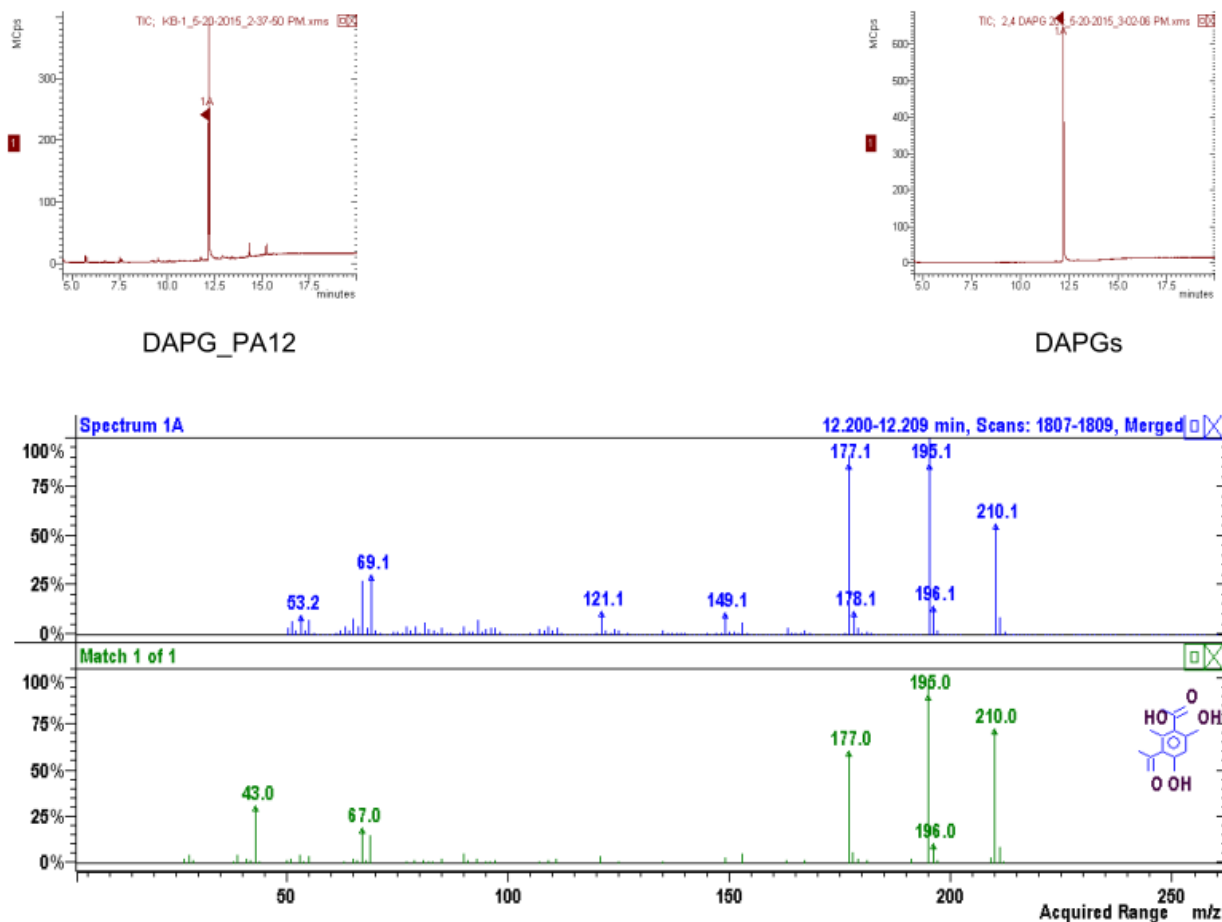


Figura XI. Identificación del DAPG, aislado del extracto orgánico la cepa PA12 a través de GC-MS, usando el estándar de DAPG (DAPGs) como control. El análisis fue realizado a través de Scion GC-MS-TQ con el software MS data Review. La separación se llevó a cabo utilizando una columna BR-5 (15m x 0.25mm, 0.25 μ m), utilizando helio a 1 ml/min. La columna de la temperatura fue programada a: 50 $^{\circ}$ C por 1 min., 20 $^{\circ}$ C/min, 300 $^{\circ}$ C por 2 min. La temperatura para el inyector y detector fue de 250 $^{\circ}$ C. El volumen de inyección de la muestra fue 1 μ L. La muestra se disolvió en MeCN, la cual fue inyectada utilizando el modo *Split*, con una relación de 1:100. El *scan* del espectrómetro de masas fue en un rango de m/z 50 – 400 con un impacto de electrón (EI) 70 eV. El tiempo de retención fue identificado en las dos muestras de 12 min y el espectro GS-MS/MS mostró el mismo patrón de fragmentación con respecto al estándar.

ANEXO XII

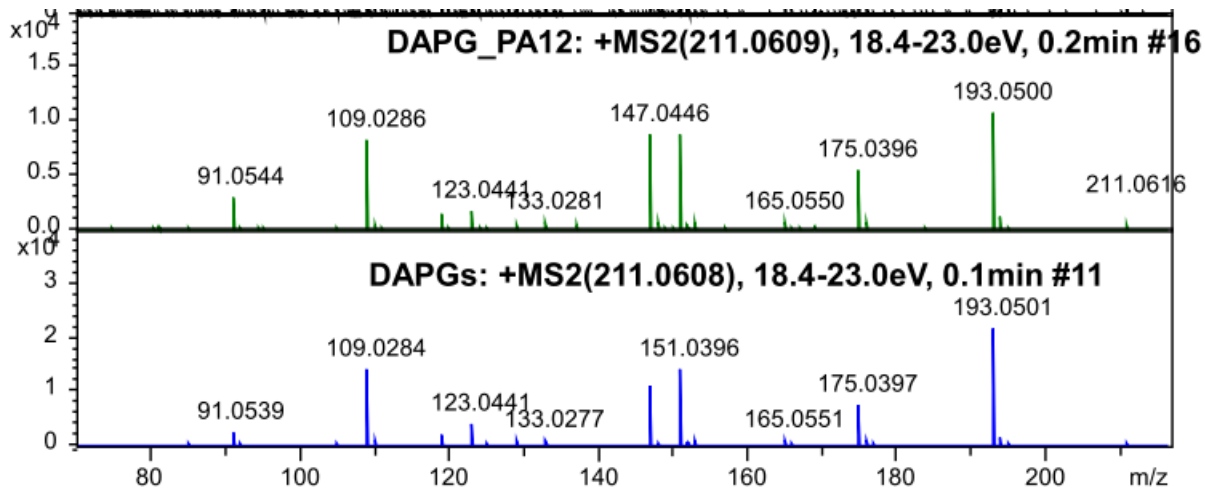


Figura XII. Identificación del DAPG aislado del extracto orgánico de la cepa PA12 a través de ESI-MS/MS (modo positivo), utilizando como control, el estándar DAGP (DAPGs). El análisis fue realizado a través de ESI-QTOFMS equipado con el software Data Analysis 4.1. La separación se llevó a cabo utilizando una columna BR-5 (15m x 0.25mm, 0.25 μ m), utilizando helio a 1 ml/min. La columna de la temperatura fue programada a: 50 °C por 1 min., 20 °C/min, 300 °C por 2 min. La temperatura para el inyector y detector fue de 250 °C. El volumen de inyección de la muestra fue 1 μ L. La muestra se disolvió en CD₃OD, la cual fue inyectada utilizando el modo *Split*, con una relación de 1:100. El *scan* del espectrómetro de masas fue en un rango de m/z 50 – 400 con un impacto de electrón (EI) 70 eV. El tiempo de retención fue identificado en las dos muestras de 12 min y el espectro ESI-MS/MS mostró el mismo patrón de fragmentación con respecto al estándar.

ANEXO XIII

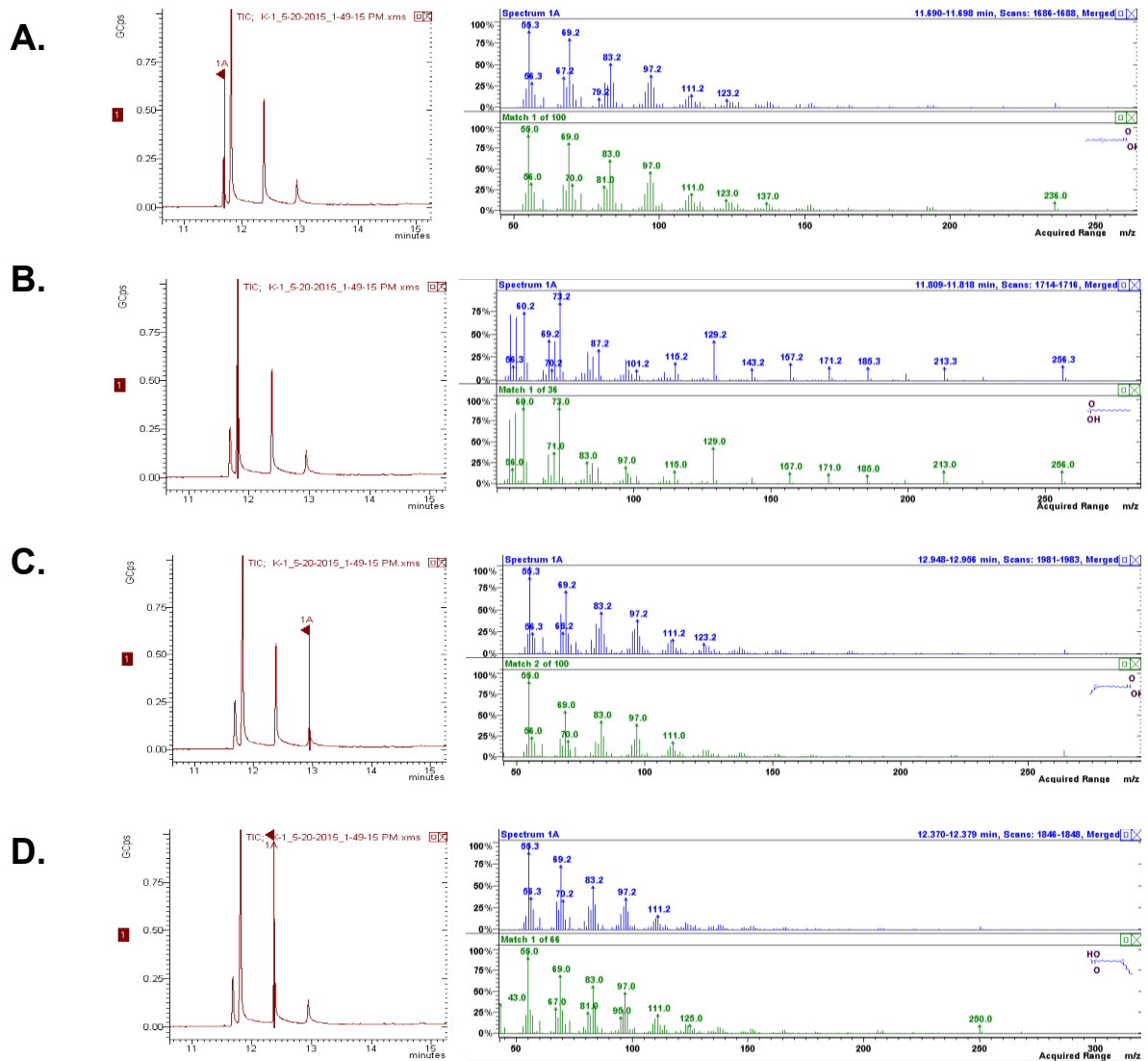
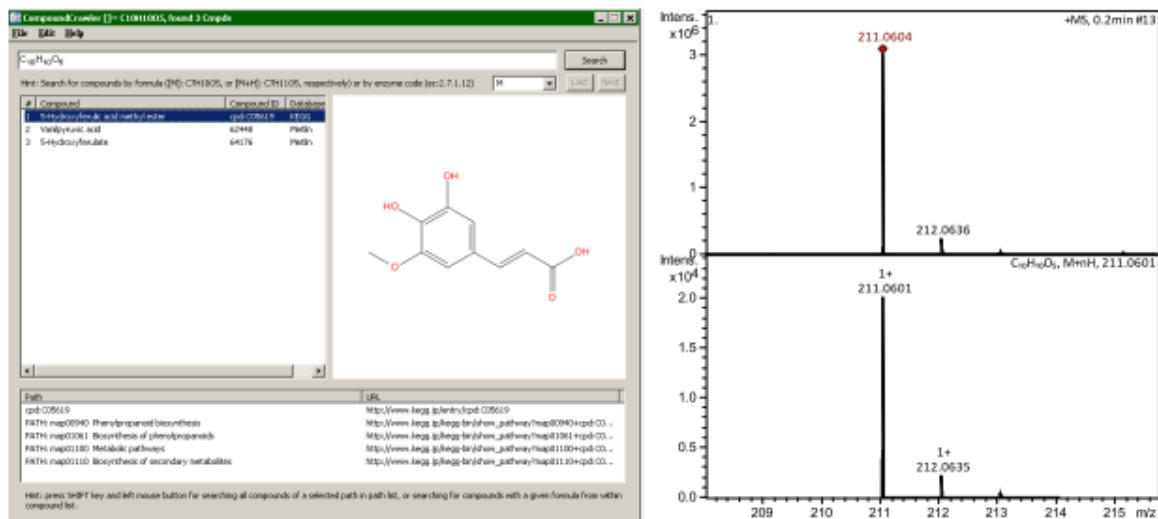


Figura XIII. Identificación de ácidos grasos por análisis de CG-MS. El análisis fue llevado a cabo utilizando el equipo Scion GC-MS-TQ equipped. La separación fue a través de la columna BR-5 (15m x 0.25mm, 0.25 μ m) usando helio a 1 ml/min. La temperatura de la columna fue programada a 50 $^{\circ}$ C por 1 min., 20 $^{\circ}$ C/min, 300 $^{\circ}$ C por 2 min. La temperatura del inyector y detector fue de 250 $^{\circ}$ C. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μ L. La muestra fue disuelta en CHCl_3 y fue inyectada usando el modo *split*, con una relación de 1:100. El detector del espectrómetro de masas fue en un rango de m/z 50 – 400 con un impacto de electrón (EI) de 70 eV. **A.** ácido *cis*-9-hexadecenoico, tiempo de retención 11.6 min; **B.** ácido *n*-hexadecanoico, tiempo de retención 11.8 min; **C.** ácido *cis*-vaccenico, tiempo de retención 12.9 min; **D.** ácido *cis*-10-heptadecenoico, tiempo de retención 12.3 min.

ANEXO XIV

A.



B.

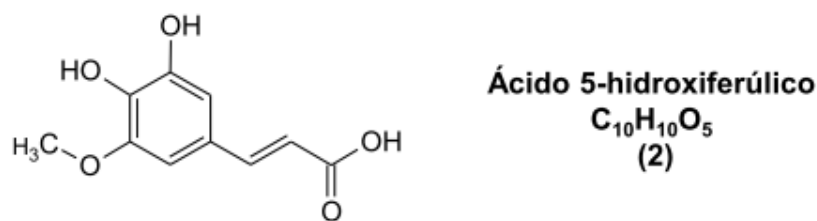
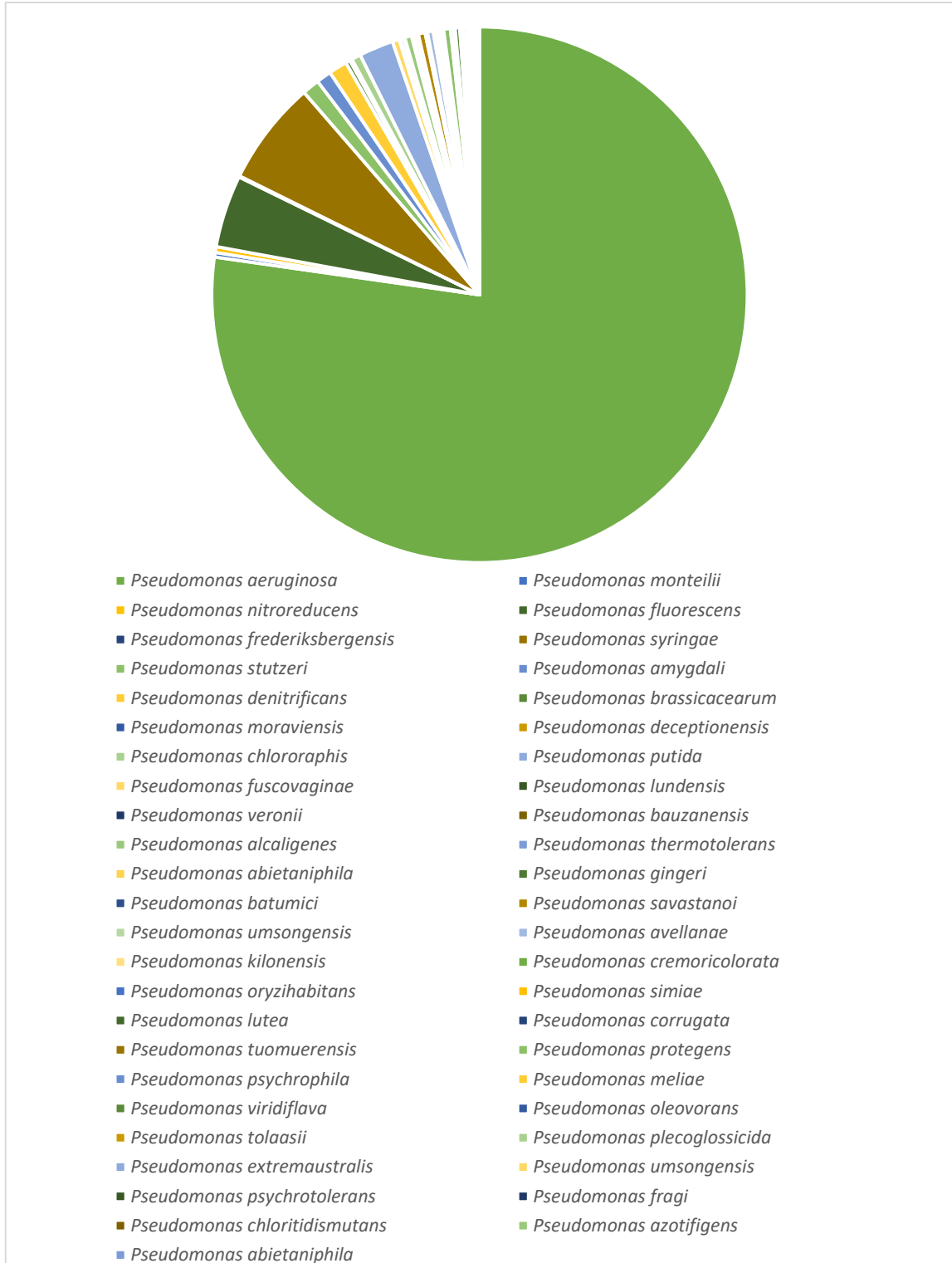


Figura XIV. A. Análisis automático de la fracción PA12-2.2.2.2, obtenida después del tercer fraccionamiento por CC guiado por actividad, sugiere la presencia del ácido 5-hidroxi ferúlico (OH-FA) ($C_{10}H_{10}O_5$) (2), un isómero estructural del DAPG (B).

ANEXO XV

Distribución de Genomas de *Pseudomonas* analizados



ANEXO XVI

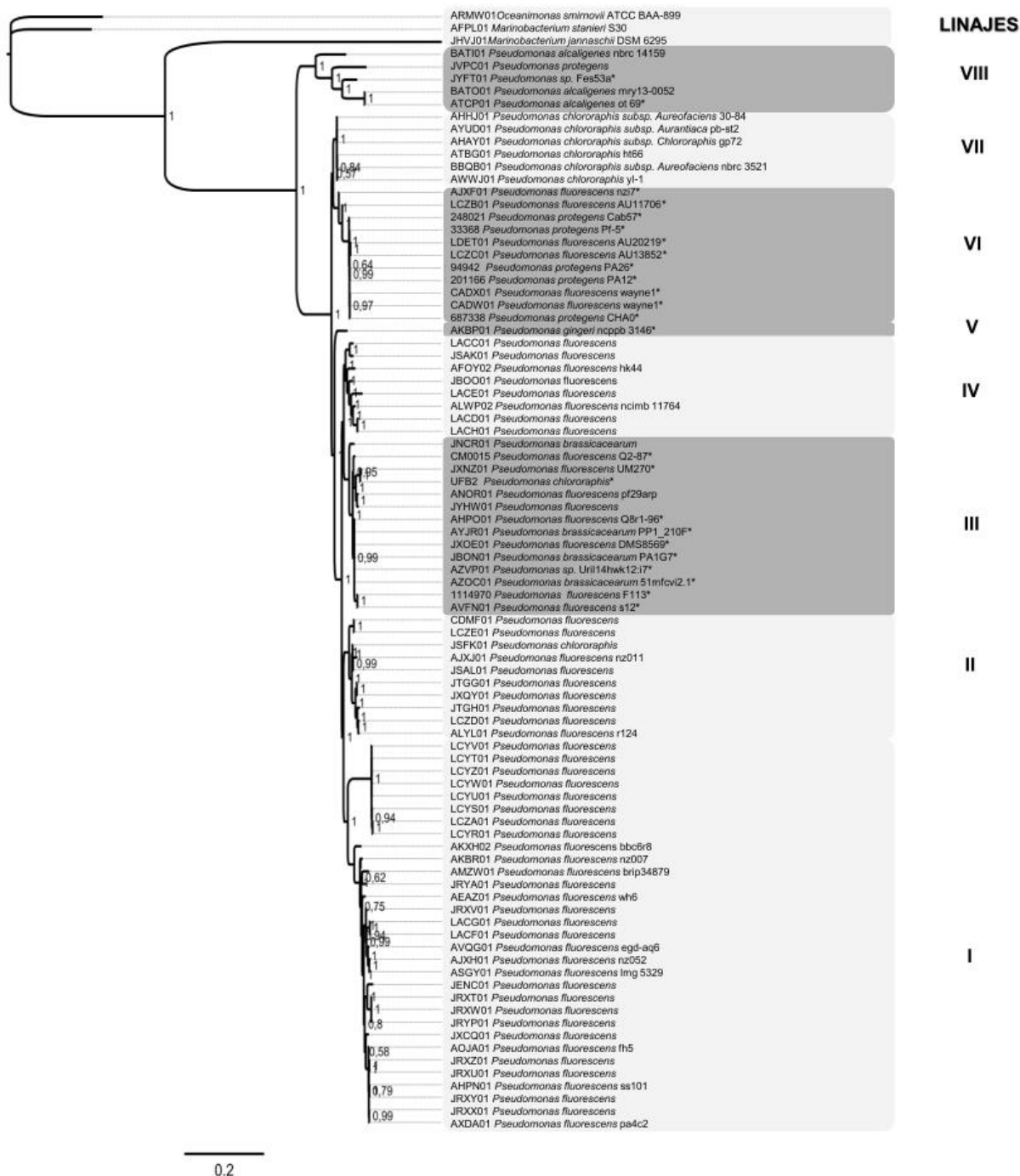


Figura XVI. Versión expandida del árbol filogenético de especies del género de *Pseudomonas* usando una matriz concatenada de siete proteínas (RpoD, GyrB, AcnB, PFK, GAP, PGI y RpoB). El árbol fue construido por un método Bayesiano con el modelo LG. El número que se muestra en cada nodo indica la probabilidad posterior valuada en 1,000,000 réplicas. Secuencias de *Oceanimonas doudehoffii* 749T, *Marinobacterium georgiense* 106746T y *Marinobacterium stanieri* 6847T fueron usadas como raíz. La ocurrencia del clúster *phl* se muestra al lado del árbol, demostrando una conservación clado-específica (linajes III, V, VII y VIII). BGC *phl* *.